

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**KATEKOLÜN PARENTAL VE EPURUBİCİN DİRENÇLİ AKCİĞER
KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOZİSİ HANGİ SİNYAL YOLU İLE
UYARDIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Zeynep DEMİR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

HAZİRAN 2022

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**KATEKOLÜN PARENTAL VE EPURUBİCİN DİRENÇLİ AKCİĞER
KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOZİSİ HANGİ SİNYAL YOLU İLE
UYARDIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Zeynep DEMİR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS

HAZİRAN 2022

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KATEKOLÜN PARENTAL VE EPURUBİCİN DİRENÇLİ AKCİĞER
KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOZİSİ HANGİ SİNYAL YOLU İLE
UYARDIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Zeynep DEMİR
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS**

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2022-5902 nolu proje ile desteklenmiştir.**

HAZİRAN 2022

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KATEKOLÜN PARENTAL VE EPURUBİCİN DİRENÇLİ AKCİĞER
KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOZİSİ HANGİ SİNYAL YOLU İLE
UYARDIĞININ ARAŞTIRILMASI

Zeynep DEMİR
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS

Bu tez 24/06/2022 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Aysun ÖZKAN (Danışman)
Doç. Dr. Esra AYDEMİR
Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ

ÖZET

KATEKOLÜN PARENTAL VE EPURUBİCİN DİRENÇLİ AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE APOPTOZİSİ HANGİ SİNYAL YOLU İLE UYARDIĞININ ARAŞTIRILMASI

Zeynep DEMİR

Yüksek Lisans, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Haziran 2022; 77 sayfa

Bu çalışmada bir benzen türevi olan katekolün parental akciğer kanseri (P-H1299), epirubicin-HCl dirençli akciğer kanseri (R-H1299) ve sağlıklı fibroblast (Bj) hücreleri üzerine olan sitotoksik, antiproliferatif, hücre döngüsü bloke edici ve apoptotik etki mekanizmaları araştırılmıştır. Her bir hücrede, apoptotik sinyal yolunun en fazla hangi mekanizma ile uyarıldığı ortaya konulmuştur. Katekolün hücreler üzerine sitotoksik etkisi Cell Titer-Blue® Cell viability assay kiti ile belirlenmiştir. Katekolün P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerindeki IC₅₀ değeri (hücrelerin %50 sini öldüren konsantrasyon) sırasıyla 58 µg/ml, 90 µg/ml ve 207 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Katekolün P-H1299 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi hem R-H1299 hem de Bj hücrelerinden daha yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda kaspaz 3/7 aktivitesi ve mRNA ekspresyonları katekolün IC₅₀ konsantrasyonu ile 24 saat muamele edilen hücrelerde çalışıldı. Hücrelerde apoptotik yolağın anahtar enzimlerinden biri olan kaspaz-3/7 aktivitesi ApoTox-Glo Triplex Assay (Promega) kiti kullanılarak ölçüldü. Hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivitesi kontrol hücrelerle karşılaştırıldığında P-H1299 hücrelerinde 2,8 kat, R-H1299 hücrelerinde 2,3 kat ve Bj hücrelerinde 1,6 kat fazla bulundu. P-H1299 hücrelerinin kaspaz 3/7 aktivitesi, R-H1299 hücrelerinden 1,2 kat, Bj hücrelerinden 1,75 kat daha yüksek bulundu.

Katekolün hücrelerde apoptozisi hangi sinyal yolu ile uyardığını araştırmak için RT-PCR (ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu) ile Bax (Bcl-2 Associated X Protein), Bcl-2 (B-Hücre Lösemi 2), ATM (Ataxia telangiectasia mutated kinase), ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related), siklin D1, PCNA (prolifere hücre nükleer antijeni) genlerinin mRNA ekspresyonları araştırılmıştır. Katekol uygulanan tüm hücreler karşılaştırıldığında, antiproliferatif etkiyi ortaya koyan PCNA ve hücre döngüsü belirteci olan siklin D1 mRNA ekspresyonları en düşük P-H1299 hücrelerinde bulunmuştur. Katekolün hücrelerdeki apoptotik sinyal yolunu uyarma mekanizmalarından biri de pro-apoptotik bir gen olan Bax'ın mRNA ekspresyonunun antiapoptotik bir gen olan Bcl-2'nin mRNA ekspresyonuna oranının ölçülmesidir. Katekole 24 saat maruz kalan P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranları sırasıyla 1,5 kat, 2,0 kat ve 0,8 kat olarak hesaplanmıştır. Bax/Bcl-2 sinyal yolu en fazla R-H1299 hücrelerinde uyarılmıştır. Katekol P-H1299 ve R-H1299 hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranının artmasına neden olarak apoptotik etki göstermiştir. Ancak Bj hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranının azalmasına neden olarak antiapoptotik bir etki göstermiştir. Katekolün hücrelerde meydana getirdiği DNA hasarını ortaya koymak için ATM ve ATR genlerinin mRNA ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. Katekol ile

muamele edilen P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde hem ATM hem de ATR mRNA ekspresyonu kontrole göre artmıştır bu artış katekolün hücreler üzerinde DNA hasarına neden olduğunu göstermektedir. Sağlıklı hücrelerle kıyaslandığında R-H1299 hücrelerinde ATM ve ATR mRNA ekspresyonu P-H1299 hücrelerinden daha düşük bulunmuştur.

Ancak tüm hücrelerdeki PCNA, siklin D1, Bax, Bcl-2, ATM ve ATR mRNA ekspresyonu seviyeleri kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında en fazla ATM ve ATR genlerinin mRNA ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Sonuç olarak katekolün her ne kadar çoklu sinyal yolu ile apoptotik etkiye neden olduğu görülse de en etkili uyarılan sinyal yolunun DNA’da tek ve çift zincir kırıklarının varlığı ile açıklanan ATM ve ATR sinyal yolu olduğu ortaya konmuştur.

ANAHTAR KELİMELEER: Akciğer kanseri, Apoptozis, İlaç direnci, Katekol

JÜRİ: Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Doç. Dr. Esra AYDEMİR

Dr. Öğr. Üyesi Dilara AKÇORA YILDIZ

ABSTRACT

INVESTIGATION BY WHICH SIGNAL WAY CATHECOL STIMULATES APOPTOSIS IN PARENTAL AND EPURUBIC-RESISTANT LUNG CANCERS

Zeynep DEMİR

MSc Thesis in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Aysun OZKAN

June 2022; 77 pages

In this study, cytotoxic, antiproliferative, cell cycle blocking and apoptotic effect of catechol, a benzene derivative, on parental lung cancer (P-H1299), epirubicin-HCl resistant lung cancer (R-H1299) and healthy fibroblast (Bj) cells were investigated. The mechanism by which the apoptotic signaling pathway is most stimulated in each cell has been revealed. Cytotoxic effects of catechol on cells were determined by Cell Titer-BlueR Cell Viability. IC₅₀ values (concentration that kills 50% of cells) of catechol in P-H1299, R-H1299 ve Bj were calculated respectively for catechol 58 µg/ml, 90 µg/ml ve 207 µg/ml. The cytotoxic effect of catechol on P-H1299 cells was higher than on both R-H1299 and Bj cells. In our study, caspase 3/7 activity and mRNA expressions were studied in cells treated with IC₅₀ concentration of catechol for 24 hours. Caspase-3/7 activity, one of the key enzymes of the apoptotic pathway in cells, was measured using the ApoTox-Glo Triplex Assay (Promega) kit. Caspase 3/7 activity in cells was 2,8 times higher in P-H1299 cells, 2,3 times higher in R-H1299 cells and 1,6 times higher in Bj cells compared to control cells. Caspase 3/7 activity of P-H1299 cells was found 1,2 times higher than R-H1299 cells and 1,75 times higher than Bj cells.

In order to investigate which signal pathway catechol stimulates apoptosis in cells, mRNA expressions of Bax (Bcl-2 Associated X Protein), Bcl-2 (B-Cell Lymphoma 2), ATM (Ataxia telangiectasia mutated kinase), ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related), cyclin D1, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) genes were investigated by RT-PCR (reverse transcriptase polymerase polymerase chain reaction). When all cells treated with catechol were compared, PCNA, which shows the antiproliferative effect, and cyclin D1 mRNA, which is a cell cycle marker, were found the lowest in P-H1299 cells. The apoptotic effect of catechol in cells was demonstrated by looking at the mRNA expression rates of Bax, a pro-apoptotic gene, and Bcl-2, an antiapoptotic gene. Bax/Bcl-2 ratios in P-H1299, R-H1299 and Bj cells exposed to catechol for 24 hours were calculated as 1,5 times 2,0 times and 0,8 times respectively. The Bax/Bcl-2 signaling pathway was most stimulated in R-H1299 cells. Catechol showed an apoptotic effect by increasing the Bax/Bcl-2 ratio in P-H1299 and R-H1299 cells. However, it showed an antiapoptotic effect by causing a decrease in the Bax/Bcl-2 ratio in Bj cells. In order to reveal the DNA damage caused by catechol in cells, mRNA expression levels of ATM and ATR genes were measured. Both ATM and ATR mRNA expression were increased in P-H1299, R-H1299 and Bj cells treated with catechol,

indicating that catechol causes DNA damage on cells. When compared to healthy cells, ATM and ATR mRNA expression was lower in R-H1299 cells than in P-H1299 cells.

However, when PCNA, cyclin D1, Bax, Bcl-2, ATM and ATR mRNA expression levels in all cells were compared with control cells, it was observed that mRNA expression of ATM and ATR genes increased the most. As a result, although it is seen that catechol causes apoptotic effect through multiple signaling pathways, it has been revealed that the most effective signaling pathway is ATM and ATR signaling pathway, which is explained by the presence of single and double strand breaks in DNA.

KEYWORDS: Apoptosis, Catechol, Drug resistance, Lung cancer

COMMITTEE: Prof. Dr. Aysun ÖZKAN

Assoc. Prof. Esra AYDEMİR

Asst. Prof. Dilara AKÇORA YILDIZ

ÖNSÖZ

Kanser halk sağlığı sorunlarında başta gelen, insidansı ve mortalitesi artış eğiliminde olan önlenebilir bir sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre yaklaşık 10 milyon kişi 2020 yılında kansere bağlı olarak hayatını kaybetmiştir. Kanser nedenli ölümlerde akciğer kanseri başta gelmektedir. Dünya’da meme kanserinden sonra insidansı en yüksek ikinci kanser türü olan akciğer kanseri 2020 yılında yaklaşık 1,8 milyon kişinin ölüm sebebi olması nedeniyle mortalitesi en yüksek kanser türü olduğu belirtilmiştir. Türkiye’de de kanser insidansı yüksek olan ölüm nedenlerindendir ve küresel verilere benzer şekilde en fazla ölüme sebebiyet veren kanser türü akciğer kanseridir.

En önemli kanser tedavisi yöntemlerinden biri kemoterapidir. Epirubicin-HCl gibi kemoterapotiklere karşı geliştirilen ilaç direnci kemoterapinin önündeki en büyük engellerdendir. Bu sebeple yapılan çalışmalarda parental ve ilaç dirençli hücrelerin birlikte değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda antikanser çalışmaların başarısını arttırmak ve ilaç direncini aşmak için doğal, küçük molekül yapısına sahip ve DNA üzerine etki edebilen bileşikler ilgi çekmektedir. Geliştirilen ve etkinliği incelenen bu bileşiklerin sağlıklı hücrelere olabilecek en az zararı vererek seçici toksisite göstermesi de ayrıca önemlidir. Antikanser bileşiğin tümör hücrelerine yönelerek normal hücrelerin sağ kalımına devam etmesi hedeflenmektedir. Bu tip bileşenlerin antikanser etkinlikleri belirlenerek yeni kemoterapotik stratejiler geliştirilebilir ve tedavide istenilen başarıya ulaşılabilir.

Çalışmamızda parental ve ilaca dirençli H1299 (insan akciğer kanseri) hücrelerinde katekolün $[C_6H_4(OH)_2]$ apoptotik etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlarda katekolün parental akciğer kanseri hücrelerinde sağlıklı hücrelere kıyasla daha yüksek apoptotik olduğu görülürken dirençli hücrelerde aynı etki görülmemiştir. Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen verilerin, farklı hücre gruplarının katekolün apoptotik etkisine verdikleri cevapların farklı sinyal yolları ile gerçekleştiğine dikkat çekerek yeni kemoterapotik stratejilerin belirlenmesine destek sağlamasını ve literatüre katkıda bulunmasını dilerim.

Bana lisans dönemimden bu yana çalışma ve araştırma olanağı sağlayan, çalışmalarımın her aşamasında desteğini yanımda hissettiğim ve önerileri ile beni yönlendirip yolumu aydınlatan danışman hocam Sayın Prof.Dr. Aysun Özkan’a (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü) teşekkürü borç bilirim. Hayatım boyunca her zaman olduğu gibi beni yüksek lisans sürecimde de destekleyen, hayattaki en büyük şanslarım olan Anneme, Babama ve tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programından yararlandığım TÜBİTAK’a ve projemi destekleyen (FYL-2022-5902 no’lu proje) Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Akciğer Kanseri	4
2.1.1. Akciğer Kanserinin Histopatolojisi	5
2.1.2. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde genetik ve moleküler değişiklikler ...	6
2.1.3. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri klasik ve yeni tedavi yöntemleri	8
2.2. Katekol	9
2.2.1. Katekolün kimyasal yapısı	9
2.2.2. Katekolün kullanım alanları	11
2.2.3. Katekolün etki mekanizması	12
2.2.4. Katekolaminler	14
2.3. Epirubicin-HCl	14
2.3.1. Epirubicin-HCl'nin kimyasal yapısı	14
2.3.2. Epirubicin-HCl'nin etki mekanizması, farmakokinetiği ve antineoplastik aktivitesi	15
2.4. Apoptoz	15
2.4.1. Apoptozun tanımlanması	15
2.4.2. Apoptoz mekanizmaları	16
2.4.3. Apoptozun moleküler düzenleyicileri	17
2.4.3.1. Kaspazlar	17
2.4.3.2. Bcl-2 Ailesi	19
2.4.3.3. Bax	19
2.4.4. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler	19
2.4.5. Apoptoz sürecinin içsel veya dışsal uyaranlara göre değerlendirilmesi	20
2.4.5.1. Dışsal yol (reseptör aracılı apoptoz)	20
2.4.5.2. İçsel yol (mitokondri aracılı apoptoz)	21
2.4.5.3. Endoplazmik retikulum aracılığı ile apoptoz	23
2.5. Hücre Döngüsü	24
2.5.1. Siklinler	25
2.5.1.1. D tipi siklinler ve siklin D1	26
2.6. DNA Hasar Yanıtı (DDR)	26
2.6.1. p53 geni	27
2.6.2. ATM ve ATR genleri	27
2.7. Akciğer Kanserinde İlaç Direnç Mekanizmaları	28
3. MATERYAL VE METOD	31
3.1. H1299 Hücrelerinin Çoğaltılması ve Dondurulması	31
3.2. Çalışmalarda Kullanılan Katekol ve Epirubicin-HCl	31
3.3. Sitotoksosite Ölçümü	31
3.4. Kaspaz 3/7 Aktivitelerinin Belirlenmesi	32

3.5. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR).....	33
3.5.1. mRNA izolasyonu	33
3.5.2. cDNA sentezi	33
3.5.3. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR).....	34
3.5.4. Agaroz jel elektroforezi	34
3.6. İstatistiksel Analiz	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Parental Hücrelerden İlaç Dirençli Hücrelerinin Oluşturulması	35
4.2. Hücre Canlılığı Testi.....	35
4.3. Katekolün Kaspaz-3/7 Enzim Aktivitesine Etkisinin Ölçülmesi	42
4.4. Katekolün P-H1299 ve R-H1299 ve B _j Hücrelerinde PCNA, Siklin D1, ATM/ATR, Bax ve Bcl-2 Genlerinin İfade Düzeylerine Etkisi	44
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇLAR.....	62
7. KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Katekolün parental ve epurubicin dirençli akciğer kanseri hücrelerinde apoptozisi hangi sinyal yolu ile uyardığının araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

24/06/2022

Zeynep DEMİR



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	:Alfa
bp	:Baz çifti
CO ₂	:Karbondioksit
H ₂ O ₂	:Hidrojen peroksit
kDa	:Kilodalton
MgCl ₂	:Magnezyum Klorür
μ g	:Mikrogram
μ l	:Mikrolitre
μ mol	:Mikromol
mg	:Miligram
ml	:Mililitre
mM	:Milimol
ng	:Nanogram
nm	:Nanometre
nmol	:Nanomol
°C	:Santigrat Derece
cm ²	:Santimetrekare
%	:Yüzde

Kısaltmalar

ADK	:Adenokarsinom
AIF	:Apotoz Uyarıcı Faktör
APAF 1	:Apoptotik Proteaz Aktivatör Faktör 1
ATM	:Ataxia telangiectasia mutated kinase
ATP	:ATP Bağlayan Kaset
ATR	:Ataxia telangiectasia and Rad3-related
BAD	:Bcl-2 Associated Agonist of Cell Death
BAK	:Bcl-2 Antagonist/killer
BAX	:Bcl-2 Associated X Protein
Bcl-2	:B-Hücre Lösemi 2
Bcl-W	:Bcl-2-like protein 2
Bcl-XL	:B-cell lymphoma-extra large
BID	:BH3 Interacting Domain Death Agonist
BIK	:Bcl-2 Interacting Killer
BIM	:Bcl-2 Like 11
Bj	:Sağlıklı Fibroblast Hücre Hattı
BMF	:Bcl-2 Modifying Factor
CAD	:Kaspaz ile Aktive Olan DNaz
CDK	:Siklin Bağımlı Kinaz Proteini
DA	:Dopamin
DDR	:DNA Hasarı Yanıtı
DED	:Ölüm Etkili Domain
DIABLO	:Düşük pH'da Doğrudan IAP'ye Bağlanan Protein
DISC	:Ölüm İndüleyen Sinyal Kompleksi
DNA	:Deoksiribonükleik Asit

dNTP	:Deoksinükleotid Trifosfat
DOPA	:3,4-dihidroksi-L-fenilalanin
EDTA	:Tripsin-Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGF	:Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	:Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FADD	:Fas İlişkili Ölüm Domaini
Fas L	:Fas Ligandı
GAPDH	:Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
H1299	:Akciğer Kanseri Hücresi
HRK	:Harakiri, Bcl-2 Interacting Protein
IC ₅₀	:Hücrelerin %50'sini Öldüren Konsantrasyon
ICAD	:Kaspaz ile Aktive Olan DNaz İnhibitörü
KEAP 1	:Kelch-Like ECH-associated protein 1
KHAK	:Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	:Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KRAS	:Kirsten Ras Sarcoma Viral Onkogen
LRP	:Akciğer Direnç Proteinini
MAPK	:Mitojen-Aktiveli Protein Kinaz
Mcl-1	:Myeloid leukemia cell differentiatin protein
MDR	:Çoklu İlaç Direnci
MET	:Mesenchymal Epithelial Transition
mRNA	:Mesajcı RNA
MRP	:MDR-İlişkili Protein
mTOR	:Mammalia Target of Rapamisin
mTOR	:Rapamisinin Memeli Hedefi
NAD	:Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH	:Nikotinamid Adenin Dinükleotid'in İndirgenmiş Formu
NADP+	:Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NADPH	:Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NE	:Nöroendokrin
NOXA	:Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
PCNA	:Prolifere Hücre Nükleer Antijeni
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
P-gp	:P-Glikoprotein
PI3K	:Phosphatidylinositol 3 Kinase
PTEN	:Fosfataz ve Tensin Homolog
RNA	:Ribonikleik Asit
ROS	:Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	:Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SHK	:Squamos Hücreli Karsinom
STK 11	:Serine/threonin kinase 11
TNF	:Tümör Nekrozis Faktör
TRADD	:Trail Reseptör İlişkili Ölüm Domaini
VEGF	:Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. 2020’de Dünya çapında erkeklerde görülen kanser insidansı ve ölüm oranları	4
Şekil 2.2. 2020’de Dünya çapında kadınlarda görülen kanser insidansı ve ölüm oranları	5
Şekil 2.3. Akciğer kanserinin histolojik sınıflandırması.....	6
Şekil 2.4. Katekolün moleküler yapısı [$C_6H_4(OH)_2$].....	10
Şekil 2.5. Katekol, NADH ve Cu^+ tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarının olası mekanizması.....	12
Şekil 2.6. Katekollerin çevredeki ve hücrelerdeki kimyasal reaksiyonları ve hücrelerdeki moleküler etki biçimleri. Kimyasal reaksiyonlar: 1, Ağır metallerle kompleks oluşumu; 2, Redoks döngüsü; 3, Ağır metaller ve oksijen ile reaksiyonda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi. Hücrelerdeki moleküler etki biçimleri: 4, DNA hasarı (örneğin, iplik kopmaları ve DNA eklenti oluşumu); 5, protein hasarı (örneğin, disülfid grupları aracılığıyla protein çapraz bağlanması); 6, membranlarda absorpsiyon ve olası etkileşimler.....	13
Şekil 2.7. Katekolün redoks döngüsü. Reaksiyonlar uygun koşullar altında ağır metaller tarafından katalize edilebilir	13
Şekil 2.8. Katekolaminlerin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 2.9. Epirubicin-HCL’nin kimyasal yapısı	15
Şekil 2.10. Apoptozun beş ana yolağına genel bakış	16
Şekil 2.11. Kaspaz aktivasyonu yolları	17
Şekil 2.12. İnsan kaspazlarının alan yapısı	18
Şekil 2.13. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler	20
Şekil 2.14. Apoptozun içsel ve dışsal yolları	21
Şekil 2.15. İntrinsik apoptoz yolağı ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin etki mekanizması....	23
Şekil 2.16. Apoptozun üç ana yolu.....	24
Şekil 2.17. Hücre döngüsü düzenleyici faktörleri (URL-2).....	25
Şekil 2.18. Siklinlerin hücre döngüsündeki ifade düzeyler	26
Şekil 2.19. DNA hasarı cevabı sinyal yolları.....	27
Şekil 2.20. DNA hasarı cevabı elemanları ve rolleri.....	28

Şekil 2.21. KHDAK’de ilaç direnci ile ilişkili gen değişiklikleri	29
Şekil 2.22. KHDAK tedavisinde genel olarak kullanılan kemoterapötik ajanlara direncin altında yatan mekanizmalar.	30
Şekil 3.1. DEVD dizisini içeren luminogenic substratının kaspaz- 3/7 bölünmesi	32
Şekil 4.1. P-H1299 hücrelerinde artan katekol konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı	36
Şekil 4.2. R-H1299 hücrelerinde artan katekol konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı	38
Şekil 4.3. Bj hücrelerinde artan katekol konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı.....	40
Şekil 4.4. P-H1299 hücrelerinde katekolün kaspaz-3/7 enzim aktivitesine etkisi	42
Şekil 4.5. R-H1299 hücrelerinde katekolün kaspaz-3/7 enzim aktivitesine etkisi	43
Şekil 4.6. Bj hücrelerinde katekolün kaspaz-3/7 enzim aktivitesine etkisi.....	43
Şekil 4.7. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile GAPDH’ın mRNA ekspresyonu 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder, 2. kuyucuk P-H1299 kontrol, 3. kuyucuk P-H1299 IC ₅₀ katekol, 4. kuyucuk R-H1299 kontrol, 5. kuyucuk R-H1299 IC ₅₀ kontrol, 6. Kuyucuk Bj kontrol, 7. kuyucuk Bj IC ₅₀ katekol, 8. kuyucuk (-) kontrol	45
Şekil 4.8. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile PCNA’ın mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder, 2. kuyucuk P-H1299 kontrol, 3. Kuyucuk P-H1299 IC ₅₀ katekol, 4. kuyucuk R-H1299 kontrol, 5. kuyucuk R-H1299 IC ₅₀ katekol, 6. kuyucuk Bj kontrol, 7. Kuyucuk Bj IC ₅₀ katekol, 8. kuyucuk (-) kontrol	46
Şekil 4.9. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile Bax’ın mRNA ekspresyonu 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder, 2. kuyucuk P-H1299 kontrol, 3. Kuyucuk P-H1299 IC ₅₀ katekol, 4. kuyucuk R-H1299 kontrol, 5. kuyucuk R-H1299 IC ₅₀ katekol, 6. kuyucuk Bj kontrol, 7. Kuyucuk Bj IC ₅₀ katekol, 8. kuyucuk (-) kontrol	47
Şekil 4.10. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile Bcl-2’nin mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder, 2. kuyucuk P-H1299 kontrol, 3. kuyucuk P-H1299 IC ₅₀ katekol, 4. kuyucuk R-H1299 kontrol, 5. kuyucuk R-H1299 IC ₅₀ katekol, 6. kuyucuk Bj kontrol, 7. Kuyucuk Bj IC ₅₀ katekol, 8. kuyucuk (-) kontrol	48
Şekil 4.11. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile Siklin D1’in mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder, 2. kuyucuk P-H1299 kontrol, 3. Kuyucuk P-H1299 IC ₅₀ katekol, 4. kuyucuk R-H1299 kontrol, 5. kuyucuk R-H1299 IC ₅₀ katekol, 6. kuyucuk Bj kontrol, 7. kuyucuk Bj IC ₅₀ katekol, 8. kuyucuk (-) kontrol	49

Şekil 4.12. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile ATM'nin mRNA ekspresyonu.
1. kuyucuk 100 bp DNA ladder, 2. kuyucuk P-H1299 kontrol, 3. Kuyucuk P-H1299 IC₅₀ katekol, 4. kuyucuk R-H1299 kontrol, 5. kuyucuk R-H1299 IC₅₀ katekol, 6. kuyucuk Bj kontrol, 7. Kuyucuk Bj IC₅₀ katekol, 8. kuyucuk (-) kontrol 50

Şekil 4.13. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile ATR'nin mRNA ekspresyonu.
1. kuyucuk 100 bp DNA ladder, 2. kuyucuk P-H1299 kontrol, 3. Kuyucuk P-H1299 IC₅₀ katekol, 4. kuyucuk R-H1299 kontrol, 5. kuyucuk R-H1299 IC₅₀ katekol, 6. kuyucuk Bj kontrol, 7. Kuyucuk Bj IC₅₀ katekol, 8. kuyucuk (-) kontrol 52

Şekil 4.14. Tüm hücrelerin karşılaştırmalı PCNA, siklin D1, Bax, Bcl-2, ATM ve ATR mRNA ekspresyon seviyeleri..... 54



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Akciğer adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomlarda görülen temel moleküler değişiklikler	8
Çizelge 2.2. Katekolün genel özellikleri	10
Çizelge 2.3. Fenol ve türevlerinin dünyadaki üretim miktarı	11
Çizelge 4.1. Uygulanan epirubicin-HCl konsantrasyonları	35
Çizelge 4.2. Katekolün P-H1299 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	37
Çizelge 4.3. Katekolün R-H1299 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	39
Çizelge 4.4. Katekolün Bj hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	41
Çizelge 4.5. Katekol uygulanan P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde sitotoksik IC ₅₀ değerleri.....	42
Çizelge 4.6. Katekol uygulanan P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde kaspaz-3/7 enzim aktiviteleri.....	44
Çizelge 4.7. PCNA geninin mRNA ekspresyonunun hücreler arasındaki karşılaştırmalı değişim yüzdeleri.....	46
Çizelge 4.8. Bax geninin mRNA ekspresyonunun hücreler arasındaki karşılaştırmalı değişim yüzdeleri.....	48
Çizelge 4.9. Bcl-2 geninin mRNA ekspresyonunun hücreler arasındaki karşılaştırmalı değişim yüzdeleri.....	49
Çizelge 4.10. Siklin D1 geninin mRNA ekspresyonunun hücreler arasındaki karşılaştırmalı değişim yüzdeleri	50
Çizelge 4.11. ATM geninin mRNA ekspresyonunun hücreler arasındaki karşılaştırmalı değişim yüzdeleri.....	51
Çizelge 4.12. ATR geninin mRNA ekspresyonunun hücreler arasındaki karşılaştırmalı değişim yüzdeleri.....	52
Çizelge 4.13. RT-PCR ile analiz edilen mRNA ifade düzeylerinin Adobe CS4 programı ile ölçülen değerleri	53

1. GİRİŞ

2020 yılında Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın sonuçlarına göre, Dünya'da her yıl yaklaşık 14 milyon kişinin yakalandığı ve 8,2 milyon kişinin öldüğü bir hastalık nedeni olan kanser; tüm insanlığı olumsuz yönde etkilemektedir. Kanserdeki seyir aynı oranda artmaya devam ettiğinde, bu sayının 2030 yılında 22 milyon olması beklenmektedir (Anonim 1). Bu yüzden bilim insanları kanser tedavisinde yeni stratejiler belirlemekte ve mevcut antikanser ilaçlarının dışında kanser tedavisinde etkili olacak yeni bileşenleri araştırmaktadır.

Vanilik asit, gallik asit, kafeik asit gibi fenolik bileşenler ve katekol, kurkumin gibi aromatik hidrokarbonlar son günlerde çok çalışılan bileşenlerdendir. (Sitarek et al. 2017; He et al. 2016; Pelinson et al. 2019; Vazhappilly et al. 2021; Toptaş ve Ateş-Alagöz 2016) Aromatik bir hidrokarbon olan benzen, maligniteye neden olan bir kanserojen olmakla birlikte pek çok canlı grubunda bulunmaktadır (Moo Puc et al. 2015; Nair et al. 2009; Fan et al. 2007). Ayrıca katekolün içinde bulunduğu benzen metabolitleri 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (DOPA) gibi Parkinson tedavisinde kullanılan ilaçların yapısında da bulunmaktadır. Bir benzen türevi olan katekol $C_6H_4(OH)_2$ formülüne sahiptir ve renksiz bir bileşiktir. Birçok canlı grubunda doğal olarak da bulunan katekol, allelokimyasallar adı verilen bir sekonder metabolit grubuna dahildir. Allelokimyasallar grubu tedavi edici olarak üzerinde durulan kimyasallardır, çünkü doğal bileşikler olup biyolojik olarak doğada kolay çözünebilir olduklarından yarı ömürleri kısadır bu nedenle toksikolojik materyal olarak kullanımları sentetik bileşiklerden daha güvenli kabul edilmektedir (Vyvyan 2002).

Kanserde yeni tedavi yöntemlerinin araştırıldığı bu dönemde akciğer kanserinde çoklu sinyal yollarını hedefleyerek apoptozisi uyaran terapiler, umut verici olabilir ve ilaca dirençli kanser fenotipleriyle mücadeleye de geniş çapta katkı sağlayabilir. Apoptozisi uyaran bu sinyal yollarına intrinsik apoptotik yolun aktivasyonu, p53 aracılı DNA hasarı ve hücre döngüsü inhibisyonu örnek verilebilir. Kanser tedavisinde kullanılacak olan bileşenlerin kanser hücrelerinin proliferasyonu üzerine etkilerini açıklamak önem arz etmektedir.

Proapoptotik ve antiapoptotik mekanizma, kanser tedavisinde antikanser ajanlar tarafından düzenlenen içsel ve dışsal yolları içermektedir. Bu sinyal yollarında yer alan bir dizi kaspazın aktivasyonu, hücre ölümüyle sonuçlanan apoptotik sinyalleşmeyi başlatmaktadır (McIlwain et al. 2013). Bunların arasında hem içsel hem de dışsal apoptotik yolda aktive olan kaspaz-3 birçok antikanser ajanı tarafından hedeflenmekte ve hücre ölümünü modüle etmektedir (Razak et al. 2019; Silva et al. 2018). Ya mRNA düzeyinde ya da protein düzeyinde aktive edilmiş bir kaspaz-3, nükleozom parçalanmasıyla ilişkili olabilmektedir (Yoon et al. 2014).

Diğer bir sinyal yolu Bcl-2 ailesi proteinlerinin düzenlenmesiyle apoptozis sürecinde etkinlik göstermektedir. Bcl-2 ailesi proteinleri proapoptotik (BAX, BAK, BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, NOXA vb.) ve antiapoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1 vb.) proteinler olarak ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1 ve BFL-1 gibi antiapoptotik proteinler kanser dokularında yüksek oranda eksprese edilmektedir (Warren et al. 2019). Buna karşılık, Bax/Bak oligomerizasyonu gibi proapoptotik proteinlerin aktivasyonu, bu hücre tiplerinde mitokondriyal sitokrom c

salınımı ile ilişkilidir (Westphal et al. 2011). Bununla birlikte, çalışmalar, Bcl-2 ailesi proteinlerinin, mitokondriyal dış zar bütünlüğünü koruyarak hücre hayatta kalmasını teşvik edebildiğini göstermiştir (Carrington et al. 2017; Warren et al. 2019). MCL-1 ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin koordineli ifadesi, içsel yolu inhibe ederek kemorezistans ile sonuçlanır ve genellikle DNA hasarını ve hücre döngüsü ilerlemesini engellemektedir (García-Aranda et al. 2018). Bax/Bcl-2 oranının kanser hücrelerinde yüksek bulunması ise antikanser ilaçlarının kanser tedavisinde etkili olduğunu gösteren en önemli parametredir.

Apoptozis p53 aracılı DNA hasarı sinyal yoluyla da başlatılabilmekte ve bu sinyal yoluna ATM ve ATR yolakları aracılık etmektedir (George et al. 2019). ATM ve ATR yolakları, p53 geninin (tümör baskılayıcı gen) indüklenmesi ile aktive olur (Ramazan et al. 2020). p53 geni, dış uyaranlara/strese yanıt olarak DNA hasar tepkisi (DDR) mekanizmalarını aktive ederek apoptozu düzenlemektedir veya hasar seviyesi tamir edilebilir ise DNA onarım sürecini başlatabilmektedir (Siddiqui et al. 2020).

Siklinler ve sikline bağımlı kinazlar (Cdks) gibi hücre döngüsü kontrol noktası proteinleri de hücre döngüsü ilerlemesini düzenlediğinden apoptozise neden olan diğer bir sinyal yoludur (Gordon et al. 2018). Siklinlerin düzeyleri hücre döngüsü aşamasına göre farklılık gösterir. Siklinlerin yokluğunda inaktif bulunan CDK'lara siklinler bağlanarak aktif hale gelmektedir. Literatürde tanımlanmış birçok farklı siklin bulunmaktadır. Hücre döngüsünde öne çıkanlar ise D, E, A ve B'dir (Vermeulen et al. 2003). Regülasyonu bozulan bir siklin D1 geni onkogen haline dönüşür. Tümör hücrelerindeki yüksek siklin D1 seviyesi G1 fazında kısıtlamaya uğramadan hücrenin proliferasyonuna neden olabilmektedir (Suntur 2021). Bu nedenle, hücre döngüsünü durdurmayı hedefleyerek apoptozisi başlatmak antikanser ilaçları için önemli bir sinyal yoludur.

Tedavide yaygın olarak kullanılan kemoterapötiklerle tedavinin önündeki en büyük engel kanser hücrelerinin bu kemoterapötiklere direnç geliştirmesidir. Direnci aşmak için yüksek dozda uygulanan kemoterapötikler hem önemli yan etkilere neden olmakta hem de sağlıklı hücrelere zarar vermektedir. Bu nedenle yeni ve yan etkileri daha düşük olan antikanser ilaçlarının keşfine ihtiyaç duyulmaktadır. Erken tanı olasılığı düşük olduğu bilinen küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK)'nin mevcut kemoterapötiklere gösterdiği ilaç direnci nedeniyle, kanser hücrelerini apoptozise götüren çoklu sinyal yollarını aktif eden yeni kemoterapötik ilaçların araştırılmasına ve hangi apoptotik sinyal yolunun daha aktif olduğunun belirlmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Mevcut kemoterapötiklere karşı direnç geliştirmiş KHDAK tedavisi için yeni bir bitkisel kaynak olarak katekolün ilaca-direçli (R- H1299) akciğer kanseri hücrelerine uygulanması ve sonuçların parental hücreler ile karşılaştırılması bugüne kadar akciğer kanseri tedavisinin önünde büyük bir engel teşkil eden ilaç direnci mekanizmasının anlaşılmasına katkı sağlayabilir. Çalışmamızda katekolün hücreler (P-H1299, R-H1299 ve B_j) üzerindeki apoptotik etki mekanizması incelenmeden önce katekolün hücrelerdeki sitotoksik etkisi belirlenmiştir. Buna ek olarak DNA sentezi ve hücre proliferasyonun başlatılmasında önemli bir role sahip olduğu bilinen PCNA (prolifere hücre nükleer antijeni) geninin ifade düzeyi de ölçülerek katekolün sitotoksik etkisi gen düzeyinde de açıklanmıştır. Katekolün sitotoksik etki gösterdiği konsantrasyonda (IC₅₀)

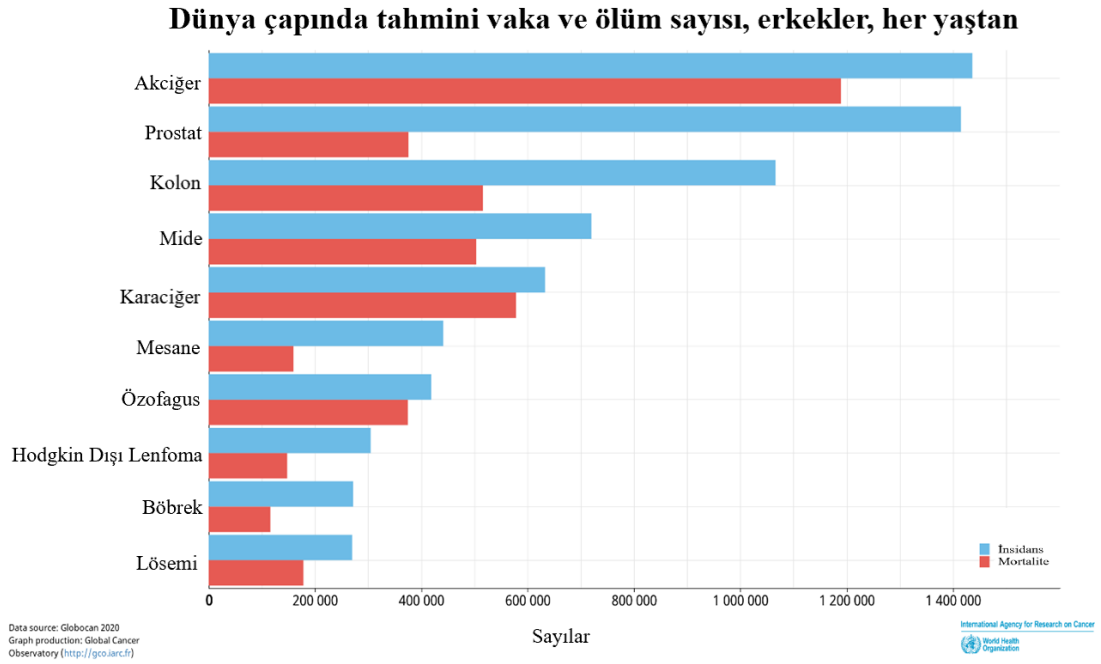
apoptozisi hangi sinyal yoluyla indüklediği; hücre döngüsü üzerine etkisini ortaya koymak için hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişinde aktive olan siklin 1 mRNA ekspresyonu, p53 aracılı DNA hasarının ortaya konulması için ATM ve ATR mRNA ekspresyonu, intrinsik apoptotik yolun aktivasyonunu ortaya koymak için ise pro-apoptotik bir gen olan Bax ile anti-apoptotik bir gen olan Bcl-2 mRNA oranlarındaki (Bax/Bcl-2) değişikliklerin belirlenmesinin yanı sıra apoptotik yol enzimlerinden biri olan kaspaz 3/7 enziminin aktivitesindeki değişiklikler ile belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada katekolün hücrelerde apoptozisi hangi sinyal yolu ile uyardığı ilgili genlerin mRNA ekspresyon düzeyleri karşılaştırılarak ortaya konulmuştur. Parental ve ilaca dirençli KHDAK hücrelerindeki mRNA ekspresyonundaki farklılıklar katekolün ilaç direnci üzerine etkisini açıklamıştır. Ayrıca katekolün sağlıklı fibroblast hücreleri üzerine apoptotik etkisini belirlemek için sağlıklı hücrelerin mRNA ekspresyon seviyeleri kanser hücrelerinden elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır.

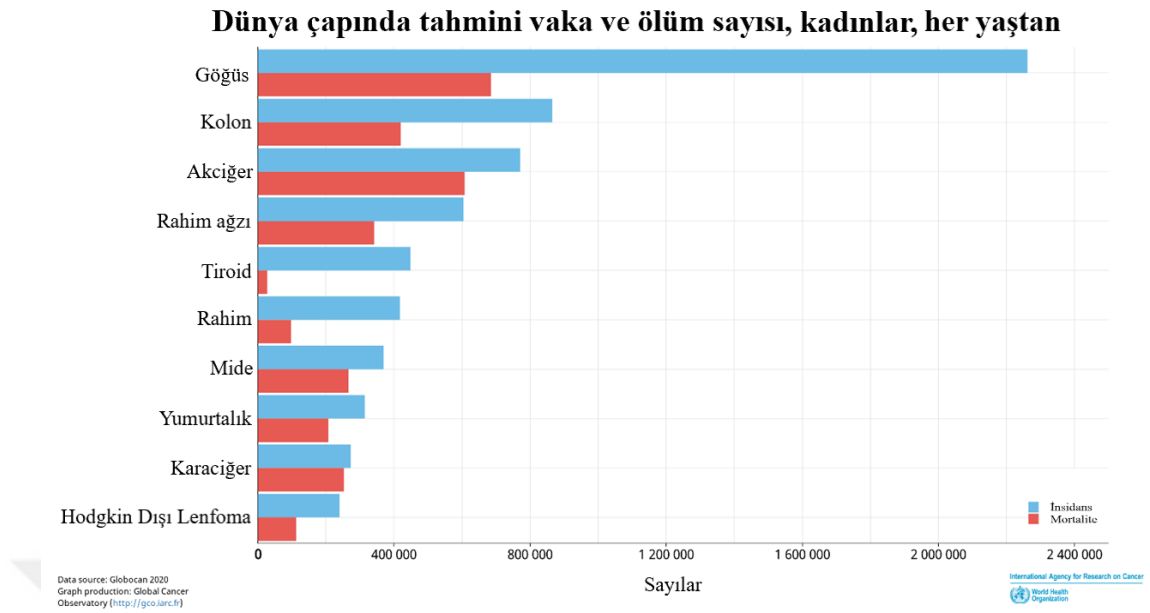
2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri dünyada kanser ölümlerinin başında yer almakta ve vaka oranları küresel olarak artış göstermektedir (Bade and Dela Cruz 2020). 2020 yılı GLOBOCAN (Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence) verilerine göre dünya çapında akciğer kanseri, erkeklerde toplam kanser vakalarının %14,3'ünü oluşturarak birinci, kadınlarda ise %8,4'ünü oluşturarak üçüncü sırada en çok görülen kanser türü olmuştur. Her iki cinsiyette kansere bağlı ölüm oranı %18,04'e yükselerek kanser nedenli ölümlerin ilk sıralarında yer almaktadır (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2). Ülkemizde ise akciğer kanseri, en çok görülen kanser türleri arasında erkeklerde %25,8 ile ilk sırada, kadınlarda ise %7 ile dördüncü sırada yer almaktadır (Anonymous 1). Akciğer kanseri hastalarında gözlenen yüksek mortalite, genellikle tanının ileri aşamada konulması sonucu tedavideki başarının düşüklüğüne dayandırılmaktadır. Hastaların yalnızca yaklaşık %15'i erken dönemde teşhis edilebilmektedir (Duruiseaux and Esteller 2018). 2018'de dünya genelinde 2,1 milyon yeni akciğer kanseri vakası ve 1,7 milyon ölüm rapor edilmiş ve bu, kansere bağlı ölümlerin yaklaşık %20'sini temsil etmektedir (Anonymous 1).



Şekil 2.1. 2020'de Dünya çapında erkeklerde görülen kanser insidansı ve ölüm oranları (Anonymous 1)



Şekil 2.2. 2020’de Dünya çapında kadınlarda görülen kanser insidansı ve ölüm oranları (Anonymous 1)

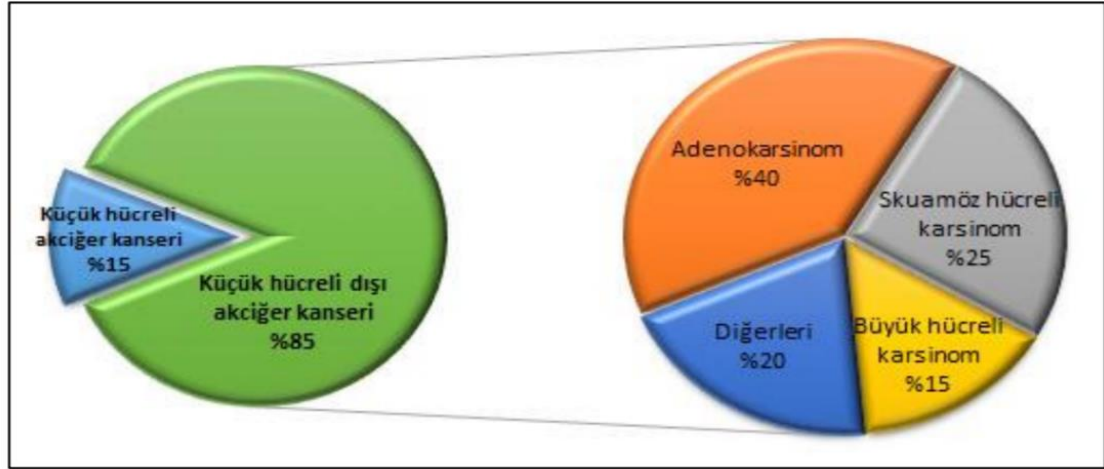
Etkili tanı ve tedavi stratejilerinin yetersizliği nedeniyle, akciğer kanserinin prognozu kötüdür ve 5 yıllık nispi sağkalım oranı %19’dur. Bugüne kadar, hedefe yönelik tedavi, radyoterapi ve kemoterapi akciğer kanseri tedavisi için en yaygın yöntemler olmuştur. Akciğer kanseri tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, hala ilaç direnci ve istenmeyen yan etkiler gibi birçok zorluk bulunmaktadır.

2015 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO), ülkelerin yarısından fazlasında (172’den 91’i) kanserin 70 yaşın altındaki bireyler arasında önde gelen ölüm nedeni olduğunu belirtmiştir (Anonymous 1).

2.1.1. Akciğer kanserinin histopatolojisi

Akciğer kanseri küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzere iki ana histolojik gruba ayrılmaktadır. KHDAK, tüm akciğer kanseri vakalarının %80-85’ini oluşturmaktadır (Inamura 2017), ve adenokarsinom (ADK), skuamöz hücreli karsinom (SHK) ve büyük hücreli karsinom olarak alt kategorilere (Şekil 2.3) ayrılmaktadır (Chen et al. 2014; Inamura 2017). KHDAK hastalarının yaklaşık %40’ına metastatik evrede teşhis konulmaktadır (Scheff and Schneider 2013; Hong et al. 2017). Bu sebeple, KHDAK’nin 5 yıllık sağkalım oranı %20-30’dur (Luo et al. 2019; Hong et al. 2017). Bu değer meme, prostat ve tiroid kanserleri gibi diğer kanser türleri için gözlemlenen değerden oldukça düşüktür (Hong et al. 2017). Yakın zamanda yapılan derinlemesine genomik ve moleküler analizler, KHDAK’nin hücresel, moleküler ve histolojik seviyelerde heterojen bir hastalık olduğunu göstermektedir (Chen et al. 2014; Inamura 2017; de Sousa and Carvalho 2018). Bu nedenle, KHDAK hastalarının kötü sağ kalımının nedeninin sadece ileri evrelerde geç tanı konmasına değil (Lemjabbar-Alaoui et al. 2015), aynı zamanda

hastalığın karmaşık biyolojisine de bağlı olduğu düşünülmektedir. Çalışmamızda kullanılan H1299 hücre hattı da KHDAK'nin adenokarsinom alt grubuna dahildir.



Şekil 2.3. Akciğer kanserinin histolojik sınıflandırması (Schabath and Cote 2019)

KHAK, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %15'ini oluşturur. Hızlı büyüme oranına sahip olması ve hastaların %70'inden fazlasına tanı sırasında metastatik hastalık tanısı konmasıyla KHDAK'den klinik olarak ayrılmaktadır. KHAK hücreleri, sinaptofiz ve kromogranin gibi nöroendokrin (NE) belirteçlerini ifade eder ve bunların akciğer epitelindeki NE hücrelerinden kaynak aldığı düşünülmektedir (Govindan et al. 2006). İlk olarak, akciğer kökenli bir tümör olarak nitelendirilmiş ve 1926'da "yulaf hücreli sarkom" olarak tanımlanmıştır (Barnard 1926). Aslında bir karsinoma olduğu çok daha sonra farkedilmiştir. KHAK, başlangıçta sitotoksik kemoterapiye son derece hassas olan bir kanser olarak tanınmıştır. Hatta yeterince sitotoksik tedavi ile metastatik kanserin iyileştirilebileceği düşünülmüştür. Ancak, etkin tedaviler geliştirebilmek adına otuz yılı aşkın süredir devam eden klinik çalışmalara rağmen KHAK'ların büyük çoğunluğu tedavi edilememektedir. Standart kemoterapi alan metastatik KHAK hastalarında, yirmi yılı aşkın süredir, ortalama genel sağkalım, son zamanlardaki randomize klinik çalışmalarda bile dokuz- on bir aylık bir aralıkla sınırlı kalmıştır (Farago and Keane 2018). KHAK'ın birincil nedeni, tütün sigarasıdır. Hastaların %95'inden fazlası hayatlarının bir döneminde sigara içenlerdir (Pesch et al. 2012). Sadece birkaç başka mesleki veya çevresel karsinojenin KHAK insidansında etkili olduğu belirtilmiştir. Bunlar, kimyasal üretimde kullanılan klorometil etere maruziyet ve uranyum madencilerinde rapor edildiği üzere yüksek düzeyde radon gazına maruziyet olarak belirtilmiştir (Churg 1994).

2.1.2. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde genetik ve moleküler değişiklikler

Tüm ekzon dizileme ve yeni nesil dizileme gibi moleküler tanı tekniklerindeki gelişmeler akciğer kanserinin moleküler yapısı hakkında çok önemli bilgiler sağlamıştır (Yohe and Thyagarajan 2017). KHDAK alanında son yıllarda yapılan genomik çalışmalar sayesinde, özellikle ADK'larda, çeşitli moleküler mutasyonlar keşfedilmiştir. Genetik değişikliklerin belirlenmesi spesifik mutasyonları hedefleyen moleküler terapilerin gelişmesini sağlayarak özellikle ilerlemiş akciğer kanseri olan bazı hastalar

için önemli sağkalım süresini attırmıştır. Ayrıca, bu çalışmalarda, hedeflenebilir mutasyonların türünde ve dolayısıyla kullanılan moleküler terapilerde ADK'lar ve SHK'lar arasında farklılıklar olduğu da belirlenmiştir (Lindeman et al. 2018).

ADK'lar, birden fazla mutasyon türü tarafından tanımlanan karmaşık bir genomik düzenlenme ile karakterizedirler. Yer değiştirme, ekleme, silme ve nokta mutasyonları dahil olmak üzere çeşitli tiplerdeki somatik değişikliklerin hepsinin ADK'nin karsinogenezinde rol oynadığı gösterilmiştir. Tümör proteini p53 (TP53) ve LDL reseptör ilişkili protein 1B (LRP1B) mutasyonları KHDAK'nin tüm alt tiplerinde yaygın olsa da ADK, SHK'ya kıyasla KRAS, EGFR, KEAP1, STK11, MET ve BRAF'ta daha yüksek somatik mutasyon oranlarına sahip olduğu görülmektedir. Bu genlerdeki mutasyonlar, öncelikle RAS-MEK-ERK ve PIK3CA-MTOR yollarını bozma eğilimindedir (Suster and Mino-Kenudson 2020).

SHK, ADK ile benzer moleküler özellikler gösterse de ADK'dan farklı moleküler değişiklikleri de bulundurmaktadır (Çizelge 2.1). The Cancer Genome Atlas tarafından yapılan kapsamlı çalışmalardan birinde, daha önceden yapılan çalışmaları da destekler nitelikte olup; TP53, HLA-A, NFE2L2, LRP1B, PIK3CA, CDKN2A, PTEN, KEAP1, MLL2, NOTCH1, RB1 ve PDYN'yi içeren çok sayıda tekrarlayan somatik mutasyonu tanımlamıştır (Heist et al. 2012). SHK'lar genellikle hedeflenebilir mutasyonları barındırmazlar, bu nedenle, tekrarlayan DDR mutasyonları ve FGFR1 amplifikasyonu potansiyel terapötik hedefler olarak bildirilmesine rağmen, tedavi algoritmalarını birincil olarak immünoterapi ve kemoterapiye yönlendirir. ADK ile karşılaştırıldığında, tekrarlayan gen mutasyonları SHK'larda daha az görülür. Ayrıca, SHK özellikle kromozom 3q26-3q29 bölgesinde daha sık amplifikasyon olayları gösterir. Sık kopya sayısı kazanımları veya amplifikasyonu olan bu bölgedeki genler arasında SOX2, PIK3-CA, TP63, MAPK ve diğerleri yer alır. SHK, ADK'ya kıyasla, CDKN2A ve CDKN2B genlerini içeren 9p21.3 kromozomunda daha yüksek bir kopya sayısı kaybı oranı gösterir (%27'ye karşı %11). Oksidatif stres tepkisi ve skuamöz farklılaşma ile ilişkili genlerdeki somatik mutasyonlar ve kopya sayısı değişiklikleri (sırasıyla; KEAP1 ve NFE2L2 mutasyonları, SOX2 ve TP63 kopya sayısı kazanımları), SHK'da sıklıkla görülmektedir. PI3K-RTK-RAS sinyal yolunda, SHK vakalarının %70'i kadarında düzensizliğe yol açan mutasyonlar (PTEN ve PIK3CA gibi) ve kopya sayısı değişiklikleri dâhil olmak üzere çeşitli değişiklikler görülebilir (Anonymous 2; Suster and Mino-Kenudson 2020).

Çizelge 2.1. Akciğer adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinomlarda görülen temel moleküler değişiklikler (Suster and Mino-Kenudson 2020)

Adenokarsinom		Skuamöz Hücreli Karsinom	
Mutasyona uğrayan genler	Kopya numarası değişen genler	Mutasyona uğrayan genler	Kopya numarası değişen genler
TP53	CDKN2A	TP53	SOX2
LRP1B	CDKN2B	LRP1B	DCUN1D1
KRAS	NKX2-1	KMT2D	KLH6
EGFR	TERT	KMT2C	PIK3CA
KEAP1	EGFR	CDKN2A	TBL1XR1
STK11	NFKBIA	NFE2L2	MAP3K13
PTPRD	FOXA1	RELN	PRKCI
SMARCA4	MYC	FAT4	MECOM
KMT2C	SDHA	FAT1	TERC
NF1	MET	PDE4DIP	ETV5
ATM	HER2	PIK3CQ	EIF4A2
ARID1A	Yeniden Düzenlenen genler	LRRK2	TP63
RELN		CPS1	LPP
ERBB4	ALK ROS1 RET NTRK NRG1	NF1	BCL6
SETD2		KEAP1	FGF12
BRAF		PTEN	TFRC
MET		RASA1	CDKN2A
CTNNB1		FGFR1	CDKN2B
HER2		DDR2	

2.1.3. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri klasik ve yeni tedavi yöntemleri

KHDAK hastaların yaklaşık %20-30'u tanı anında hastalığın I, II veya III evresindedir. Bu evrelerdeki hastalar genellikle cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi ile tedavi edilir. Ancak hastanın tedaviye yanıtı tahmin edilemez ve her zaman hastalığın tekrarlama olasılığı vardır (Smythe 2001; Parasciv et al. 2016). Evre III hastalığı olan hastalar için en uygun tedavi rejimi, platin bazlı kemoterapi ile radyoterapinin kombinasyonudur; IV. evrede ise tek başına kemoterapidir (Hopper-Borge and Wangari-Talbot 2014; Cagle et al. 2013). Platin bazlı ikili kemoterapi, ilerlemiş KHDAK için önemli bir tedavi seçeneğidir ve semptomları azaltmanın yanı sıra hastalıksız sağkalımı uzatmayı amaçlar (Tsvetkova and Goss 2012). Metastatik KHDAK hastaları için sisplatin ve karboplatin ile paklitaksel, docetaxel, gemsitabin ve vinorelbin gibi diğer geleneksel ilaçlarla kombinasyonu tercih edilmektedir (Yu et al. 2015). Bununla birlikte, kemoterapötik ilaçlara karşı geliştirilen içsel veya kazanılmış direnç nedeniyle, KHDAK hastalarında sağkalım oranları hala düşük kalmaktadır (Wongvaranon et al. 2013).

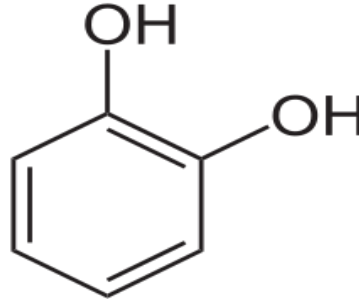
Kişiselleştirilmiş tıp ve omik çalışmalarına yönelik son gelişmeler, daha etkili kanser tedavi metodolojilerinin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır (Verma 2012). Örneğin, yeni moleküler hedefli tedaviler, tedavi sırasında KHDAK hastalarının genel sağkalım oranını arttırır. EGFR mutasyonları veya amplifikasyonu, ekinoderm mikrotübül-ilişkili protein-benzeri 4 geni ve anaplastik lenfoma kinaz geni (EML4-ALK) translokasyonu, Notch sinyal yolu aktivasyonu, proto-onkogen B-Raf (BRAF) mutasyonları, kirsten sıçan sarkom viral proto-onkogen (KRAS) ve fosfatidilinositol 3-kinaz, katalitik α polipeptidi (PI3KCA) gibi sıklıkla görülen moleküler biyobelirteçler, KHDAK tedavilerinde hedeflenebilir (Hopper-Borge and Wangari-Talbot 2014; Sun et al. 2015). KHDAK'nin moleküler biyolojik temelini çözmeyi amaçlayan çalışmalarda, EGFR'nin sık ekspresyonu ve aktivasyonunun, daha agresif bir KHDAK formunun gelişimi için kritik öneme sahip olduğu belirtilmektedir (Ghosh et al. 2012). EGFR'nin aşırı ekspresyonu, metastatik KHDAK'li hastaların %60'ından fazlasında meydana gelmiştir ve kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. EGFR'nin düzensizliği, malign hücre sağkalımında, proliferasyonda, anjiyogeneizde, invazyonda ve metastazda artışa yol açmıştır (Gazdar 2009). Bu nedenle EGFR'nin çeşitli alanlarını hedefleyen monoklonal antikolar geliştirilmiştir. Onaylı monoklonal antikolar, kimerik insan/murin monoklonal immüno globulin G1 antikoru olan setuksimab ve tamamen insan IgG2 monoklonal antikoru olan panitumumab EGFR'nin hücre dışı alanını hedefler (Sgambato et al. 2014). Küçük molekül inhibitörleri arasında ise afatinib, dakomitinib ve neratinib dahil olmak üzere geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz epidermal growth faktör reseptörü tirozin kinaz inhibitörleri (EGFR TKİ) metastatik KHDAK tedavisi için onaylanmıştır (Mahipal et al. 2014; Wang et al. 2016). EGFR mutasyonlarına sahip akciğer kanseri hücrelerinde, küçük moleküllü tersinir inhibitörler, EGFR hücre içi alanının tirozin kinaz bölgesine seçici olarak bağlanır. Bu bağlanma, EGFR'nin otofosforilasyonunda zayıflamaya ve PI3KCA/Akt/mTOR (fosfatidilinositol-3-kinaz/Protein Kinaz B/ rapamisinin memeli canlılardaki hedefi) ile RAS/RAF/MAPK (ras/raf/mitojenle aktive olan protein kinazın) sinyal iletimi yollarının önlenmesine neden olur. Sonuç olarak kanser hücrelerinde hücre proliferasyonu, hayatta kalma ve anjiyogeneizde azalmaya yol açar. Ek olarak, küçük moleküllü TKI'lerin bu bağlanması, kanser hücresinin kemoterapi ve radyoterapinin toksik etkilerine duyarlılığını artırarak apoptozu teşvik eder (Wang et al. 2016; Lopes et al. 2015).

2.2. Katekol

2.2.1. Katekolün kimyasal yapısı

Fenol türevi olan katekol $C_6H_4(OH)_2$ formülüne sahiptir (Şekil 2.4) ve renksiz bir bileşiktir. Bu bileşik doğada eser miktarda denilecek kadar oluşur. Yaygın adı katekol olarak bilinsede bileşik aynı zamanda pirokatekol, 1,2-dihidroksibenzen veya o-hidroksifenol olarak da bilinmektedir. Katekol bir benzen halkasına (C_6H_6) orto pozisyonunda iki tane hidroksil (OH) grubunun bağlanmasıyla oluşmaktadır. Amerika, İtalya ve İngiltere gibi ülkelerde katekol üretimi çok miktarda görülür. Bu bileşiğin kullanım alanları çoğunlukla, böcek ilacı üretimi, (%50), parfüm ve ilaç üretimi (%35-40) gibi alanlardır (Dou 1990; Mckey et al. 1997; Lewis 1993). İyon tayini için kimya laboratuvar çalışmalarında katekol kullanıldığı bilinmektedir. Buna ek olarak katekolün boya sektörü, ilaç üretim tesisleri ve kozmetik üretim merkezleri gibi birçok sanayinin atık suyunda da bulunduğu ve doğaya karıştığı bilinmektedir (Schweigert et al. 2001). Bu nedenle 1999 yılında Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IACR) tarafından

2B grubu kanserojen olarak sınıflandırılmıştır (Oikawa et al. 2001). Katekol, oldukça toksik olduğu bilinen fenol bileşiğinden daha toksik bir bileşiktir ve çok düşük derişimleri dahi alyuvarlara zarar verebilecek özelliktedir (Bukowska and Kowalaska 2004). Şekil 2.4'te katekolün moleküler yapısı, Çizelge 2.2'de ise katekolün kimyasal ve fiziksel özellikleri belirtilmiştir.



Şekil 2.4. Katekolün moleküler yapısı [$C_6H_4(OH)_2$] (Eroğul 2015)

Katekol, *Semecarpus anacardium*, *Bonellia macrocarpa* gibi bitkilerin yanı sıra soğan, elma ve zeytinyağında bulunmaktadır (Moo Puc et al. 2015; Nair et al. 2009). Katekol benzeri bileşikler hem sebze, meyve, kahve, çay gibi bitkilerde hem de hayvanlarda doğal olarak oluşur. Katekolün biyolojik sistemlerde adrenalin, noradrenalin ve dopaminden endojen olarak üretildiği de kanıtlanmıştır (Mansoor et al. 2010).

Çizelge 2.2. Katekolün genel özellikleri (Wojcieszynska et al. 2012)

Kimyasal Formülü	$C_6H_6O_2$
IUPAC ismi	Benzen-1,2-diol; pirokatekol; 1,2benzendiol; 2- hidroksifenol; 1,2-dihidroksibenzen; o-benzendiol; o-dihidroksibenzen
Yoğunluk (katı)	1,344 g/cm ³
CAS No	120-80-9
Molekül ağırlığı	110,1 g/mol
Görünüşü	Beyaz kristal şeklinde
Erime noktası	105°C
Kaynama noktası	245,5°C
Sudaki çözünürlülüğü	430 g/L

Ayrıca katekolünde içerisinde bulunduğu allelokimyasallar grubu tedavi edici olarak üzerinde durulan kimyasallardır, çünkü doğal bileşikler olup biyolojik olarak doğada kolay çözünebilir olduklarından yarı ömürleri kısadır bu nedenle toksikolojik materyal olarak kullanımları sentetik bileşiklerden daha güvenli kabul edilir (Vyvyan

2002). Fenolik allelokimyasalların istilacı mikroplara karşı savunma ajanları olarak ve patojenlerle bitki etkileşimlerinde sinyal molekülleri olarak işlev gördüğüne inanılır. Örneğin, fenolik bileşiklere ait allelokimyasallar katekol ve pirogallol bitkilerde şikimat yolu ile sentezlenir. Katekol, Kuiters ve Sarink (1986) tarafından çeşitli yaprak dökken (örneğin, kayın, huş, meşe, fındık, akçaağaç, söğüt, kavak), iğne yapraklı ağaçların (örneğin, ladin, köknar, karaçam), soğanın ve dış tabaka hücrelerinin içerisinde bulunur (Farkas and Kiraly 1962). Öte yandan pirogallol, bitki artıklarının/çöpünün önemli bir bozunma ürünüdür. Ek olarak hem katekol hem de pirogallol topraklarda en yaygın bulunan polifenollerdir ve genellikle hümkik benzeri polimerlerin sentezinin öncü molekülleridir (Inderjit et al. 1999).

2.2.2. Katekolün kullanım alanları

Katekol endüstriyel olarak bilinen ve üretilen bir fenol türevidir. Fenol ve türevlerinin dünyadaki üretim miktarları Çizelge 2.3'te verilmiştir.

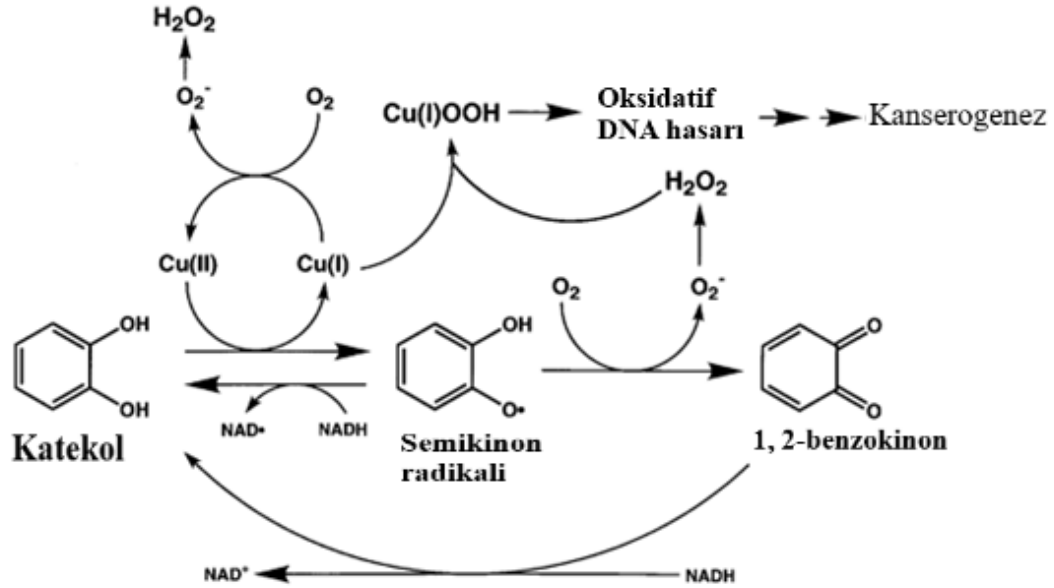
Çizelge 2.3. Fenol ve türevlerinin dünyadaki üretim miktarı (Varagnat and Poulenc 2005)

Fenol ve türevleri	Dünyadaki üretimi (ton)	Proses
Hidrokinon	45000-50000	Anilin oksidasyon Fenol hidroksilasyon
Resorsinol	30000-35000	p-diisopropil benzen Hidroperoksidasyon Benzendisulfonik asit Alkali füzyon
Katekol	25000-30000	m-diisopropil benzen Hidroperoksidasyon Fenol hidroksidasyon

Katekol kimya endüstrisinde topikal bir antiseptik reaktif olarak, patates tohumu üzerinde antifungal koruyucu olarak, kürk boyalarında ve fotoğraf teknolojisinde kullanılmaktadır (Suriguga et al. 2013; Schweigert et al. 2001). Katekol aynı zamanda çevresel hava kirleticisi olan benzenin bir metabolitidir. Bitkilerde doğal olarak da bulunan katekol, allelokimyasallar adı verilen bir sekonder metabolit grubuna dahildir. Patojenlerden veya diğer bitki türlerinden korunmak için salınan bu bileşikler antibakteriyel ve antifungal etkiler göstermektedir. Yapılan bir çalışmada toprak bakterilerine (*Pseudomonas pyecenealt*, *Pseudomonas putida* ve *Corynebacterium xerosis*) katekol uygulaması yapıldığında 5- 10 mM'lık konsantrasyonlarda antibiyotik etkileri olduğu görülmüştür. Yine aynı çalışmada soğandan elde edildiği belirtilen katekol bileşiğinin 5 mM'lık konsantrasyonu, toprakta yaygın olduğu bilinen *Fusarium oxysporum* ve *Penicillium italicum* mantar türleri üzerinde fungusit etkisi olduğu gösterilmiştir (Kocaçalışkan vd. 2006).

Hidrokinon ve katekol, havada oksidasyona uğrayarak semikinon radikalleri ve nihayetinde kinonlar oluşturan duman bileşenlerinin iyi bilinen örnekleridir (Şekil 2.5). Hem sigara katranının (ACT) sulu ekstraktlarında hem de canlı hücrelerde semikinon radikalleri ile moleküler oksijen arasındaki diğer reaksiyonlar, süperoksit radikali,

hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna yol açar (Stone et al. 1995).



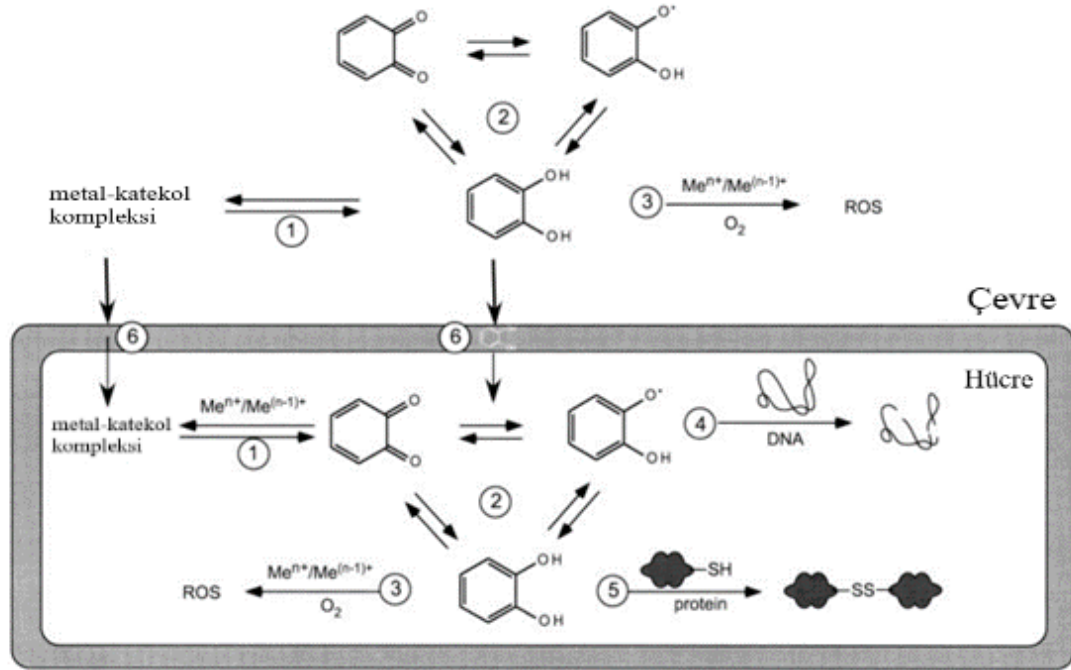
Şekil 2.5. Katekol, NADH ve Cu⁺ tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarının olası mekanizması (Oikawa et al. 2001)

In vitro testler, önemli miktarlarda hidrokinon, katekol ve mono- ve dihidroksibenzenler içeren ACT'nin DNA'ya zarar verebileceğini göstermiştir (Chouchane et al. 2006). Bununla birlikte, saf hidrokinon veya katekolün, ACT'nin herhangi bir izole fraksiyonu ile aynı seviyede serbest radikal oluşumu ve DNA hasarını indükleyebileceğini gösteren doğrudan bir kanıt yoktur.

2.2.3. Katekolün etki mekanizması

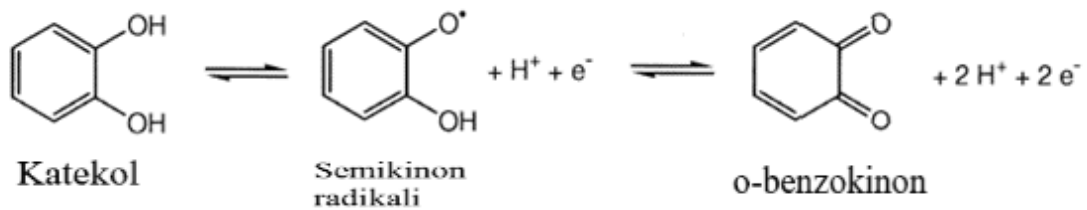
Katekoller, aromatik bileşiklerin ve ligninin mikroorganizmalar tarafından parçalanması ile ortaya çıkan ara ürünlerdir (Crawford 1981; van der Meer et al. 1992). İnsanlarda ve memelilerde, katekoller benzen veya östrojenlerin parçalanması sonucunda metabolitler (Porteous and Williams 1948; Bolton et al. 1998) veya nörotransmitterler olarak ve bunların öncüleri olan endojen bileşikler olarak ortaya çıkabilir [(adrenalin, noradrenalin, dopamin ve L-DOPA (L-3,4-dihidroksi fenilalanin)] (Horn et al. 1979). Ek olarak, katekoller tütün dumanı şeklinde (katekol, katekol semikinonları ve polimerize katekoller olarak) (Stone et al. 1995; Pryor et al. 1998) veya gıda bileşenleri (örneğin; katekol, dopamin, kafeik asit, çay kateşini) olarak alınabilir (Oshima 1965; Tressl et al. 1978; Hayakawa et al. 1997; Moran et al. 1997). 1950'de, memelilerde ve insanlarda benzen toksisitesinden benzen metabolitlerinin sorumlu olduğu öne sürülmüştür (Dustin 1950). Katekollerin mikroorganizmalar için toksisitesi geçmiş yıllarda gösterilmiştir (Fritz et al. 1992; Hellmer and Bolcsfoldi 1992; Capasso et al. 1995; Boyd et al. 1997). Birkaç çalışma ek olarak katekollerin su piresi, zebra balığı, alabalık, tavşan, kedi, sıçan, fare ve insan hücre dizileri için toksisitesini göstermiştir (Garton and Williams 1948; Hattula et al. 1981; Pellack-Walker et al. 1985;

Neilson et al. 1991; Svenson and Hynning 1997; Rahouti et al. 1999; Van Den Heuvel et al. 1999). Katekollerin çevre üzerindeki toksik konsantrasyonları bulunmuştur (Neilson et al. 1991; Capasso et al. 1995). Katekollerin her yerde bulunmasına ve toksisitelerinin çeşitli organizmalarda gözlenmesine rağmen, toksisiteye neden olan etki biçimleri uzun süre pek anlaşılamamıştır.



Şekil 2.6. Katekollerin çevredeki ve hücrelerdeki kimyasal reaksiyonları ve hücrelerdeki moleküler etki biçimleri. Kimyasal reaksiyonlar: 1, Ağır metallerle kompleks oluşumu; 2, Redoks döngüsü; 3, Ağır metaller ve oksijen ile reaksiyonda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi. Hücrelerdeki moleküler etki biçimleri: 4, DNA hasarı (örneğin, iplik kopmaları ve DNA eklenti oluşumu); 5, protein hasarı (örneğin, disülfid grupları aracılığıyla protein çapraz bağlanması); 6, membranlarda absorpsiyon ve olası etkileşimler (Schweigert et al. 2001)

Katekol ve semiquinon radikali arasında elektron transferinin gerçekleştiği (Şekil 2.7) bir denge potansiyeli rapor edilmiştir (Steenken and Neta 1979).



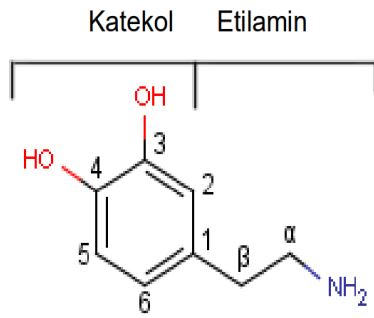
Şekil 2.7. Katekolün redoks döngüsü. Reaksiyonlar uygun koşullar altında ağır metaller tarafından katalize edilebilir (Schweigert et al. 2001)

Bitkilerde, hayvanlarda ve bakterilerde bulunan çeşitli enzimler, bakır içeren mantar lakkazı, süperoksit dismutaz, bazı hem grubu içeren peroksidazlar ve tirozinaz

gibi enzimler katekolün benzokinona oksidasyonunu katalize edebilir (Mason et al. 1961). Katekol, oksijen ve ağır metallerin varlığında veya enzimatik olarak oksitlendiğinde bir elektronunu moleküler oksijene aktarır ve bunun sonucunda süperoksit (O_2^-) oluşur. Ağır metallerin (örneğin bakır, demir) varlığında süperoksit ayrıca hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikallerine ($\cdot OH$) indirgenir. Bu reaktif oksijen türleri (ROS), elimine edilmedikleri takdirde hücreler ve organizmalar için zararlı olabilir (Mason et al. 1961; Schweigert et al. 2000).

2.2.4. Katekolaminler

Yapısında katekol bulunan ve canlı organizmalar tarafından üretilen, 3,4-dihidroksifenil çekirdeğine sahip aminler (Şekil 2.8), genel olarak katekolaminler diye adlandırılır ve 3,4-dihidroksifeniletılamin bileşiğinin türevlerinden oluşurlar (Nagatsu 1964). Katekolaminler olarak adlandırılan dopamin (DA), epinefrin (E) ve norepinefrinin (NE) üretim yerleri; beyin, adrenal medulla ve sinir hücreleridir (Fonseca and Bouloux 1993). Katekolaminler hem bitkilerde hem de hayvanlarda bulunurlar. Her biri kendine özgü biyolojik etkinliğe sahip olan katekolaminler dopamin, norepinefrin, epinefrin sıralamasına göre biyosentetik olarak sentezlenirler (Nagatsu 1964).



Şekil 2.8. Katekolaminlerin kimyasal yapısı (Çakal 2010)

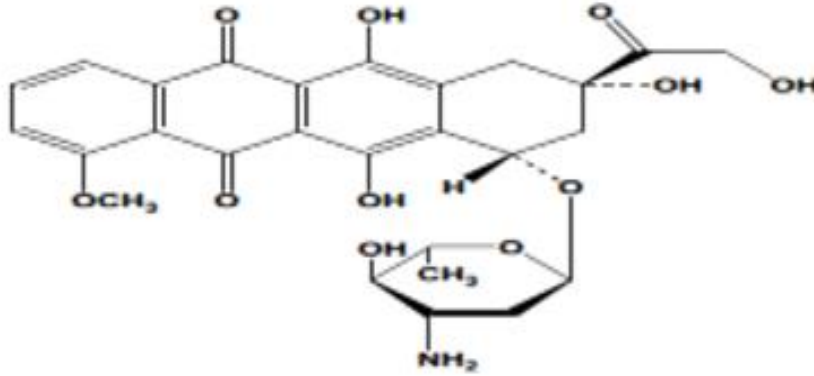
2.3. Epirubicin-HCl

Bir doxorubicin antrasiklin türevi olan epirubicin-HCl (4'epidoxorubicin), doxorubicinin 4' pozisyonunda bulunan hidroksil epimerizasyonu ile karakterizedir. Etki mekanizması doxorubicine benzer olan epirubicin-HCl'nin farklı olarak daha iyi bir terapotik endeksi vardır. Benzer dozlardaki hematolojik ve kardiyak toksisitesinin daha az olduğu görülmüştür.

2.3.1. Epirubicin-HCl'nin kimyasal yapısı

Epirubicin-HCl'nin tam kimyasal adı (8S-cis)-10-[(3-amino-2, 3, 6-trideoksi-a-Larabino-hekso piranosil) oksi] -7, 8, 9, 10-tetrahidro-6, 8,11-trihidroksi-8-(hidroksiasetil)-1-metoksi-5,12-naftasendion'dur (Şekil 2.9). Doxorubicinden C-4'pozisyonunda bulunan hidroksilin eksensel yeri dolayısıyla yapısal olarak farklılık gösterir. Molekül ağırlığı 579.98 g/mol'dür ve molekül formülü $C_{27}H_{29}NO_{11}$ şeklindedir (Hopkins 1983). Epirubicin-HCl kırmızı-turuncu renkte kristal şeklinde temin edilebilmektedir. Sulandırma işlemi yapılmamışsa buzdolabında ($+4^{\circ}C$) saklanabilir. Sulandırılan epirubicin-HCl'nin oda sıcaklığında ve ışıksız ortamda saklanması

uygundur. Gün ışığına maruziyet epirubicin-HCl'nin konsantrasyonunda %57'lik bir azalmaya, dondurup çözündürme işlemi ise %12'lik bir azalmaya neden olmaktadır (Twelves et al. 1992).



Şekil 2.9. Epirubicin-HCl'nin kimyasal yapısı (Ulakoğlu ve Altun 2004)

2.3.2. Epirubicin-HCl'nin etki mekanizması, farmakokinetiği ve antineoplastik aktivitesi

Sitotoksik etkisi doxorubicine benzer olan epirubicin-HCl nükleotit çiftleri arasında konumlanarak DNA'ya entegre olur ve nükleik asitlerin (DNA, RNA) dolayısıyla da protein sentezinin inhibisyonunu sağlar. Buna ek olarak epirubicin-HCl DNA-topoizomerez II'yi stabilize etme vasıtasıyla ligasyonu engeller. Bu durumda topoizomerez II çift iplik kırılmalarını indükler. Aynı zamanda epirubicin-HCl DNA'nın enzimatik olarak ipliklerinin ayrılmasını, yani DNA helikaz aktivitesi bloke ederek, transkripsiyon ve replikasyonu durdurur (Mays et al. 2010; Perry 2008).

Sitotoksik radikaller üreterek hücrede oksidasyon/redüksiyon olaylarına katılır. Yapılan çalışmalarda karaciğer (Hep-G2), akciğer (H1299) ve meme (MCF-7) kanseri hücre hatlarında epirubicin-HCl uygulamasından sonra antioksidan mekanizması (SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz) enzimlerinde yükselme olduğu görülmüştür (Ozkan vd. 2004; Ozkan ve Fışkın 2004; Ozkan 2007). Antrasiklin türevlerinin hücrelerde membran hasarına neden olduğu da bilinmektedir (Plumbridge and Brown 1978; Young et al. 1981). Hücre döngüsüne etkisi incelendiğinde S fazının durdurulmasında önemli bir etkisi olduğu gözlenmiştir. Ancak yüksek konsantrasyonda uygulanan epirubicin-HCl'nin hücre döngüsünü G2 fazının yanı sıra M fazında durdurduğu ortaya konulmuştur (Hill and Whelan 1982).

2.4. Apoptoz

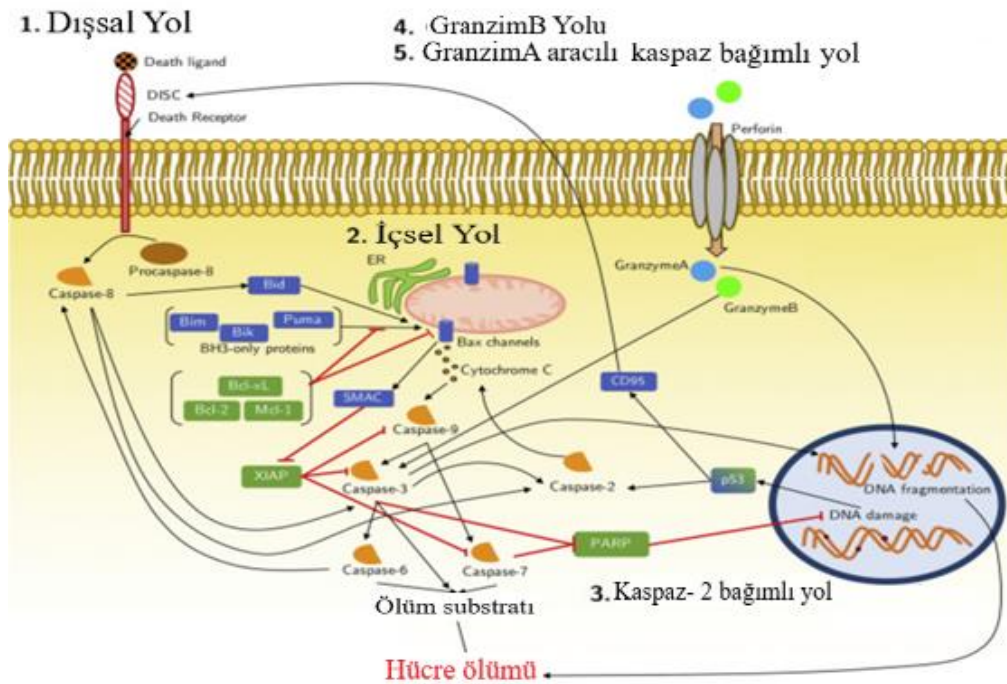
2.4.1. Apoptozun tanımlanması

Apoptoz; sözlük anlamı olarak bakıldığında yaprak dökümü anlamına gelmektedir (Wong et al. 2011). Hücrenin programlanmış ölümü olduğu bilinen bu süreçte, hücre içerisindeki proteinlerin yıkılması için proteolitik enzimlerin aktivasyonu ve DNA'nın yıkılması için DNazların aktivasyonu düzenlenmektedir (Cavalcante et al.

2019). Apoptoz kelimesi ilk kez Kerr ve arkadaşları tarafından 1972 yılında yayınlanan bir makalede hücre ölümünü tasvir etmek için kullanılmıştır (D'Arcy 2019). Ardı ardına gelen bir sinyal iletim yolu ve hücre içerisindeki proteinler aracılığıyla düzenlenen sistemli bir şekilde programlanan hücre ölümü çeşididir (Abotaleb et al. 2018). Dokulardaki gelişim sırasında ve yaşlanmada hücrelerin korunması ve homeostatik dengenin sağlanması için apoptotik mekanizma görev yapar. Bunun yanı sıra bağışıklık sistemi reaksiyonlarında da olabildiği gibi, hücreler bir hastalık etmeni veya zararlı maddeler nedeniyle zarara uğradığında bir savunma sistemi olarak meydana gelebilir (Elmore 2007). Düzensizliğinde kansere yol açabilen apoptoz dokuların homeostazını sağlamak için oldukça önemlidir (Mohana-Kumaran et al. 2014). Programlanmış hücre ölüm sisteminin bozulması durumunda apoptozun artması nörodejeneratif rahatsızlıklara yol açarken azalması durumu ise kanser ve otoimmün hastalıklara yol açmaktadır (Dinçel ve Kul 2016). İnsan vücudunun fizyolojik gelişiminde ve gelişimin ilkin evresi olan embriyonik dönemde apoptoz meydana gelmektedir (Celepli vd. 2020)

2.4.2. Apoptoz mekanizmaları

Apoptoz mekanizmaları, hücre içi moleküler kaskad sisteminin dahil olduğu karmaşık mekanizmalar olarak bilinirler (Elmore 2007). Apoptozisde 5 adet yolak olduğu bilinmektedir (Şekil 2.10). Bu yollardan en iyi aydınlatılmış olanları içsel (intrinsik) yolak ve dışsal (ekstrinsik) yollardır. İçsel yolağın aktivasyonu hipoksi ve metabolik stres yolu ile olmaktadır. Dışsal yolağın aktivasyonu ise Fas-L (ölüm ligandı) veya TNF α 'nın (tümör nekroz faktörü alfa) kaspaz-8'i indüklemesi ile başlar. Bu yollar dışında tümör baskılayıcı TP53 geni aracılığıyla aktive olan kaspaz-2 bağımlı yolak, kaspaz-3'ün indüklenmesi ile gerçekleşen granzim-B yolağı ve DNA'nın fragmente olmasının başlattığı granzim-A yolağıdır (Grilo and Mantalaris 2019).



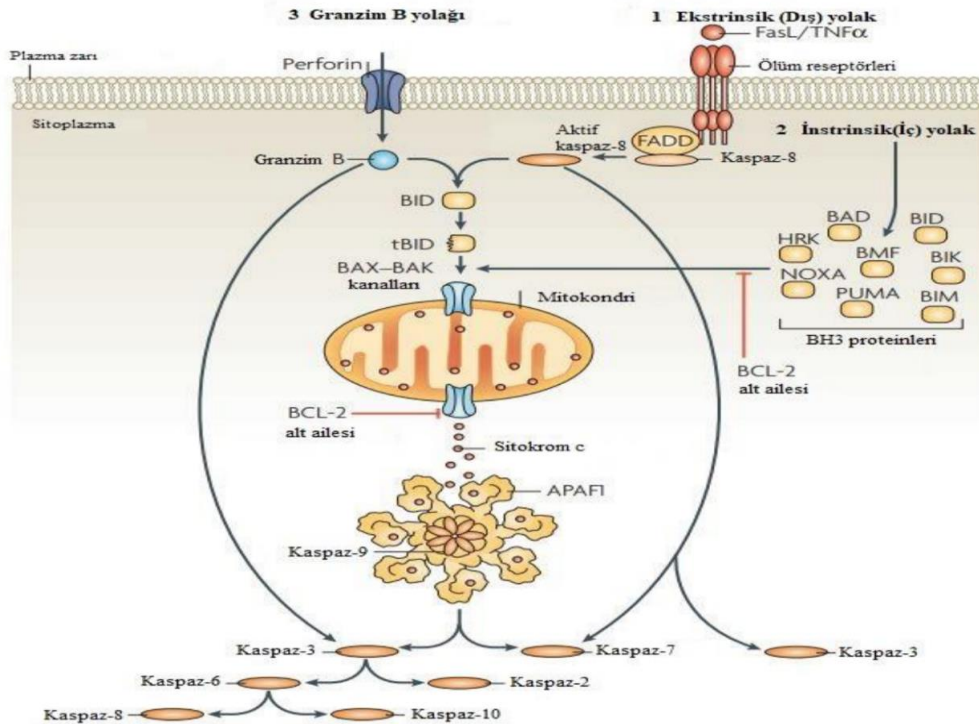
Şekil 2.10. Apoptozun beş ana yolağına genel bakış (Grilo and Mantalaris 2019)

Apoptozda, birçok mekanizma ve protein etkilidir ancak temel olarak kaspazlar (Caspase: Cyteinyl, aspartate-specific protease) adı verilen proteazlar tarafından programlı hücre ölümü gerçekleştirilir. Kaspazların ana hedefleri kinazlar, hücre iskeleti proteinleri ve transkripsiyon faktörleri gibi hayati önemi olan proteinlerdir. Kaspazlar, bu hedeflerin aspartat kalıntılarındaki protein yapılarını parçalayarak aktivasyon gösterirler (Matsuura et al. 2016).

2.4.3. Apoptozun moleküler düzenleyicileri

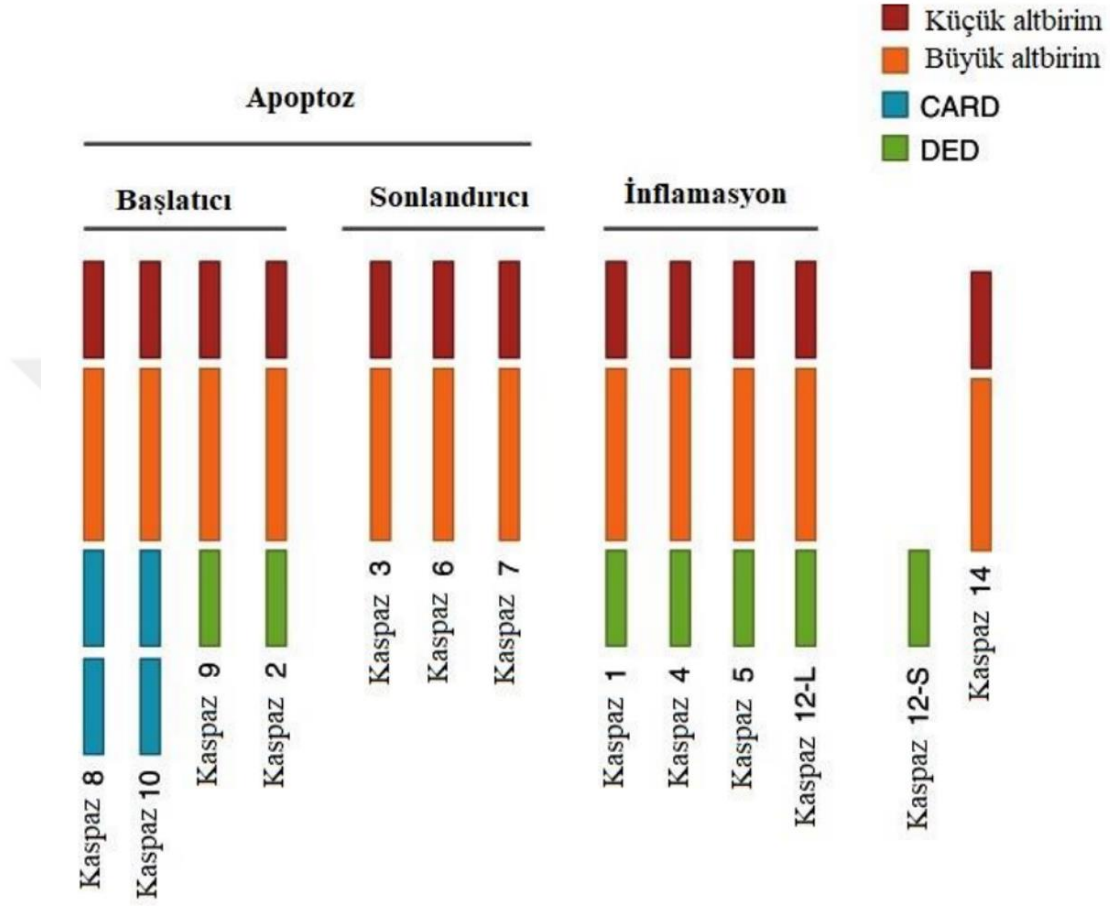
2.4.3.1. Kaspazlar

Sistein proteazlar olarak bilinen kaspazlar apoptotik yolun önemli proteinleridir. Kaspaz ailesine ait üyeler, apoptoziz süreçlerinde rollere sahiptir (Matsuura et al. 2016). Apoptozda görev yapan kaspazlar; başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9 ve -10), efektör kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) olmak üzere iki grup altında incelenmektedir (Shi 2002). Kaspazların tümü katalitik aktivite bakımında inaktif olan zimojenler yani prokaspazlar olarak hücre içerisinde bulunurlar bu nedenle apoptoz sırasında proteolitik olarak aktive olmalıdırlar (Şekil 2.11). Buna karşın başlatıcı kaspazlar, N-terminal proalanlarını içerdikleri için kendi kendilerini aktive edebilme özelliğine sahiptirler. Bu özelliğe sahip olan başlatıcı kaspazlar, efektör kaspazları da aktive etmektedirler (Shi 2002). Apoptoz ile ilişkili kaspaz aktivasyonuna giden üç ana yolak mevcuttur. Ayrıca perforin/granzim yolu ile efektör kaspazlarının direkt olarak indüklenmesi de mümkündür (Taylor et al. 2008).



Şekil 2.11. Kaspaz aktivasyonu yolları (Taylor et al. 2008)

Prodomain bölgeleri içeren başlatıcı kaspazlar, bu bölgeler sayesinde proteinlerin etkileşim alanlarını kodlayarak katalitik dimerizasyonu kolaylaştırırlar. Kaspaz-2 ve -9'da bulunan CARD (kaspaz alım alanı) ile kaspaz-8 ve -10'da bulunan DED bunlara örnek olarak verilebilir (Şekil 2.12). Kaspazlar için bu bölgeler etkileşim bölgeleridir. Kaspazların aktivasyon bölgeleri kendine özgüdür (McIlwain et al. 2013).



Şekil 2.12. İnsan kaspazlarının alan yapısı (McIlwain et al. 2013)

İlk aktive kaspaz proteini olan, bir prokaspaz olarak sentezlenen ve DISC kompleksinin oluşmasının ardından ortaya çıkan protein, kaspaz-8 tarafından sentezlenir. Aktifleşen kaspaz-8 apoptotik yolun seyrini belirlemektedir. Kaspaz-8 seviyesi artmışsa doğrudan kaspaz 3 indüklenir, ancak kaspaz-8 seviyesi düşükse önce sitokrom c mitokondriden salınır, BID indüklenir bu da kaspaz-9'u aktive eder ve bu yolla kaspaz-3 indüklenmiş olur. Sonuç olarak kaspaz-8'in işlevi öncelikle prokaspaz-3'ü ve diğer prokaspazları aktive etmek olarak bilinmektedir.

Kaspaz 8'in öncelikli işlevi kaspaz-3 başta olmak üzere prokaspazların aktive edilmesi olarak görülmektedir. Apoptozomlar ise kaspaz-3, -6, -7 gibi efektör kaspazların aktivasyonu için işlev görmektedir (Cavalcante et al. 2019).

Apoptozis sırasında kaspaz 3, CAD endonükleazı (kaspaz ile aktive olan DNaz) inhibitöründen (ICAD) ayırarak aktif hale getirir. Aktifleşen CAD enzimi DNA'nın kromozomal yapısını bozar, kromatinde yoğunlaşmaya neden olur ve hücre iskeletinin yıkımı ile apoptotik cisimlerin oluşmasını sağlar. Kaspaz 3'ün deregüle edilmesi yönündeki çalışmalar kolon kanserinde radyasyon ve kimyasallara olan maruziyet sonrasında kaspaz 3'ün tümörde metastaz ve invazyonu arttırdığını göstermiştir. Bu nedenle antikanser çalışmalarında kaspaz 3'ü hedeflemek metastaz ve tümör duyarlılığı konusunda önemli bir yaklaşım olabilecektir (Cavalcante et al. 2019).

2.4.3.2. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ailesi (B cell Lymphoma/leukemia-2) apoptozisin düzenlenmesinde hayati öneme sahip olan, antiapoptotik ve proapoptotik üyeleri bulunan bir protein ailesidir. Bcl-2 proteinleri sadece apoptozis sürecinden değil otofaji ve nekrozunda dahil olduğu temel hücre ölümünden sorumludur (Levine and Kroemer 2008). Kanser biyolojisinde önemli olan Bcl-2 geni keşfedilmiş ilk ölüm karşıtı genidir. Bu ailedeki proteinlerde 4 tane homoloji alanı vardır (BH1, 2, 3, 4). İnsanlardaki Bcl-2 proteinlerindeki Bcl-2, Bcl-xl, Mcl-1 ve Bcl-w antiapoptotik üyelerinde tüm homoloji alanları vardır. Ancak Bax ve Bak gibi proapoptotik üyelerinde BH4 bulunmaz (Reed 2006).

Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondri dış membranındaki c-terminal transmembran alanında bulunmaktadır. Bax ve Bak gibi proapoptotik üyeler mitokondride zar geçirgenliğini değiştirerek kaspazları indükleyen proteinlerin ya da hücre ölüm faktörlerinin salınmasına neden olurlar. Fakat antiapoptotik üyeler zar bütünlüğünü koruma eğilimindedir (Eskes et al. 2000; Chipuk and Green 2008). Birçok kanserde meydana geldiği bilinen proapoptotik faktörlerdeki mutasyonlar tümörlerin kontrolsüz büyümesine neden olur (Rampino et al. 2017). Ayrıca da Bcl-2 proteinin aşırı eksprese edilmesi ilaç direncini tetiklemektedir (Adams and Cory 2007). Yapılan çalışmalarda bu gen ailesi proteinlerini hedeflemek umut verici stratejiler arasındadır.

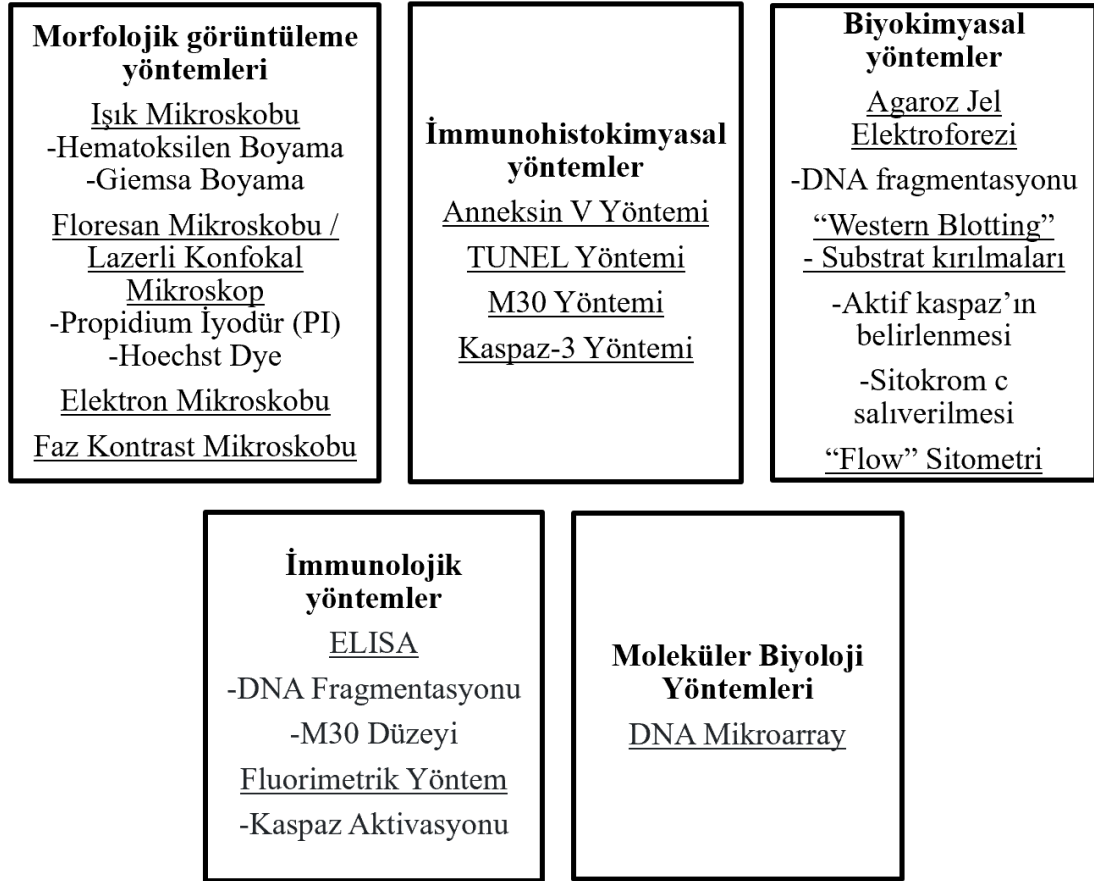
2.4.3.3. Bax

Mitokondri geçirgenliğinin temel sorumlu proteini olan Bax aynı zamanda bir proapoptotik proteindir (Wei et al. 2001). Sadece hücre ölümünde değil mitokondriyal disfonksiyonda da gereklidir. Hücre içerisindeki apoptotik sinyalleşmede önemli bir giriş noktası olarak karşımıza çıkmaktadır. İçsel yolun tetiklenmesiyle Bax proteinini Bax'ın aktivasyonunu sağlar. Oligomerize olan Bax proteinini mitokondriyal zarın geçirgen olmasını sağlar. Böylelikle sitokrom c ile Smac/DIABLO'nun mikondri sitozölüne geçmesine öncülük eder (Jurgensmeier et al. 2017). Apoptozom oluşumu sağlayan faktörler; prokaspaz, dATP, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf 1) ve sitokrom c'dir. Kaspaz 9'un aktive olmasını apoptozom sağlar (Li et al. 2015). Bu durumda hücre ölümü gerçekleşir. Bcl-2 ailesi üyeleri BH3 proteinlerini ayırır. Bax proteininin aktivasyonu ve mitokondriyal apoptozisini engeller (Cheng et al. 2001).

2.4.4. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Apoptoz, birden fazla noktada sıkı bir şekilde düzenlenmiş birbirini izleyen sinyalleşme zincirleri ile gerçekleşmektedir. Bu sinyalleşme zincirlerinin aktivatörleri, efektörleri ve düzenleyicileri aydınlatılmaya devam edildikçe, apoptotik hücreleri tespit

etmek ve saymak için çok sayıda apoptoz analizi geliştirilmektedir. Bununla birlikte, diğer bir hücre ölümü şekli olan nekroz ile apoptozun, pek çok özelliği benzerlik gösterdiği için hücre ölümünün apoptoz kaynaklı olduğunu kanıtlamak oldukça önemlidir. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan başlıca yöntemler aşağıda belirtildiği gibidir (Şekil 2.10) (Obeng 2020; Khodavirdipour et al. 2021)



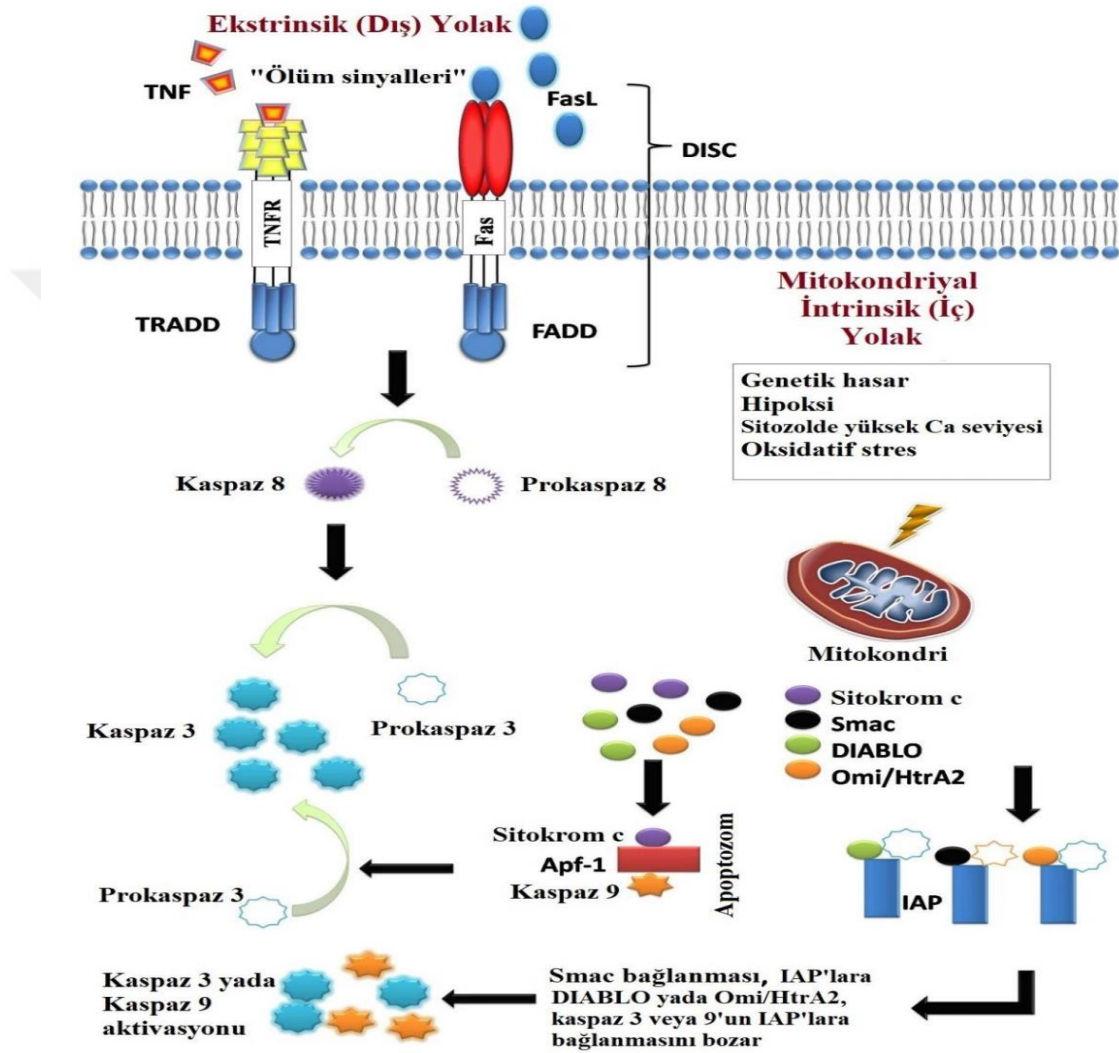
Şekil 2.13. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler (Obeng 2020; Khodavirdipour et al. 2021)

2.4.5. Apoptoz sürecinin içsel veya dışsal uyaranlara göre değerlendirilmesi

2.4.5.1. Dışsal yol (reseptör aracılı apoptoz)

Dışsal apoptotik yol (ekstrinsik yol) bağışıklık hücrelerinde (T lenfosit, doğal katil hücreler ve makrofajlar) eksprese edilen ölüm ligandlarının, hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla aktive olur (Şekil 2.14) (Choo et al. 2019). Ölüm reseptörleri, TNF (tümör nekroz faktörü) gen ailesini içermektedir. TNF ailesi üyeleri sisteince zengin olan ekstraselüler domain ile protein-protein etkileşim bölgesi olarak bilinen 80 aminoasitlik ölüm domainine sahiptir. En çok bilinen ölüm reseptörü TNFR1 (tip 1 TNF) ve bununla etkileşime giren FAS (Cd95 veya APO-1) proteindir. Bu reseptörlerin ligandları sırasıyla TNF α ve Fas ligandıdır (Wong 2011).

Dışsal yolun günümüze kadar en iyi tanımlanmış reseptör/ligandları FasL/FasR ve TNF α /TNFR1 olarak bilinmektedir. FADD ve TRADD adaptör protein olarak ölüm reseptörlerine alınır. Prokaspaz-8 ve -10'da bu adaptör proteinlere bağlanır. Bu durumda hücre ölümüne neden olacak olan sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Bu kompleks prokaspaz -8 ve -10'u aktif hale getirir. Aktifleşen kaspaz -8 ve -10, efektör kaspazları (kaspaz-3, -6, -7) indükler ve hücre içi proteinlerin ve hücre iskeletinin yıkımı başlatılmış olur (Pfeffer and Singh 2018).



Şekil 2.14. Apoptozun içsel ve dışsal yolları (Wong 2011)

2.4.5.2. İçsel yol (mitokondri aracılı apoptoz)

İçsel yolun (intrinsik yol) aktive olması için radyasyon kaynaklı genotoksik hasar, mitokondri kaynaklı hasar, yüksek mutajen maruziyeti, onkogenik hücre ölümleri, endoplazmik retikulum stresi gibi olayların olması gerekmektedir (Şekil 2.11) (Singh et al. 2019). Apoptozun içsel yolunda Bcl-2 ailesi proteinleri aktif rol oynamaktadır. Bu protein ailesinde antiapoptotik ve proapoptotik faktörler bulunmaktadır. Bu proteinler

apoptozis sürecinin kontrolünü sağlamaktadır. Bazı antiapoptotik proteinler Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, Bcl-W ve proapoptotik proteinler BAK, BAX, BID, BIM olarak sayılabilir

Bu aile üyeleri BH (B-2 homoloji bölgeleri) olarak bilinen, korunmuş sekanslar ile tanımlanmaktadır. Bcl-2 proteinleri, homoloji alanları (BH1, BH2, BH3, BH4) ile alfa sarmallarını içermektedir (Siddiqui et al. 2015). BH3 apoptozisten sorumlu alan olarak bilinmektedir (Flores-Romero and Garcia-Saez 2019).

Bcl-2 ailesi 3 gruba ayrılır, bu ayrım BH alanlarına göre yapılmaktadır.

1. Grup: Antiapoptotik aktivitesi olan Bcl-2 proteinleridir,

Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1 ve BFL-1/A1 bu grupta yer alır. BH alanlarının hepsini içeren bu proteinler BAX ve BAD gibi mitokondri zarında bulunmakta olan proapoptotik üyeleri inhibe ederek apoptozisi durdurmakla görevlidirler.

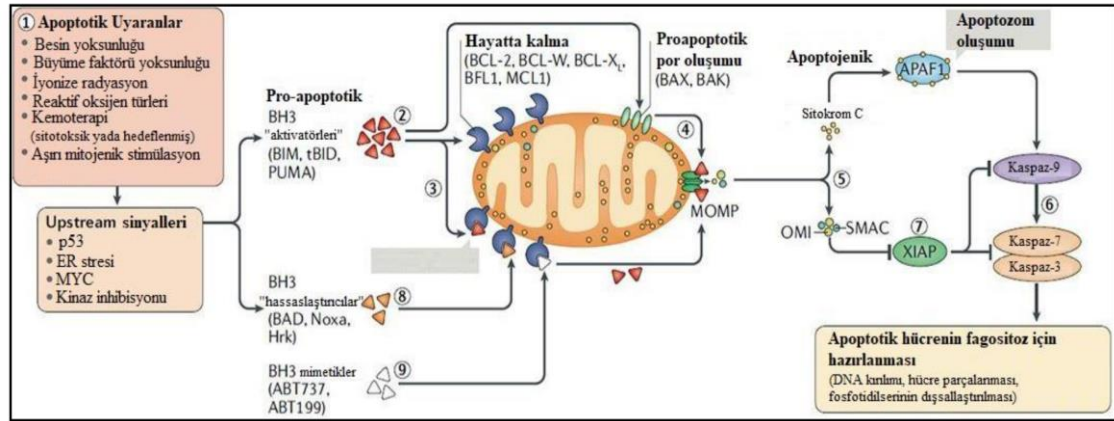
2. Grup: Proapoptotik aktivitesi olan Bcl-2 proteinleridir,

BAX, BAK, BCL2L9 bu grupta yer almaktadır. BH1, BH2, BH3 alanları bu grubun üzerinde bulunmaktadır. Bu gruptaki üyeler dış mitokondriyal membran geçirgenliğinin (MOMP) artmasına neden olur. MOMP artışı ile apoptozis faktörleri sitozol içerisine salınır.

3. Grup: Proapoptotik aktiviteye sahip olan ve sadece BH3 alanını içeren Bcl-2 proteinleridir,

BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, NOXA ve PUMA proteinleri bu grupta yer almaktadır. Direkt olarak BAX ve BAK ile etkileşime girer ve morfolojik değişikliğe neden olurlar. Bu gruptaki proteinler MOMP için önemlidir (Kale et al. 2018).

Mitokondrinin dış zarında bulunan BAK ve BAX proteinleri Apaf 1'e (Apoptotik proteaz aktive edici faktör) bağlanırlar. Hücrede hasar oluştuğunda Apaf 1 serbest hale geçer buna bağlı olarak MOMP artışı meydana gelir ve bu durumda sitokrom c sitozole salınır. Sitokrom c, Apaf 1 ve kaspaz-9'a bağlanarak bu molekülleri aktive eder. Aktive olan bu yapı ATP ile apoptozom oluşumunu sağlar ve kaspaz kaskadı başlamış olur (Şekil 2.15) (PenaBlanco and Garcia-Saez 2018). Dış mitokondri zarı 5 kDA büyüklüğüne kadar molekül geçişini sağlayabilmektedir. Ancak MOMP artışı ile 100 kDA'a kadar geçirgen hale gelir (Kalkavan and Green 2018). Mitokondri iç zarından sitoplazmaya geçebilen apoptoz faktörleri arasında AIF (Apoptozis İndükleyici faktör), Smac/DIABLO (Kaspazın 2. mitokondriyal aktivatörü), HtrA2/Omi (Serin proteaz Omi protein A2) bulunur. IAP (apoptozis protein inhibitörü) olarak bilinen ve kaspaz -3 ve -9'un aktivite olmasını engelleyen proteinleri bloke ederler (Wong 2011).

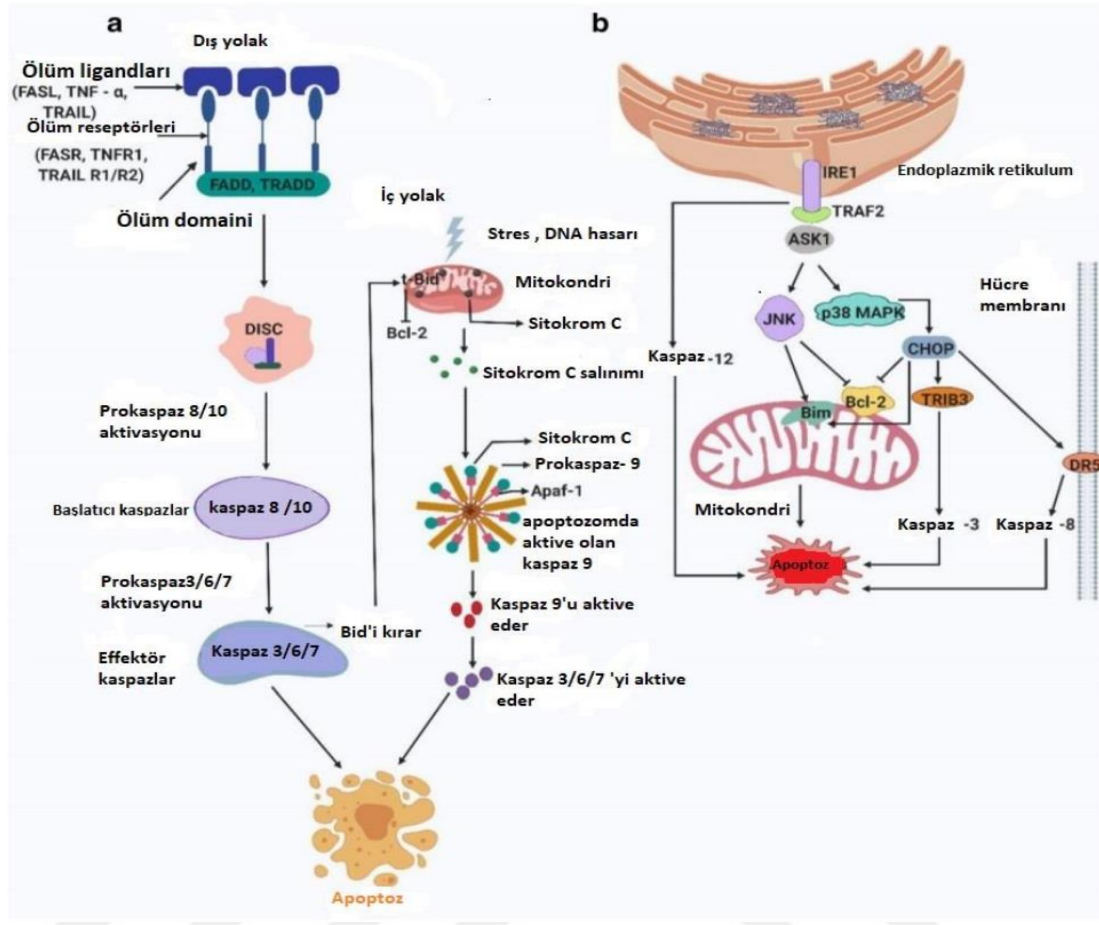


Şekil 2.15. İntrinsik apoptoz yolağı ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin etki mekanizması (Singh et al. 2019)

2.4.5.3. Endoplazmik retikulum aracılığı ile apoptoz

Hipoksi, açlık, enfeksiyon ve bazı kimyasallara (brefeldin-tunikamisin ve tapsigargin) maruziyet endoplazmik retikulum (ER) fonksiyonlarında değişikliklere neden olur bu durum hücre ölümüne sebebiyet verir (Iurlaro and Muñoz-Pinedo 2016). Hücre içi birçok süreç için kritik öneme sahip olan ER kalsiyum dengesinin düzenlenmesinde ve zar proteinlerinin katlanmasında görev almaktadır. Hücredeki kalsiyum seviyelerindeki artış ER zarında konumlanan prokaspaz-12'nin aktive olmasına ve sitoplazmaya geçmesine neden olur. Kaspaz 9 ile etkileşime girerek kaspaz kaskadını başlatırlar (Şekil 2.16).

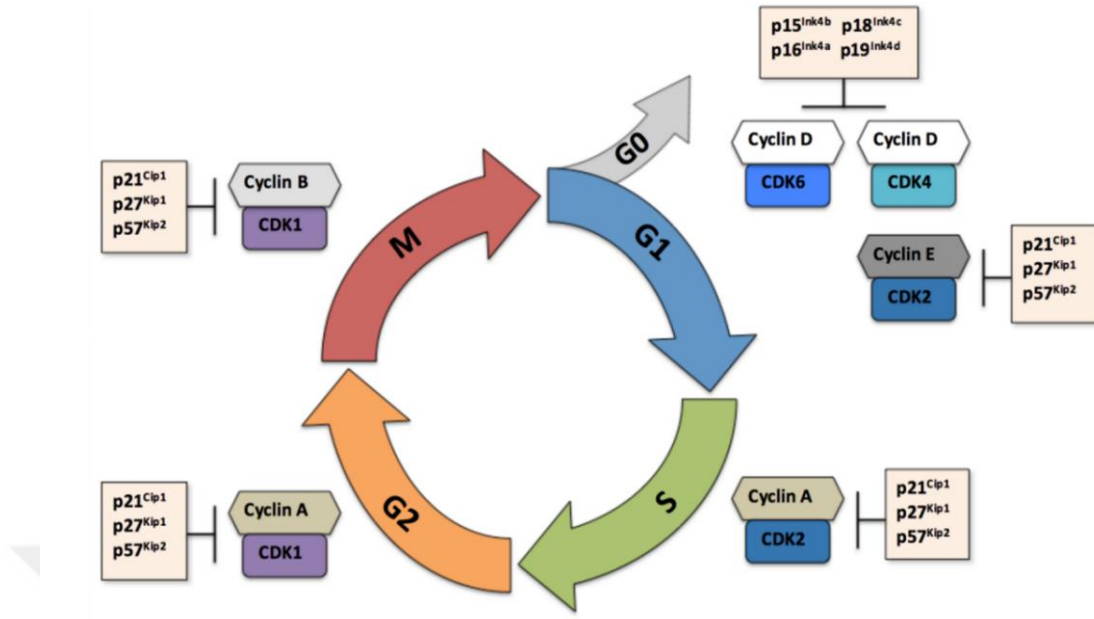
Kaspaz hedef noktaları; poli ADP riboz polimeraz (DNA hasarının tamirinden sorumlu), UIRNP (U1 ribonükleoprotein), DNA-bağımlı protein kinaz, nükleus membranının integritesini sağlayan laminler ve DNA fragmentasyon faktörü 45 adlı protein (DNA'nın parçalanmasına yol açan nükleazları inhibe eder), sterol düzenleyici element bağlayıcı protein (hücre içi kolesterol homeostazından sorumlu bir integral protein), retinoblastom geni (tümör baskılayıcı gen) ve Fodrin (hücre iskelet proteini) olarak özetlenebilir (Yüksel vd. 2008).



Şekil 2.16. Apoptozun üç ana yolu (Nirmala and Lopus 2020)

2.5. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü hücrenin bölünmesinin başlangıç ve bitişi arasında gerçekleşen morfolojik ve biyokimyasal süreçlerin tamamıdır (Sherr 2000). Hücrelerde 3 adet kontrol noktası bulunur. Kontrol noktaları hücre döngüsü fazları arasındaki geçişleri düzenler (Kastan and Bartek 2004). Hücre döngüsü evreleri (G1, S, G2, M), CDK (siklin bağımlı kinazlar) ve CK1 (siklin bağımlı kinaz inhibitörleri) tarafından kontrol edilmektedir (Kaldis et al. 1998; Mens and Ghanbari 2018).



Şekil 2.17. Hücre döngüsü düzenleyici faktörleri (URL-2) (Vermeulen et al. 2003)

2.5.1. Siklinler

Bir dizi protein ailesi olan siklinler hücre döngüsünün aşamalarını düzenleyen proteinlerdir (Heuvel and Harlow 1993). Siklinlerin düzeyleri hücre döngüsü aşamasına göre farklılık gösterir. Siklinler CDK'ları aktive ederler. Belirli aşamalarda sistemli olarak seviyeleri artar ve daha sonra düşer (Şekil 2.17) (Senderowicz and Sausville 2000). CDK'lar siklinlerin yokluğunda inaktif haldedirler. CDK komplekslerine siklinler bağlandığında aktivasyon gerçekleşir ve katalitik bölge 10.000 kat duyarlı hale gelir (Nelson and Cox 2005). Siklin sentezi transkripsiyonel olarak düzenlenirken, yıkımları ubiquitin yoluyla olur (Ulukaya 2001). Literatürde tanımlanmış birçok farklı siklin bulunmaktadır. Hücre döngüsünde öne çıkanlar ise D, E, A ve B'dir (Şekil 2.18) (Vermeulen et al. 2003).



Şekil 2.18. Siklinlerin hücre döngüsündeki ifade düzeyler (Vermeulen et al. 2003)

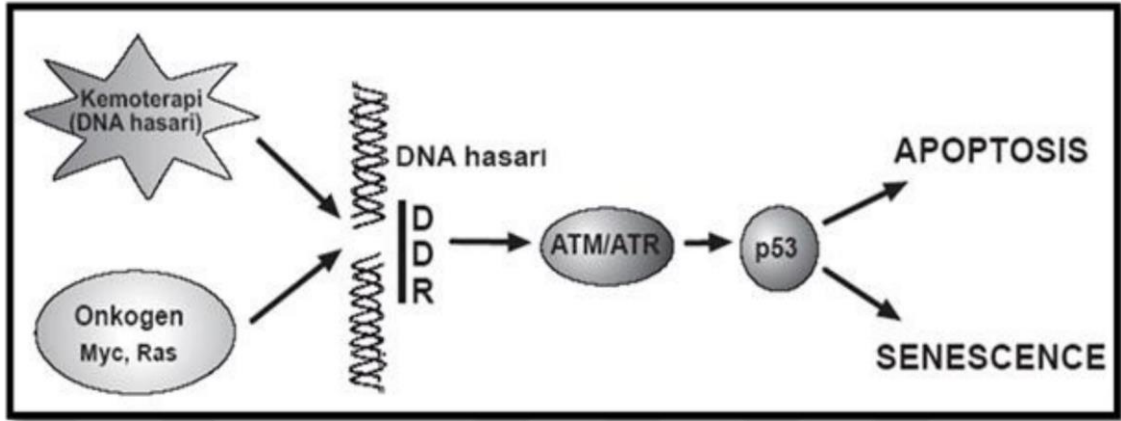
2.5.1.1.D tipi siklinler ve siklin D1

Bugüne kadar üç tip siklin D (D1, D2, D3) tanımlanmıştır. Hücre bölünmesi için ortamda mutlaka en az bir tip siklin D olmalıdır. Kromozom 11q13'te bulunan CCND1 geni, siklin D1'i kodlamaktadır. CDK4/6 ve siklin D1 mitojenik bir sensör işlevi görmektedir. Mitojenik sensörler D tipi siklin sentezinin artmasını sağlar. Regülasyonu bozulan bir siklin D1 geni onkogen haline dönüşür. Tümör hücrelerindeki yüksek siklin D1 seviyesi G1 fazında kısıtlamaya uğramadan hücrenin proliferasyonuna neden olur (Suntur 2021).

2.6. DNA Hasar Yanıtı (DDR)

DDR bir DNA hasar yanıt sistemidir. DNA'nın hasar görmesi ile aktive olur ve DNA tamirini düzenlemekten sorumludur. Bu sistemde amaç DNA'da meydana gelen hasarı tamir ederek genomik bütünlüğü korumaktır (Zannini et al. 2014). Hücrede aktive olan DDR hücre içi veya hücrelerarası sinyalleri ve enzimleri indükler. Bu indüksiyon DNA replikasyonunu, tamirini ve hücre döngüsünü düzenlemeye olanak tanır (Sun et al. 2017).

Eğer hasarın boyutuna bağlı olarak genomik bütünlük korunamayacak durumdaysa DDR Şekil 2.19'da görüldüğü gibi hücrenin apoptozis ya da senesens gibi alt mekanizmalarını aktive eder. Bu durumda tümör baskılayıcı bir bariyer işlevi görür (O'Connor 2015; Kang et al. 2015).



Şekil 2.19. DNA hasarı cevabı sinyal yolları (O'Connor 2015; Kang et al. 2015)

2.6.1. p53 geni

p53 proteini programlı hücre ölümünde ve hücre siklusu kontrolünde rol oynayarak hücrel düzenlemeye önemli katkılar sağlar. Tümörjenez oluşumunda p53 fonksiyon bozukluğu meydana gelirse genetik kararsızlık olabileceği gibi hücrelerin çoğalması durumu da söz konusu olabilir. Bilinen tüm maligniteler göz önüne alındığında hemen hemen yarısında p53 geni mutasyona uğramıştır. p53 geni antiapoptotik ve proapoptotik proteinlerle aktivasyona girebilir. Bcl-2 ekspresyonunda azalmaya ve Bax ekspresyonunda artışa neden olarak apoptozis sürecinin düzenlenmesini sağlar (Wang et al. 2013).

Tp53 (tümör baskılayıcı p53 geni) kanserojen olmayan normal hücre çekirdeklerinde görülen bir fosfoprotein olarak bilinmektedir. Primer olarak DNA hasarı nedeniyle indüklenen p53 apoptozise neden olabilir, hücre döngüsünü bloke edebilir ve bu sayede DNA onarımına zaman sağlar (Kastan et al. 1991). p53 geninin mutasyona uğraması durumunda kanser hücrelerinde proliferasyon kontrolsüz hale gelir. DNA onarım mekanizmasında kontrol sağlanmaz, bu sebeple de genetik olarak kararsız ve değişken hücreler meydana gelir (Soussi 2000). İnsan kanser tiplerinde nokta mutasyonuyla meydana gelmiş p53 hasarları sık gözlenir. Bunlara örnek olarak; akciğer, larinks, meme, mide, kolon ve beyin kanseri türleri verilebilir (Greenblatt et al. 1994).

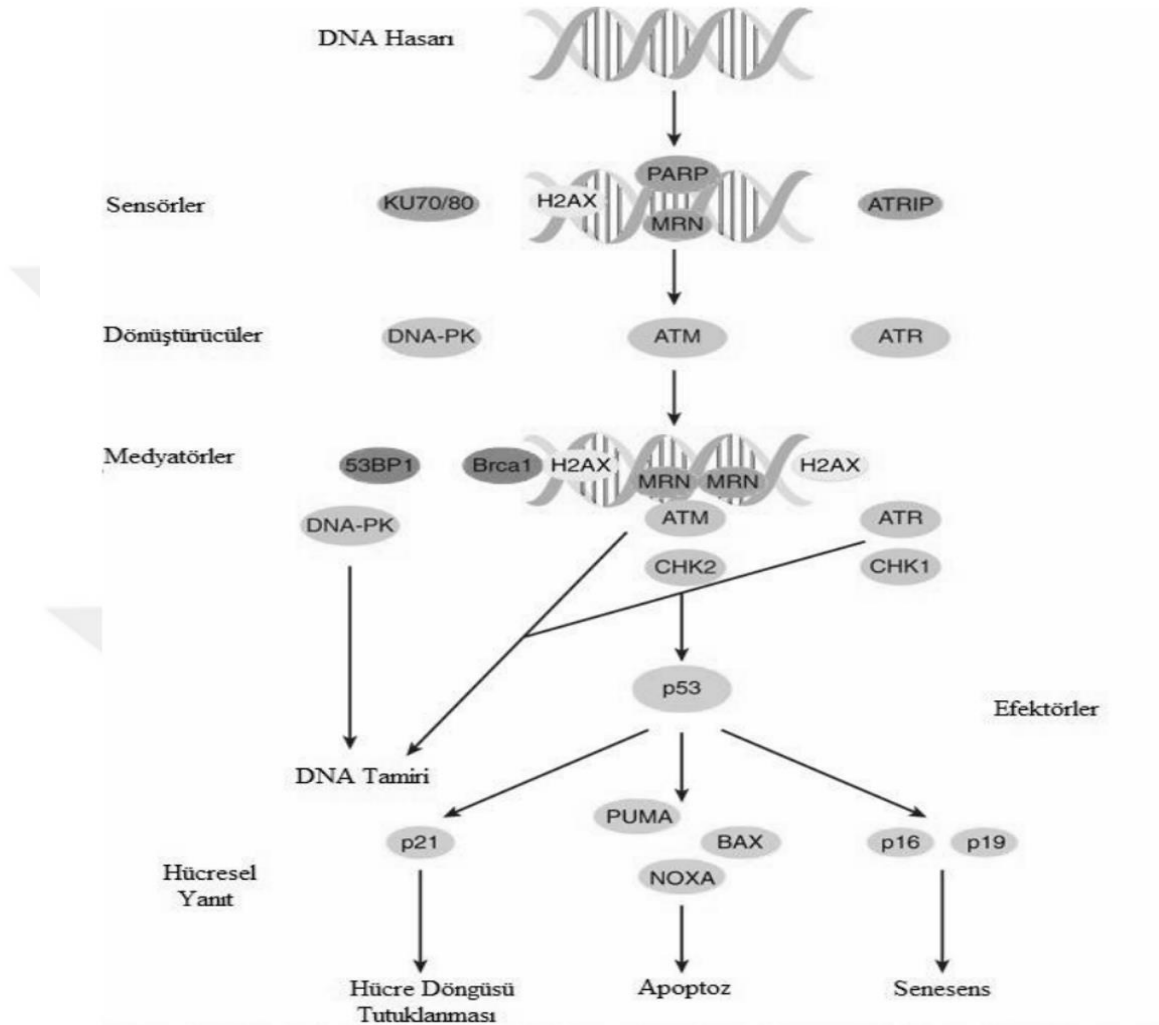
2.6.2. ATM ve ATR genleri

DNA hasarına karşı ökaryotik hücrelerde oluşturulan cevapta iki önemli kinaz enzimi bulunmaktadır. Bu enzimler ATM ve ATR genlerinin ürünüdür. ATM ve ATR'nin işlevleri çok yakındır. DNA'da oluşan hasarın çeşidine bağlı olarak ATM/ATR aktivasyonu meydana gelir. ATM, DNA'daki çift zincir kırıkları sonucunda aktive olurken, ATR ise DNA'daki tek zincir kırılmaları sonucunda aktive edilir (Macurek et al. 2013). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki serin/treonin kalıntılarında gerçekleşen fosforilasyon ve defosforilasyon olayları, DDR'deki etkileşimlerin, lokalizasyonun, stabilizasyonun ve enzimatik aktivitelerin düzenlenmesindeki esas faktördür (Shimada and Nakanishi 2013).

DDR'yi aktive eden tek zincir DNA kırığı oluşması sonucunda ATR/PI3K aktive olur. S482 kalıntısından otofosforilasyonunu gerçekleştiren ATR aktive olur

(Blackford and Jackson 2017; Olcina and Hammond 2014). Aktif ATR öncelikle hedeflerinden biri olan CHK1'i (kontrol noktası kinaz 1) aktifleştirir. Buna ek olarak ATRIP (ATR ilişkili protein) ve RPA (replikasyon proteini A) gibi birtakım proteinleri kontrol noktası aktivasyonu sırasında fosforile eder (Shimada and Nakanishi 2013).

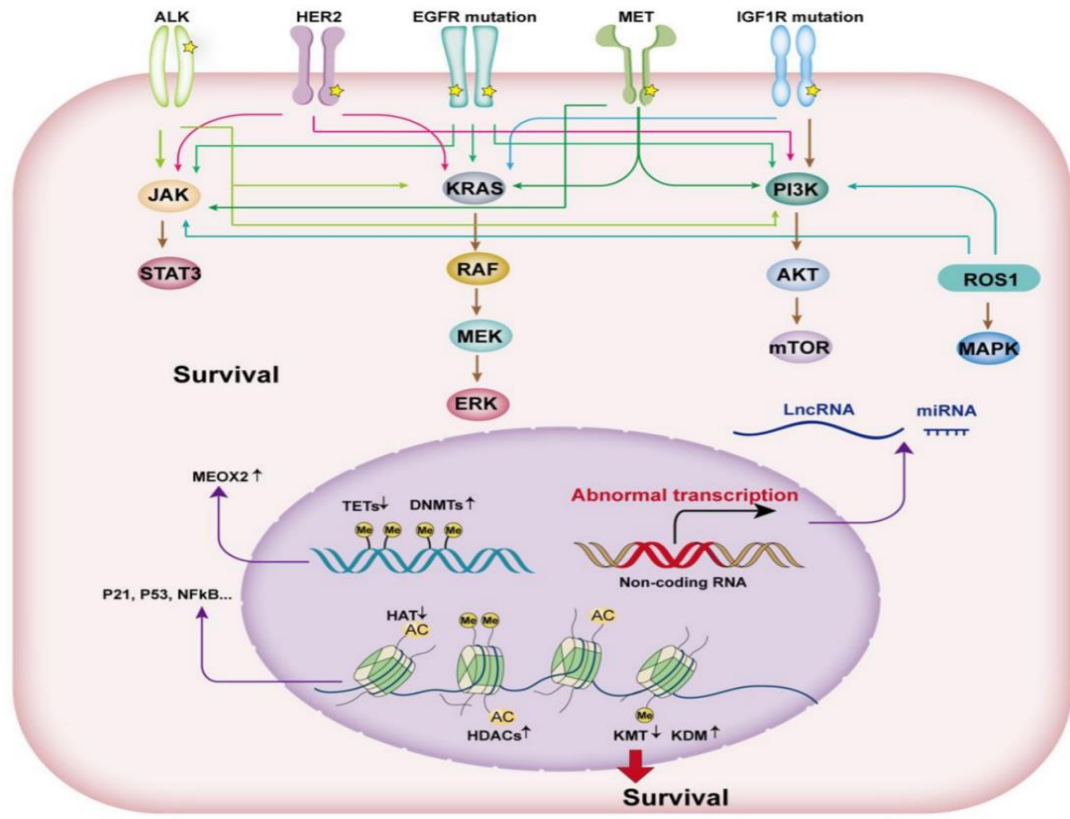
Böylece ATR'nin DDR düzenlemesinde genomik bütünlüğün korunması için önemli bir role sahip olduğu görülmektedir (Blackford and Jackson 2017).



Şekil 2.20. DNA hasarı cevabı elemanları ve rolleri (Weil 2018)

2.7. Akciğer Kanseri İlaç Direnç Mekanizmaları

Tümör hücrelerinin yüzey proteinlerindeki değişiklikler, ilaç direncinin ortaya çıkması ile yakından ilişkilidir (Westover et al. 2018). Yaygın olarak incelenen EGFR ve ALK'ya ek olarak, ROS1 mutasyonları, BRAF mutasyonları, RET mutasyonları ve çoklu onkogenik faktörlerdeki karşılıklı mutasyonlar gibi diğer birçok onkogenik faktörlerdeki değişiklikler de KHDAK'de yaygındır (Şekil 2.21) (Liu et al. 2020).



Şekil 2.21. KHDAC’de ilaç direnci ile ilişkili gen değişiklikleri (Liu et al. 2020)

Hücre kültürü sistemlerinde çoklu ilaç direnci, yalnızca bir ilaca maruz kalmasına rağmen, yapısal olarak ilgisiz bir dizi bileşiğe çapraz direnç gösteren tümör hücreleri tarafından sergilenen bir fenotiptir (Scagliotti et al. 1999).

Hücrel hedefer temelinde dört tip çoklu ilaç direnci mekanizması tanımlanmıştır bunlar; klasik çoklu ilaç direnci (MDR), P-glikoprotein olmayan MDR (MRP olarak da adlandırılır), göğüs kanseri direnci proteini (BRCP) ve akciğer direnciyle ilişkili proteinlerdir (LRP). Direncin ilk iki tipi sırasıyla, *mdr1* geni tarafından kodlanan 170 kDa’luk P-glikoproteini (PgP) ve *mrp1* geni tarafından kodlanan aynı zamanda MRP ailesinde tanımlanan ilk üye olan 190 kDa’luk MRP1 proteindir. PgP ve MRP1’nin taşıma proteinlerinin her ikisi de ATP bağlayıcı kaset (ABC) süper ailesine ait olmalarına rağmen yapıları, fizyolojik işlevleri ve muhtemelen etki mekanizmaları bakımından önemli ölçüde farklılık gösterirler. PgP, hücrelerden antikanser ajanlar da dahil olmak üzere toksinleri veya ksenobiyotikleri pompalayarak detoksifiye edici bir ajan olarak işlev görür. Doğal ürünlerden türetilen ve heterojen hidrofobik antitümör ilaç grubundan olan vinkristin, etoposid, doksurubisin ve irinotekan gibi ilaçlar PgP için iyi substratlardır (Seve and Dumontet 2005). Bununla birlikte, PgP’nin aşırı ekspresyonunun klinikte akciğer kanseri direncinde sadece küçük bir rolü olduğu görülmektedir. MRP1, çoklu ilaç direnci sergileyen hücre hatlarında keşfedilen 6,5 kilobazlık bir mRNA tarafından kodlanan bütünleşmiş bir membran fosfoglikoproteindir. İlaça duyarlı hücrelerin tam uzunlukta bir MRP1 cDNA ile transfeksiyonu, doksurubisin, vinkristin, etoposid, irinotekan ve kolşisine direnç kazandırmak için etkili bulunmuştur (Grant et al. 2014). MRP1’nin akciğer

kanserindeki klinik önemine ilişkin araştırmalar hala devam etmektedir. Yapılan bir çalışma, immünohistokimya ile tespit edilen MRP1 proteininin, 59 adenokarsinom örneğinden 28'inde yüksek oranda eksprese edildiğini göstermiştir. Buna karşılık, diğer kanser türlerinde MRP ekspresyonu daha düşük olarak gözlenmiştir (skuamöz hücreli ve büyük hücreli karsinomlarda %20'den az) (Sugawara et al. 2005).

BCRP, ilk olarak insan meme kanseri MCF 7/AdrVp-dirençli hücreden izole edilen başka bir ABC kaset yarı taşıyıcısıdır (Doyle, 1998). BCRP, mitoksantron, doksorubisin, topotekan ve irinotekan gibi topoizomera I (Topo I) inhibitörlerine karşı direnç sağlar (Kawabata et al. 2003).

Daha sonra keşfedilen bir gen olan LRP geninin, çoklu ilaca dirençli fenotip ile ilişkili olduğu görülmüştür (Scheffer et al. 2007). Bu gen, Major Vault Proteini (MVP) olarak da adlandırılan akciğer direnciyle ilişkili 110 kDA'luk bir proteini kodlar. Bu protein hücre zarında bulunup sitotoksik ilacı aktif olarak dışarı pompalamak yerine, esas olarak iç zarlarda bulunur ve sitoplazmik ilacın sitoplazmik veziküllere alınmasından sorumludur. Vezikül içine alınan ilaç, DNA zincir kırılmalarına neden olamaz ve ekzositoz yoluyla hücreden yavaşça dışarı atılır. Yapılan bir çalışma, LRP indüksiyon sistemi ve LRP'ye özgü ribozimler kullanarak, LRP'nin doksorubisin, vinkristin, VP-16 ve taksole karşı dirençte rol oynadığını göstermiştir (Kitozano et al. 2000). Başka bir çalışmada, immünohistokimya ile saptanan LRP ekspresyonunun, tedavi edilmemiş 87 KHDAK hastasında %45 oranında olduğu görülmüştür ve ekspresyon doksorubisine direnç ile korele bulunmuştur (Volm et al. 1997).

Belirli bir bileşiğe direnç kazanmak karmaşık ve çok faktörlüdür (Şekil 2.22). Sinerjik etkileşimlere sahip ilaç kombinasyonlarına karşı direnç daha da karmaşıktır. Bu nedenle, ilaç sitotoksitesinde ve ilaç etkileşimlerinde yer alan mekanizmaların daha iyi anlaşılması gerekmektedir (Seve and Dumontet 2005).

Platin Bileşiklerine Karşı Direnç			Mikrotübül Hedefli İlaçlara Direnç		
↑ DNA onarım kapasitesi ✓ ↑ ERCC1 ✓ ↓ MMR system ✓ ↑ DNA polymerase η	↑ İlaç Akışı ✓ ↑ ATP7A, ATP7B ✓ ↑ ABCC1/MRP1 ✓ ↑ ABCC3/MRP3	↓ İlaç alımı ✓ ↑ Extracellular pH ✓ ↓ CTR1 ✓ ↓ OCT1-3	↑ Mikrotübül değişikliği ✓ ↑ microtubule dynamics ✓ ↑ altered tubulin isotypes ✓ ↑ mutations in tubulin ✓ ↑ acetylation of tubulin	Diğer mekanizmalar ✓ ↑ EMT, Interaction with TME ✓ ↑ TM4SF1, MyD88, MCL1 ✓ ↓ Cav1, ING4, FBXW7 ✓ ↑ glycolysis, Notch signaling	MicroRNA Dirençli hücrelerde yukarı doğru düzenlenir/ İlaç direncini artırır miR-34c-5p, -181a, -135a, 197-3p Dirençli hücrelerde aşağı regüle edilir miR-16, -17-5p, 216b, -200b İlaç duyarlılığını artırma/ geri yükleme miR-30a-5p, -421, -107, -128, -137, -16, -17
↑ İlaç detoksifikasyonu ✓ ↑ Metallothionein 1H ✓ ↑ GSH, GST ✓ ↑ Nrf2	↑ Hayatta kalma sinyali ✓ ↑ EGFR, ↑ PI3K/Akt ✓ ↑ MAPK ✓ ↑ NF-κB, ↑ STAT3	Hücre Döngüsü Durdurulması Apoptozis ✓ ↑ Bcl-2, Bcl-X _L ✓ ↑ PIDD, ↑ Autophagy	↑ Hayatta kalma sinyali ✓ ↑ EGFR, ↑ PI3K/Akt ✓ ↑ Calpain, ↑ Statmin ✓ ↑ SphK1, ↑ IGF-1R	↑ İlaç akışı ✓ ↑ RLIP76 ✓ ↑ ABCB1/MDR1, ABCC3/ MRP3, ABCC10/MRP7	
↑ EMT / CSC ✓ ↑ EMT phenotype ✓ ↑ Wnt, Notch, Shh signaling	Kanser metabolizması ✓ ↑ PGC-1α ✓ ↑ glutamine metabolism ✓ ↓ glycolysis	MicroRNA Dirençli hücrelerde yukarı doğru düzenlenir/ İlaç direncini artırır miR-106a, -31, -15b, -27a, 223, 205, 92b, 224 Dirençli hücrelerde aşağı regüle edilir miR-101-3p, -101, -181, -589, -1244, -29c, -630, -197 Sisplatin duyarlılığını artırma/geri yükleme let-7c, miR-137, -138, -138-5p, -148b, -152, -182, -185-5p, -29a, -29b-3p, -34a, -513a-3p, -608	Pemetrexed Dirençli hücrelerde yukarı doğru düzenlenir/ İlaç direncini artırır UNG, TYMS, ABCC11/MRP8, UCHL1, CHK1, MHS2, EGFR pathway, Shh pathway EMT phenotype Dirençli hücrelerde aşağı regüle edilir SLC19A1	Gemcitabine Dirençli hücrelerde yukarı doğru düzenlenir/ İlaç direncini artırır TRIM22, RRM2, CYP3A5, EPHX1, ABCG6/MRP6, Metallothionein, Notch3, NF-κB, ERK/Akt signaling Autophagy, miR-222-3p Dirençli hücrelerde aşağı regüle edilir dCK, miR-363-3p	Etoposide Dirençli hücrelerde yukarı doğru düzenlenir/ İlaç direncini artırır ABCB1/MDR1/p-glycoprotein, TOP2A İlaç duyarlılığını artırma/ geri yükleme miR-129-5p
Epigenetik Regülasyon ✓ ↑ IGFBP3 promoter methylation ✓ ↓ FOXF1 promoter methylation ✓ ↑ KDM3B ✓ ↑ CLOCK, TIP60, PCAF	Tümör mikro çevresi ✓ ↑ Hypoxia ✓ ↑ CAF, TAM ✓ ↑ PD-L1				

Şekil 2.22. KHDAK tedavisinde genel olarak kullanılan kemoterapötik ajanlara direncin altında yatan mekanizmalar (Min and Lee 2021)

3. MATERYAL VE METOD

3.1. H1299 Hücrelerinin Çoğaltılması ve Dondurulması

Çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalından temin edilmiş olan H1299 (insan akciğer kanseri hücre hattı) kullanılmıştır. H1299 hücreleri 25 cm² ve 75 cm² 'lik flasklarda steril besiyerinde (%10 fetal bovin serum, %1 antibiyotik-antimikotik karışımı RPMI 1640 besiyeri) ve karbondioksit inkübatöründe (37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren) kültüre edilmiştir. Flasklardaki hücre yoğunluğu arttığında 2-3 günlük periyotlarda tripsinizasyon işlemi Tripsin-Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA) ile yapılmıştır. Flasklardaki hücreler kaldırıldıktan sonra süspansiyon santrifüj tüpüne alınarak 1000 xg'de 7 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen pellet süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra steril besiyerinde çözündürülüp flasklara bölünüm çoğaltılmaya devam edilmiştir. Bj (insan sağlıklı fibroblast hücre hattı) hücreleri üretilirken DMEM besiyeri kullanılmıştır ve amino asit takviyesi yapılmıştır. Diğer işlemlerin tamamı Bj hücrelerinde de aynı şekilde yapılmıştır. Çoğaltılan hücre hattının devamı ve daha sonra kullanılması için 1,5 ml hücre çözeltisi (%10 gliserol, %50 serum ve %40 serum içermeyen besiyeri) cryo tüplerde dondurularak -80°C'de saklanmıştır. Dirençli akciğer kanseri hücre hattı R-H1299, parental hücrelerin basamak basamak artan Epirubicin-HCl konsantrasyonlarına maruz bırakılarak elde edilmiştir. Elde edilen dirençli hücreler deneylerde kullanılmadan önce en az dört kez ilaçsız ortamda pasajlanarak üretilmiştir (Jansson et al. 1999; Kars vd. 2006; Ozkan 2007) Yapılan bütün deneylerde üstel büyüme fazındaki hücreler kullanılmıştır.

3.2. Çalışmalarda Kullanılan Katekol ve Epirubicin-HCl

Çalışmalar süresince kullanılan katekol, Sigma-Aldrich firması tarafından Pyrokatekol ticari adı ile üretilen 250 g'lık toz halinde satın alınmıştır. Dirençli hücrelerin üretilmesinde kullanılan Epirubicin-HCl, Calbiochem firmasından steril olarak temin edilmiştir.

3.3. Sitotoksikite Ölçümü

Hücreler tripsinize edilerek yapışmış oldukları flaskın yüzeyinden kaldırılmıştır. Hücrelerin, 96 kuyucuklu plaklara (96 well plate) aktarılması sırasında hücreleri saymak için Tripkan mavisi (1/1 oranında) testi uygulanmıştır. Boyayı almayan canlı hücrelerin sayılması metoduna dayanarak hemositometre lamında ml başına düşen hücre sayısı hesaplanmıştır. Her kuyucuğa 1x10⁴ hücre düşecek şekilde 200 µl'lik süspanse hücre plaklara (96 well plate) dağıtılmıştır. Kuyucuklardaki hücrelerin üzerine eklenen besiyeri 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra yenisi ile değiştirilmiştir. 20-400 µg/ml aralığındaki konsantrasyonlarda hazırlanan katekol hücrelerin olduğu kuyucuklara eklenmiştir. Hücreler katekolün farklı konsantrasyonlarına 37°C'de 24 saat maruz bırakılmıştır. Cell Titer-Blue® Cell viability assay kiti kullanılarak hücrelerin canlılığı ölçülmüştür. Kullanılan kitin çalışma prensibi canlı hücrelerin metabolizması sayesinde resozurin adlı bileşiği floresan ışığa yapan resorufine dönüştürmesi metoduna dayanmaktadır. Metabolik kapasitesini kaybetmiş olan ölü hücreler floresan ışığa yapan ürünü oluşturamazlar.

Kaspaz 3/7 aktivite ölçümü için ‘ApoTox-Glo™ Triplex Assay’ kitinin içeriğini kaspase-Glo® 3/7 tamponu (10 ml) ve bir şişe kaspase-Glo® 3/7 substratı (liyofilize) oluşturmaktadır. Kaspase-Glo® 3/7 tamponu, kaspase-Glo® 3/7 substratı içeren şişeye aktarılmıştır. Şişe birkaç kez ters düz yapılarak substratların tamamen çözülmesi sağlanmıştır ve böylece Kaspase-Glo® 3/7 reaktifi oluşturulmuştur. 96 kuyucuklu plaklara (96 well plate), her kuyuya 1×10^4 hücre olacak şekilde 100 µl hücre süspansiyonu dağıtılmıştır. 24 saat 37°C’da inkübasyon sonrası kuyucuklarda kullanılan besiyerleri atılarak, katekol hücrelere uygulanmıştır. Katekolün uygulandığı hücreler ile sadece besiyerinin uygulandığı kontrol grubu hücreleri 72 saat inkübe edilmişlerdir. 72 saatin sonunda 100 µl Kaspase-Glo® 3/7 reaktifi eklenmiş ve 30 saniye kadar pipetasyon yapılmıştır. Bir saat oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Bir saatin sonunda, apoptozun belirteci olan kaspaz aktivasyonu, luminesans ölçülerek belirlenmiştir (Cummings and Schnellmann 2002). Deneyler beş tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.5. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

3.5.1. mRNA izolasyonu

Hücreler 24 saat IC₅₀ katekole maruz bırakıldıktan sonra “RNeasy Mini Kit” (Qiagen) kullanılarak mesajcı RNA (mRNA) izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Buna göre katekol uygulaması yapılan ve sadece besiyeri uygulanmış kontrol grubu hücreleri tripsinlenerek alınmıştır. Örneklerin üzerine hücreleri parçalamak için ‘guanidin tiosiyanat içeren RTL’ tamponundan 350 µl eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra hücreler bir dakika vortekslenerek homojenize edilmişlerdir. Homojenize edilmiş lizata 350 µl %70’lik etanol eklenmiştir ve pipetlenerek iyice karışması sağlanmıştır. Bu aşamada santrifüj kullanılmamasına dikkat edilmiştir. 2 ml’lik toplama tüplerine yerleştirilmiş RNeasy Mini spin kolumlarına bir önceki aşamadaki karışımdan 700 µl konulup santrifüjde 11,000 rpm’de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Aynı RNeasy Mini spin kolumlarına 700 µl etanol içeren ‘RW1’ tamponu eklenip santrifüjde 11,000 rpm’de 15 saniye santrifüj edilmiştir. 500 µl ‘RPE’ konulup santrifüjde 11,000 rpm’de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Tekrar 500 µl RPE konulup santrifüjde 11,000 rpm’de 2 dakika herhangi bir solüsyon artığı kalmayana kadar santrifüj edilmiştir. RNeasy Mini spin kolumları 1.5 ml’lik ependorf tüplerine yerleştirilmiştir. Üzerine 30 µl RNA’se-free su ilave edilip santrifüjde 11,000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir ve bu basamak tekrarlanmıştır. Elde edilen mRNA örnekleri -30°C’de muhafaza edilmiştir.

3.5.2. cDNA sentezi

İzole edilen mRNA’lar ‘Titan One Tube RT-PCR System Kit’ (Roche Applied Science) kullanılarak komplementer DNA (cDNA) haline getirilmiştir. Bir rekombinant ters transkriptaz olan ve *E. coli* bakterisinde eksprese edilen reverse transkriptaz kitin ana bileşenidir. Reverse transkriptaz, DNA polimeraz ve RNase H (RNA-DNA hibritlerinde RNA’yı degrade eden enzim) aktivitesindedir (Blaney et al. 2005). DTT, random hexamer primer ve deoksiniükleotid trifosfat (dNTP) karışımında 2 µl, ters transkriptaz, RT-PCR reaction buffer ve RNase inhibitörden 0,5 µl, H₂O’dan 1 µl ve MgCl₂’den ise 4 µl alınarak cDNA reaksiyon karışımı buz içerisinde hazırlanmıştır.

Hazırlanan karışım üzerine her mRNA örneğinden 9 µl eklenerek pipetasyon yapılmıştır. 20°C'de 10 dakika, 42°C'de 45 dakika, 99°C'de 3 dakikada bekletilerek şekilde thermal cycler'da cDNA reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri -30°C'de saklanmıştır.

3.5.3. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

cDNA üzerindeki hedef sekansa uygun olan primer Taq DNA Polimerazın hedefi olur ve böylelikle 30 döngü sonunda cDNA'nın milyonlarca kopyası oluşmuş olur. Prolifere hücre nükleer antijeni (PCNA), siklin D1, Bax, Bcl-2, ATM ve ATR genlerinin ifadenme düzeyleri bu cDNA'lar kullanılarak belirlenmiştir. GAPDH (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) geni referans gen olarak kullanılmıştır. PCR'da kalıp olarak 2 µl cDNA kullanılmıştır. Taq buffer (2,5 µl), dNTP (1 µl), reverse ve forward primerler (2 µl), MgCl₂ (2 µl), dH₂O (11 µl) ve Taq polimeraz (0,5 µl) kullanılarak PCR reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. 94°C'de 1 dakika denatüre edilen PCR karışımı tamponunda annealing (primerlerin bağlanması) ATM ve ATR genleri için 56°C'de 1 dakika, GAPDH ve Bax genleri için 55 °C'de 1 dakika, siklin D1 geni için 58°C'de 1 dakika ve PCNA geni için 59°C'de 1 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. Extension (uzama) ise 72°C'de 2 dakika olarak 30 döngü halinde yapılmıştır. Touchdown PCR kullanılan Bcl-2 geni önce 73°C tutulmuştur her döngüsünde sıcaklık 1°C düşürülmüştür ve 10 döngü sonunda sıcaklık 63°C'ye inmiştir. Bu derecede 25 döngü yapılarak PCR işlemi tamamlanmıştır.

3.5.4. Agaroz jel elektroforezi

PCR'da elde edilen ürünlerin görüntülenmesi aşamasında agaroz jel elektroforezi kullanılmıştır. %2,5'lik agaroz jel hazırlamak için 1,25 gr agaroz, 1x Tris Base EDTA (TBE) tampon çözeltisi ile mikrodalgada 350 W'da, 4 dakika kaynatılmıştır ve tamamen erimesi sağlanmıştır. Homojenize edilen jel, jel tabağına tarakları ve sınırları belirlendikten sonra eklenmiştir. Jel tamamen soğuduktan sonra taraklar çıkarılmış ve jel üzerindeki kuyucuklara PCR ürününden 5 µl yüklenmiştir. 100 bp DNA ladderleri DNA'nın büyüklüğünü ölçmek için baştaki boş kuyucuğa yüklenmiştir. PCNA, Bax, ATM, ATR, siklin 1 ve GAPDH genlerinin PCR ürünleri 120 V sabit akımda 30 dakika, Bcl-2 PCR ürünleri ise 50 dakika yürütülmüştür. Elektroforezde yürütme işlemi sonrasında jellerin görüntüsü UV translüminatör ile bilgisayara aktarılmış ve görüntülerin fotoğrafları alınmıştır. Katekol uygulanan ve uygulanmayan grupların bantlarının yoğunluğu Adobe Photoshop CS4 programı ile değerlendirilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda meydana gelen değişiklikler karşılaştırılarak ortaya konulmuştur (McDaniel and Pillai 2002; Kiefer et al. 2015; Dondossola et al. 2016).

3.6. İstatistiksel Analiz

Tüm deney gruplarının değerleri ortalama ve standart sapma değerleri ile verilmiştir. Verilerin istatistiksel analizleri SPSS programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki ilişkiler ANOVA-GLM (General Linear Model) kullanılarak belirlenmiştir. İstatistiksel analizdeki önem seviyeleri Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi ile ortaya konulmuştur (Anonim 2).

4. BULGULAR

4.1. Parental Hücrelerden İlaç Dirençli Hücrelerinin Oluşturulması

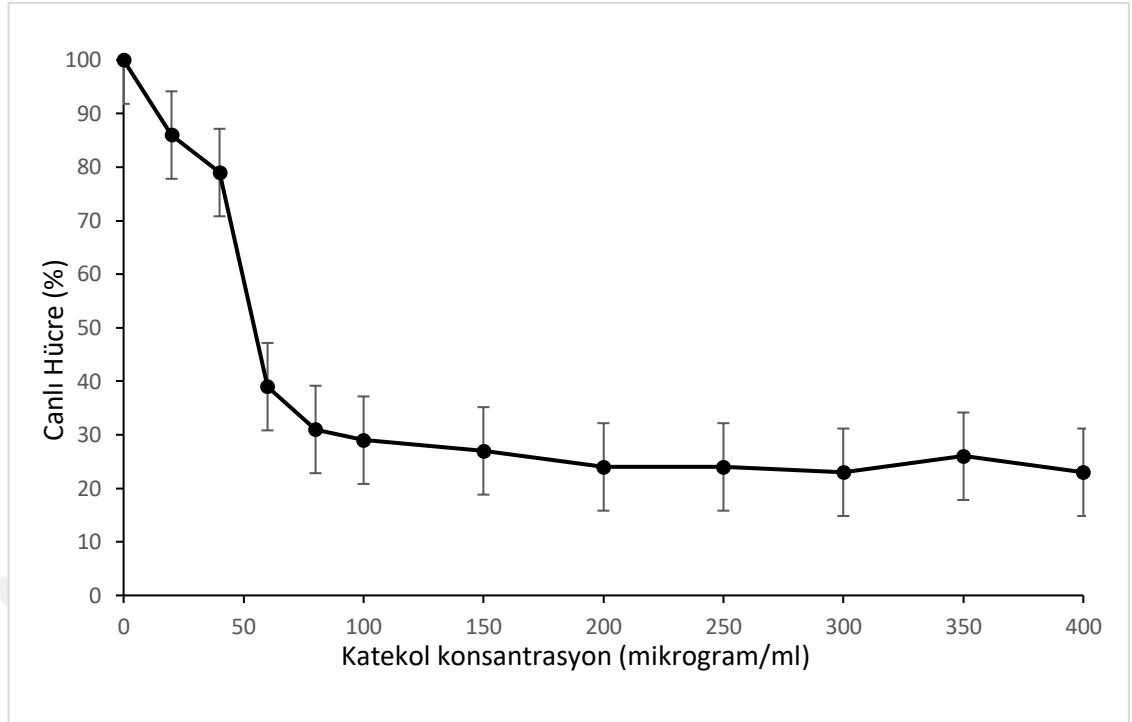
Dirençli akciğer kanseri hücreleri parental hücrelerin sırayla artan konsantrasyonlarda epirubicin-HCL ile muamele edilmesiyle oluşturulmuştur (Jansson et al. 1999; Kars et al. 2006; Ozkan 2007). İlk olarak 1 ng/ml epirubicin-HCL ile başlanmıştır. Daha sonraki aşamada ölü hücreler toplanmıştır ve canlı kalan hücrelerle konsantrasyon arttırılarak devam edilmiştir. Her pasajlamada aynı işlem takip edilerek devam edilmiştir. Uygulanan konsantrasyonlar Çizelge 4.1’de belirtildiği gibidir. 35 ng/ml’lik konsantrasyondan daha yüksek konsantrasyonlarda hücrelerin çoğunluğu öldüğü için epirubicin-HCL uygulaması bu konsantrasyonda durdurulmuştur. Basamak basamak ilaç uygulanması sonucunda elde edilen dirençli hücreler deneylerde kullanılmaya başlanmadan önce en az dört kez ilaçsız besiyerinde pasajlanmıştır.

Çizelge 4.1. Uygulanan epirubicin-HCl konsantrasyonları

Epirubicin-HCl konsantrasyonları
25 ng/ml
30 ng/ml
35 ng/ml
40 ng/ml

4.2. Hücre Canlılığı Testi

Katekolün hücrelerdeki sitotoksik etkisi Cell Titer-Blue® Cell viability assay kiti ile belirlenmiştir. Cell Titer-Blue® kitinin çalışma prensibi canlı hücre metabolizmasının resozurin maddesini floresan özelliğe sahip bir madde olan resorufine çevirebilme yeteneğine dayanmaktadır. Ölü hücrelerde metabolik aktivite görülmediği için floresan ürün oluşamaz ve ışıma gözlenmez. Flasklarda üretilen hücreler toplanır ve 96 well platelere kuyucuk başına 1×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Katekolün artan konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücrelerde 24 saatlik inkübasyon sonunda resozurinin, resorufine dönüşmesi floresanspektrofotometre de (560 eks/ 590 ems) ölçülmüştür. Katekol için IC_{50} konsantrasyonları her hücre hattı için hesaplanmıştır (Çizelge 4.5).



Şekil 4.1. P-H1299 hücrelerinde artan katekol konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı

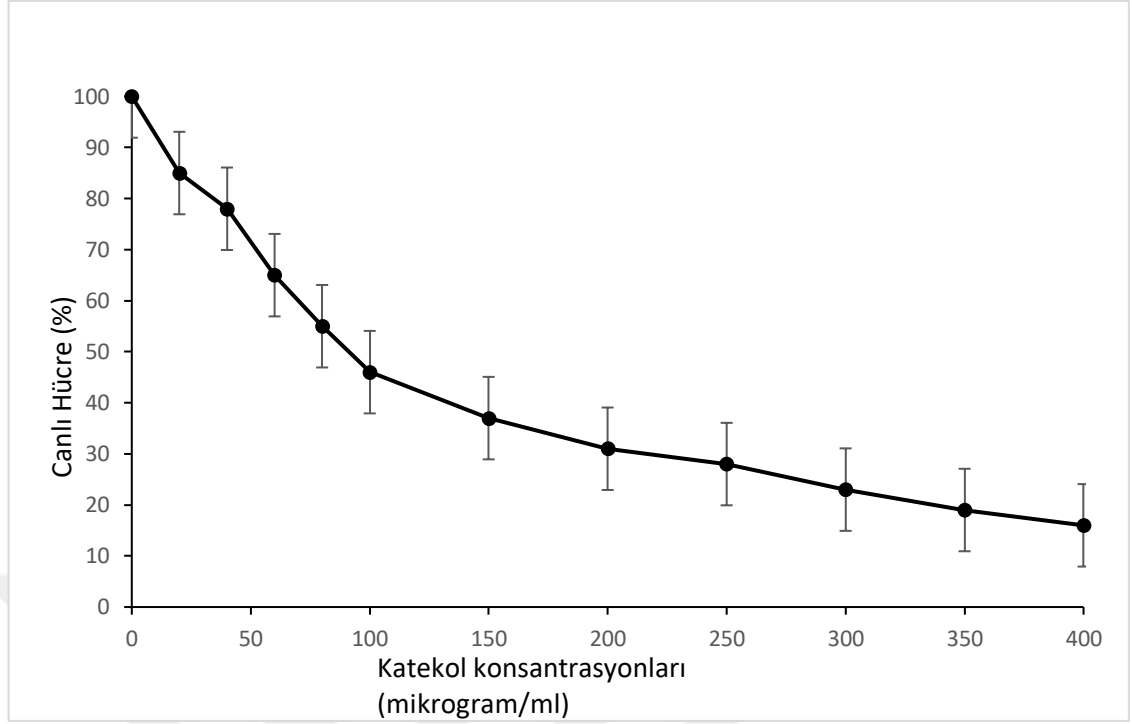
Katekolün artan konsantrasyonlarına 24 saat maruz bırakılan P-H1299 hücrelerinde canlılığın azalması 80 µg/ml'ye kadar hızlı devam ederken, 80/ 400 µg/ml aralığında ise canlılığın azalması çok yavaşlamıştır (Şekil 4.1). Katekol ile 24 saat farklı konsantrasyonlarda muamele edilen P-H1299 hücrelerindeki IC₅₀ değeri 58 µg/ml olarak hesaplanmıştır. 24 saatlik uygulama sonrasında elde edilen verilerin istatistiksel farklılıkları (p<0.05) Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Katekolün P-H1299 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Katekol konsantrasyonları (µg/ml)	Ortalama (X) ± S.S. Canlı hücre sayısı (%) 24 saatlik inkübasyon
20 µg/ml	86 ± 2,35 a
40 µg/ml	79 ± 2,55 b
60 µg/ml	39 ± 2,83 c
80 µg/ml	31 ± 1,79 df
100 µg/ml	29 ± 1,63 def
150 µg/ml	27 ± 5,94 def
200 µg/ml	24 ± 1,26 e
250 µg/ml	24 ± 1,15 e
300 µg/ml	23 ± 1,07 ef
350 µg/ml	26 ± 1,01 deg
400 µg/ml	23 ± 1,07 eg
Kontrol	100 ± 0,05 h
DMSO	98 ± 0,97 j

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0.05)

S.S.: Standart Sapma



Şekil 4.2. R-H1299 hücrelerinde artan katekol konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı

P-H1299 hücreleri ile aynı koşullara maruz bırakılan R-H1299 hücrelerinde canlılığın 100 µg/ml'ye kadar hızlı devam ederken, 100 µg/ml'den sonra canlılığın azalmasının daha yavaş olduğu görülmüştür (Şekil 4.2). Katekol ile 24 saat farklı konsantrasyonlarda muamele edilen R-H1299 hücrelerindeki IC₅₀ değeri 90 µg/ml olarak hesaplanmıştır. 24 saatlik uygulama sonrasında elde edilen verilerin istatistiksel farkları ($p < 0.05$) Çizelge 4.3'te verilmiştir.

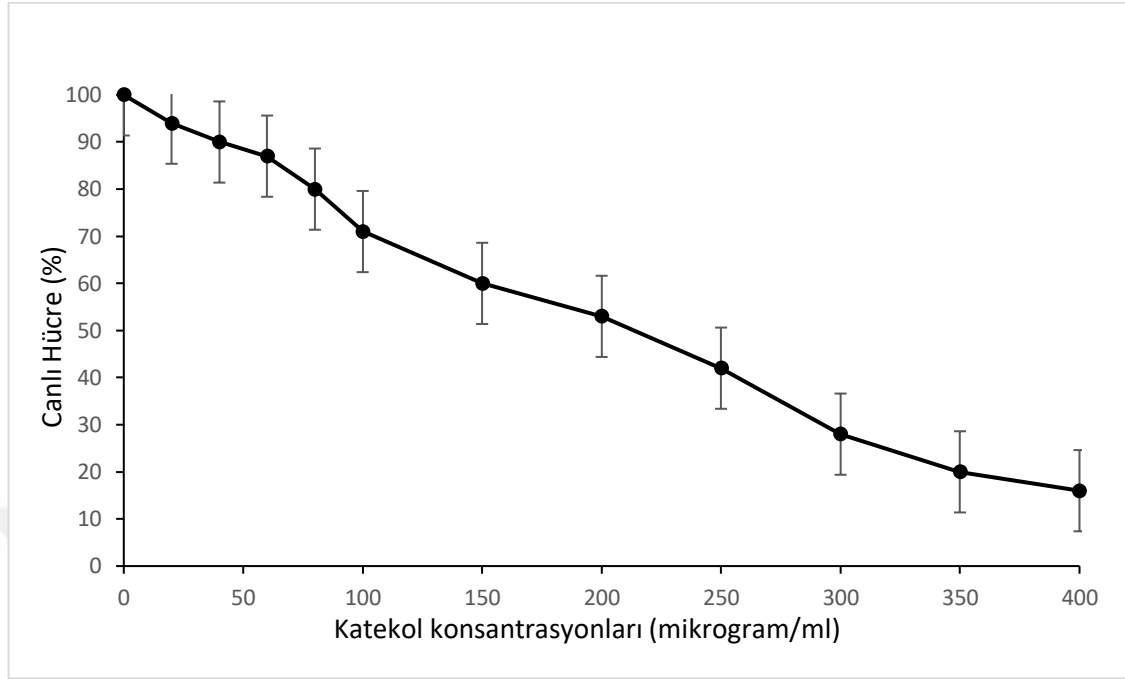
Çizelge 4.3. Katekolün R-H1299 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Katekol konsantrasyonları (µg/ml)	Ortalama (X) ± S.S. Canlı hücre sayısı (%) 24 saatlik inkübasyon
20 µg/ml	85 ± 2,56 a
40 µg/ml	78 ± 2,06 b
60 µg/ml	65 ± 2,05 c
80 µg/ml	55 ± 2,20 d
100 µg/ml	46 ± 1,73 e
150 µg/ml	37 ± 2,36 f
200 µg/ml	31 ± 1,59 g
250 µg/ml	28 ± 2,00 gh
300 µg/ml	23 ± 1,52 hj
350 µg/ml	19 ± 0,79 jk
400 µg/ml	16 ± 0,96 k
Kontrol	100 ± 0,05 l
DMSO	98 ± 0,90 m

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0.05)

S.S.: Standart Sapma

Direnç Katsayısı: Dirençli hücrelerin IC₅₀ değerinin, parental hücrelerin IC₅₀ değerine oranı 1,55 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.3. Bj hücrelerinde artan katekol konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı

P-H1299 ve R-H1299 hücreleri ile aynı koşullar da değerlendirilen Bj hücrelerinde, hücre canlılığı artan konsantrasyonlar ile ters orantılı olarak azalmıştır (Şekil 4.3). Katekol ile 24 saat farklı konsantrasyonlarda muamele edilen Bj hücrelerindeki IC_{50} değeri $207 \mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır. 24 saatlik uygulama sonrasında elde edilen verilerin istatistiksel farkları ($p < 0.05$) Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Katekolün Bj hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Katekol konsantrasyonları (µg/ml)	Ortalama (X) ± S.S. Canlı hücre sayısı (%) 24 saatlik inkübasyon
20 µg/ml	94 ± 3,52 a
40 µg/ml	90 ± 0,23 ab
60 µg/ml	87 ± 0,91 b
80 µg/ml	80 ± 0,62 c
100 µg/ml	71 ± 1,22 d
150 µg/ml	60 ± 1,18 e
200 µg/ml	53 ± 1,29 f
250 µg/ml	42 ± 1,20 g
300 µg/ml	28 ± 0,78 h
350 µg/ml	20 ± 1,12 j
400 µg/ml	16 ± 1,54 j
Kontrol	100 ± 0,04 k
DMSO	98 ± 0,90 l

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0.05)

S.S.: Standart Sapma

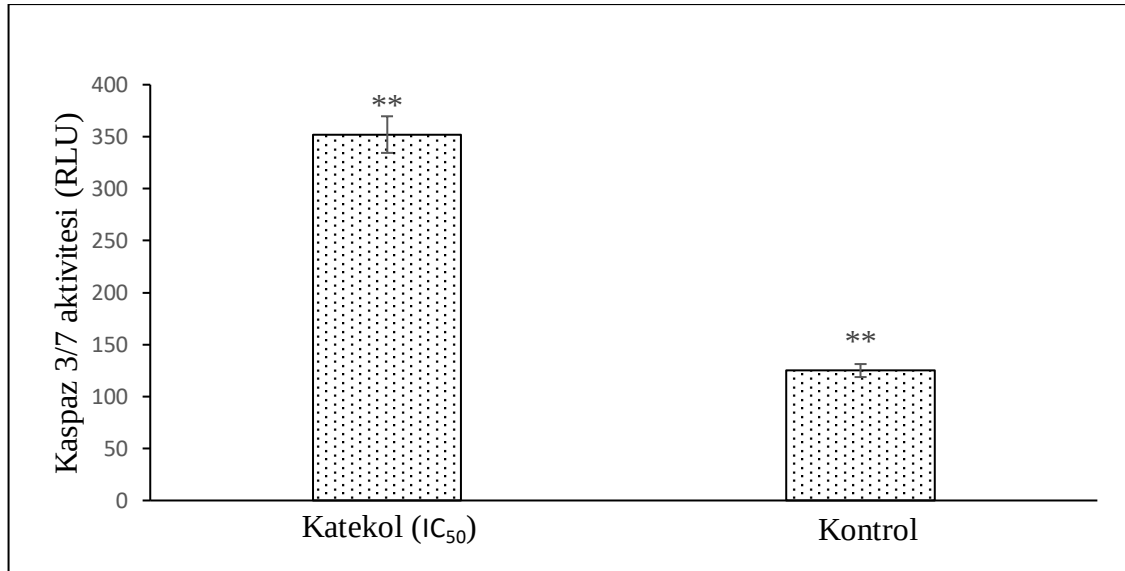
Çizelge 4.5. Katekol uygulanan P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde sitotoksik IC₅₀ değerleri

Hücre Türü	Katekol Sitotoksik etki (IC ₅₀)
P-H1299	58 µg/ml
R-H1299	90 µg/ml
Bj	207 µg/ml

Gruplar arasında Duncan çoklu karşılaştırma analizi yöntemi ile yapılan karşılaştırmada katekolün sitotoksik etkisinin hücreler arasında ve konsantrasyonlar arasında istatistiksel olarak birbirinden farklı ($p < 0.05$) ve anlamlı olduğu belirlenmiştir.

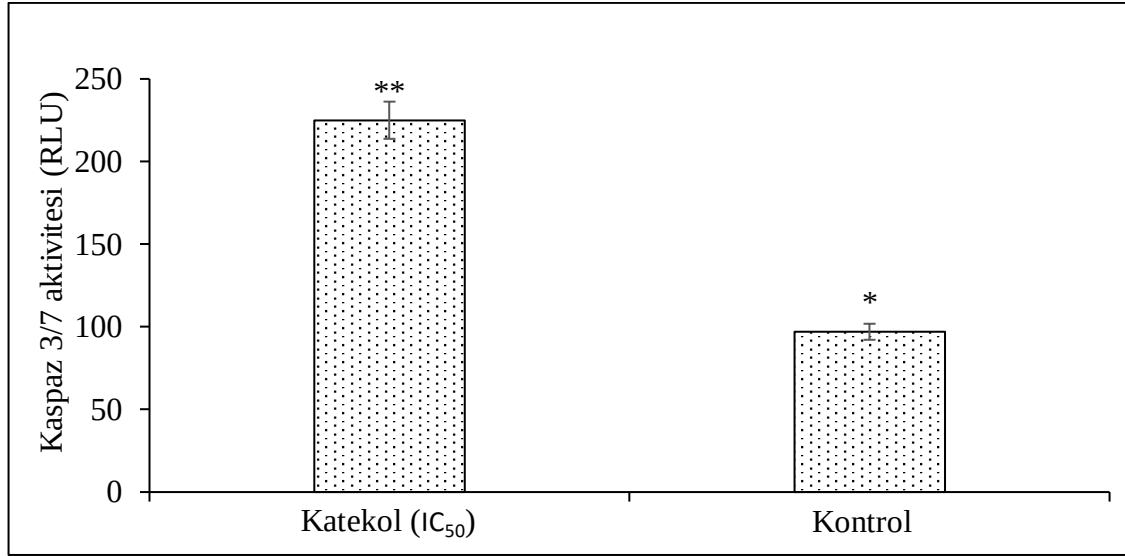
4.3. Katekolün Kaspaz-3/7 Enzim Aktivitesine Etkisinin Ölçülmesi

P-H1299, R-H1299 ve Bj hücre hatları katekolün IC₅₀ konsantrasyonu ile 24 saat muamele edildikten sonra apoptotik yol enzimlerinden biri olan kaspaz 3/7 enziminin hücrelerdeki aktivitesi ölçülmüştür. Böylelikle katekolün (IC₅₀) hücrelerde apoptozisi uyarabilme potansiyeli ortaya konulmuştur. Katekolün P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivasyonu üzerine etkileri Şekil 4.4, 4.5, 4.6'da verilmiştir. Kaspaz 3/7 aktivitesi kontrole kıyasla P-H1299 hücrelerinde 2,8 kat, R-H1299 hücrelerinde 2,3 kat ve Bj hücrelerinde 1,6 kat daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.6). Kaspaz 3/7 aktivitesi P-H1299 hücrelerinde diğer hücrelerden daha yüksek görülmüştür.



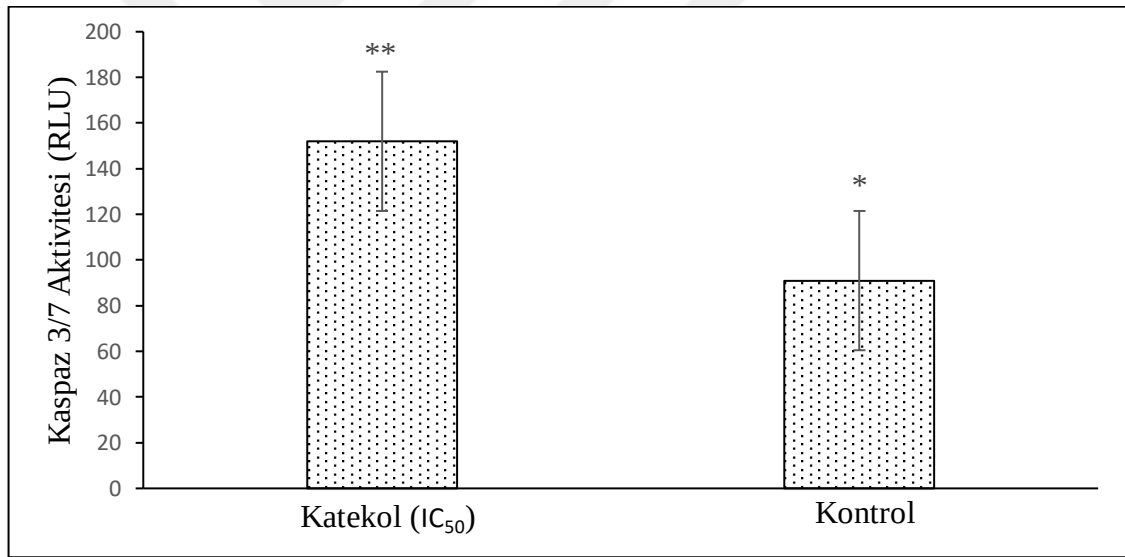
Şekil 4.4. P-H1299 hücrelerinde katekolün kaspaz-3/7 enzim aktivitesine etkisi

(*p değeri <0,05; **p değeri <0,01)



Şekil 4.5. R-H1299 hücrelerinde katekolün kaspaz-3/7 enzim aktivitesine etkisi

(*p değeri <0,05; **p değeri <0,01)



Şekil 4.6. Bj hücrelerinde katekolün kaspaz-3/7 enzim aktivitesine etkisi

(*p değeri <0,05; **p değeri <0,01)

Çizelge 4.6. Katekol uygulanan P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde kaspaz-3/7 enzim aktiviteleri

Uygulanan Konsantrasyonlar	Ortalama (X) ± S.S.		
	Kaspaz 3/7 aktivitesi (RLU) (24 saat)		
	P- H1299	R-H1299	Bj (fibroblast)
Katekol (IC ₅₀)	352 ± 46,39 aA**	225 ± 9,84 aB**	152 ± 6,87 aC**
Kontrol	125 ± 2,77 bA**	97 ± 7,35 bB*	91 ± 1,87 bB*

X: Dört tekrar ortalaması olup sütun boyunca farklı küçük harfler istatistiksel olarak farklılığı gösterirken, satır boyunca farklı büyük harfler istatistiksel olarak farklılığı göstermektedir.

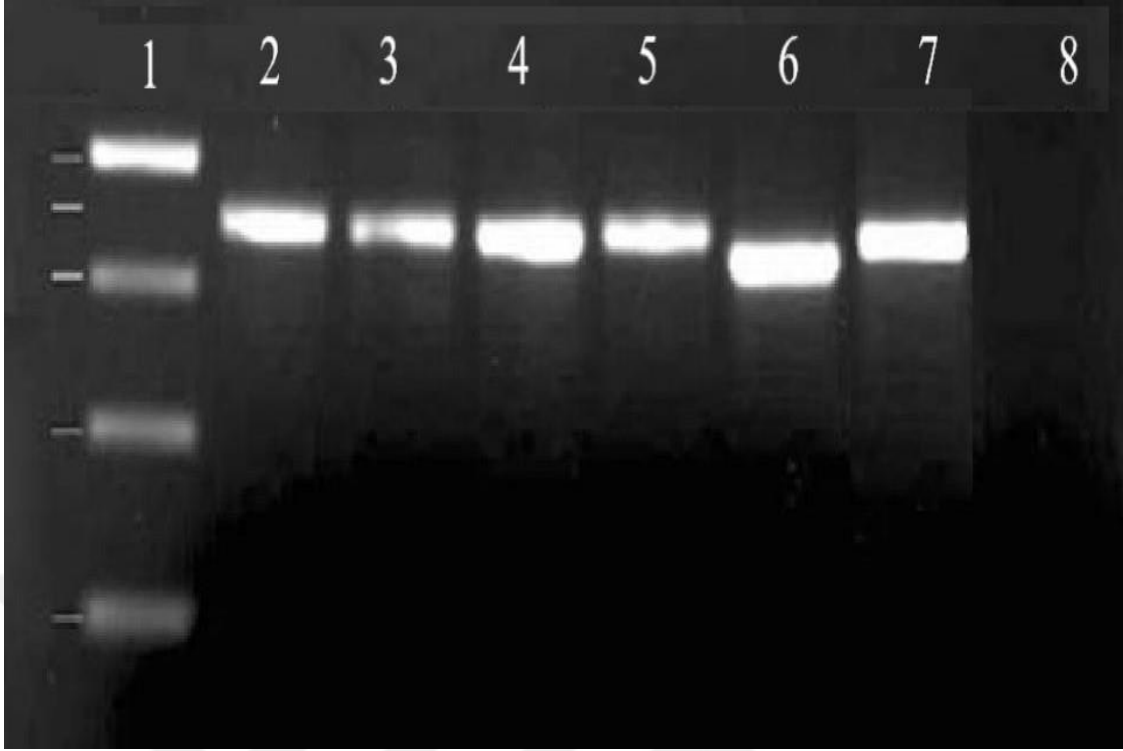
* p değeri <0,05; ** p değeri <0,01

S.S.: Standart Sapma

Gruplar arasında Duncan çoklu karşılaştırma analizi yöntemi ile yapılan karşılaştırmada kaspaz 3/7 enzim aktivitesi hem katekol uygulanan farklı hücrelerde arasında hem de katekol ile kontrol arasında istatistiksel olarak birbirinden farklı (p<0.05) ve anlamlı bulunmuştur.

4.4. Katekolün P-H1299 ve R-H1299 ve Bj Hücrelerinde PCNA, Siklin D1, ATM/ATR, Bax ve Bcl-2 Genlerinin İfade Düzeylerine Etkisi

Katekol'ün parental ve epurubicin dirençli akciğer kanseri hücrelerinde apoptozisi hangi sinyal yolu ile uyardığını araştırmak için hücrelerin RT-PCR (ters transkriptaz polimeraz polimeraz zincir reaksiyonu) ile Bax/Bcl-2, ATM/ATR, siklin D1, PCNA (prolifere hücre nükleer antijeni) genlerinin ifade düzeyleri araştırılmıştır. IC₅₀konsantrasyonunda 24 saat katekole maruz bırakılan hücrelerde, katekolün apoptotik etkiyi hangi sinyal yolu ile indüklendiğini ortaya koymak için, intirinsik apoptotik sinyal yolu için Bax ile Bcl-2 genlerinin (Bax/Bcl-2), hücre döngüsü inhibisyonu için hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişinde aktive olan siklin 1 geninin ve p53 aracılı DNA hasarının ortaya konulması için ATM/ATR genlerinin mRNA ekspresyonları kontrol grubu ile kıyaslanmıştır.



Şekil 4.7. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile GAPDH'ın mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder, 2. kuyucuk P-H1299 kontrol, 3. kuyucuk P-H1299 IC₅₀ katekol, 4. kuyucuk R-H1299 kontrol, 5. kuyucuk R-H1299 IC₅₀ kontrol, 6. kuyucuk Bj kontrol, 7. kuyucuk Bj IC₅₀ katekol, 8. kuyucuk (-) kontrol

RT-PCR analizinde P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde kontrol geni olarak GAPDH (gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) geni kullanılmıştır (Şekil 4.7). RT-PCR'da cDNA sentezinin yapıp yapılmadığı ölçmek için IC₅₀ katekol ile muamele edilmiş ve edilmemiş tüm hücre hatlarında GAPDH geninin ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Bu şekilde cDNA sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiği ortaya konulmuştur.

Diğer tüm genlerin ekspresyon ölçümlerine bu kontrol yapıldıktan sonra geçilmiştir. Tüm RT-PCR ölçümlerinde negatif kontrol (hücre olmayan) gruplarının jel görüntüsü verilmiştir. Jel görüntülerinde negatif kontrol grubunda bir bandın görülmemesi deneyde bir kontaminasyonun olmadığını belirtir.

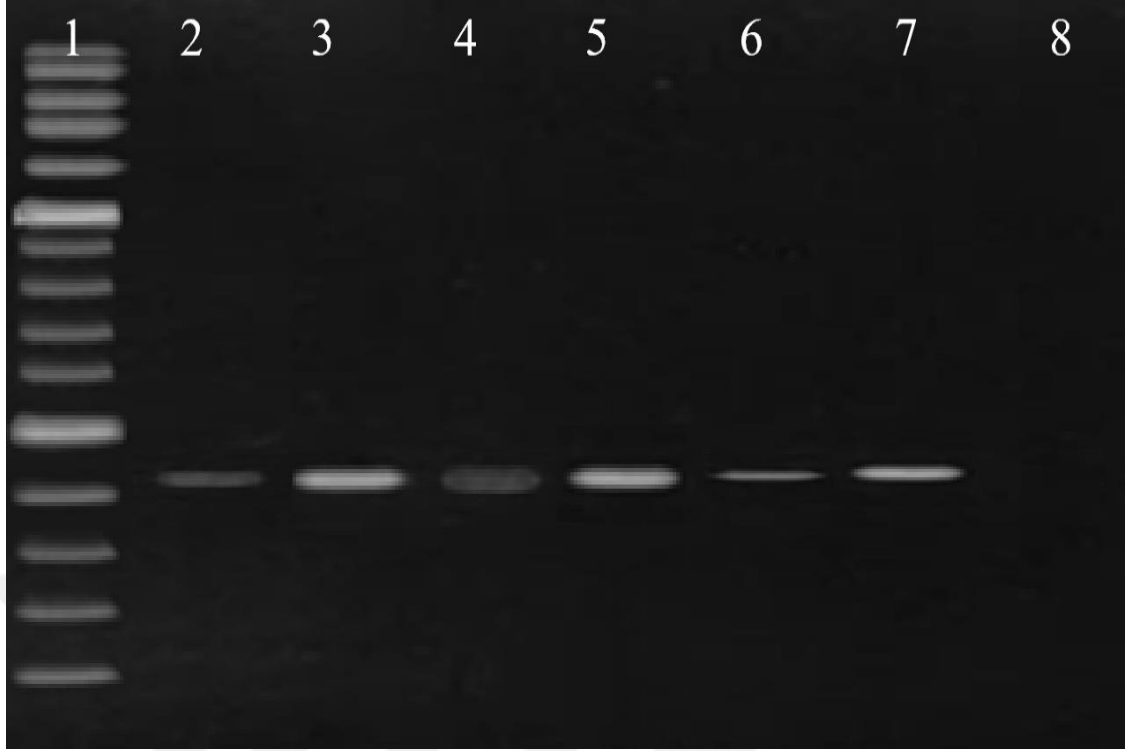


Şekil 4.8. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile PCNA'nın mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder, 2. kuyucuk P-H1299 kontrol, 3. kuyucuk P-H1299 IC₅₀ katekol, 4. kuyucuk R-H1299 kontrol, 5. kuyucuk R-H1299 IC₅₀ katekol, 6. kuyucuk Bj kontrol, 7. kuyucuk Bj IC₅₀ katekol, 8. kuyucuk (-) kontrol

IC₅₀ konsantrasyonunda katekol uygulanan P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde PCNA mRNA ekspresyonu, kontrol grubu hücrelerine göre sırasıyla %53, %24 ve %49 daha az bulunmuştur (Çizelge 4.13) (Şekil 4.8). Katekol uygulaması sonucunda antiproliferatif etkinin diğer hücelere kıyasla P-H1299 hücrelerinde daha yüksek olduğu belirlenmiştir. PCNA mRNA ekspresyonu değişim yüzdeleri baz alınarak hücreler arasında yapılan karşılaştırma Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. PCNA geninin mRNA ekspresyonunun hücreler arasındaki karşılaştırmalı değişim yüzdeleri

Karşılaştırılan hücre hatları	PCNA mRNA ekspresyonu
P-H1299/ R-H1299	P-H1299 %121 daha <u>az</u> eksprese olmuştur.
P-H1299/ Bj	P-H1299 %8 daha <u>az</u> eksprese olmuştur.
R-H1299/Bj	R-H1299 %51 daha <u>fazla</u> eksprese olmuştur.



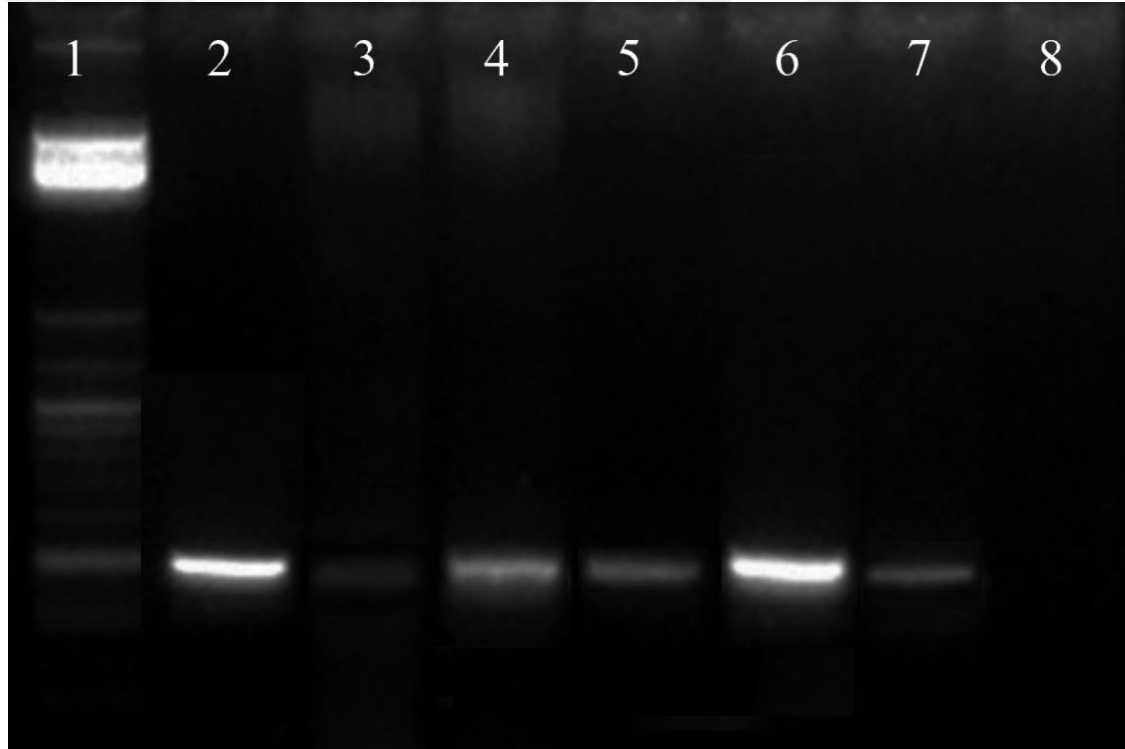
Şekil 4.9. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile Bax'ın mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder, 2. kuyucuk P-H1299 kontrol, 3. kuyucuk P-H1299 IC₅₀ katekol, 4. kuyucuk R-H1299 kontrol, 5. kuyucuk R-H1299 IC₅₀ katekol, 6. kuyucuk Bj kontrol, 7. kuyucuk Bj IC₅₀ katekol, 8. kuyucuk (-) kontrol

Bax proteini mitokondriden sitokrom c salınımını kontrol eden proapoptotik bir proteindir. Bax ile antiapoptotik Bcl-2 proteininin dengesi apoptoziste önemli bir role sahiptir. Bu nedenle Bax/Bcl-2 oranı hücrenin apoptoza duyarlılığını belirler.

Katekol maruziyeti sonrasında P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde Bax mRNA ekspresyonu kontrole göre sırasıyla %134, %96 ve %67 artmıştır (Şekil 4.9). Katekol P-H1299 hücrelerinde, Bax'ın mRNA ekspresyonunu arttırmada daha etkili olmuştur. Buna ek olarak Bax mRNA ekspresyonu değişim yüzdeleri baz alınarak hücreler arasında yapılan karşılaştırma Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Bax geninin mRNA ekspresyonunun hücreler arasındaki karşılaştırmalı değişim yüzdeleri

Karşılaştırılan hücre hatları	Bax mRNA ekspresyonu
P-H1299/ R-H1299	P-H1299 %40 daha <u>fazla</u> eksprese olmuştur.
P-H1299/ Bj	P-H1299 %100 daha <u>fazla</u> eksprese olmuştur.
R-H1299/ Bj	R-H1299 %43 daha <u>fazla</u> eksprese olmuştur.



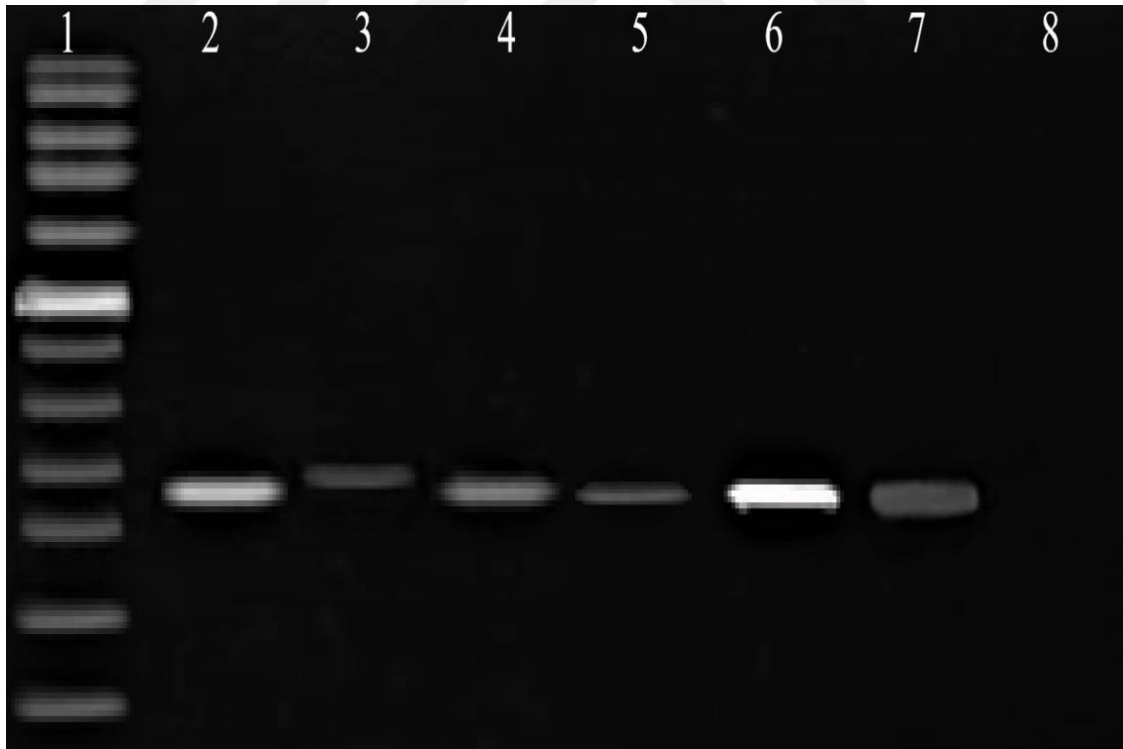
Şekil 4.10. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile Bcl-2'nin mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder, 2. kuyucuk P-H1299 kontrol, 3. kuyucuk P-H1299 IC₅₀ katekol, 4. kuyucuk R-H1299 kontrol, 5. kuyucuk R-H1299 IC₅₀ katekol, 6. kuyucuk Bj kontrol, 7. kuyucuk Bj IC₅₀ katekol, 8. kuyucuk (-) kontrol

Katekolün IC₅₀ konsantrasyonu ile muamele edilen P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde Bcl-2 mRNA ekspresyonu kontrole göre sırasıyla %88, %47 ve %84 daha az bulunmuştur (Şekil 4.10). Katekol uygulaması P-H1299 hücrelerinde Bcl-2 mRNA ekspresyonunu azaltmada daha etkili olmuştur. Ayrıca Bcl-2 mRNA ekspresyonu değişim yüzdeleri baz alınarak hücreler arasında yapılan karşılaştırma Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Bcl-2 geninin mRNA ekspresyonunun hücreler arasındaki karşılaştırmalı değişim yüzdeleri

Karşılaştırılan hücre hatları	Bcl-2 mRNA ekspresyonu
P-H1299/ R-H1299	P-H1299 %87 daha <u>az</u> eksprese olmuştur.
P-H1299/ Bj	P-H1299 %5 daha <u>az</u> eksprese olmuştur.
R-H1299/ Bj	R-H1299 %44 daha <u>fazla</u> eksprese olmuştur.

Bax ve Bcl-2 mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişimi hücrelerde oranladığımız zaman Bax/Bcl-2 oranının P-H1299 hücrelerinde 1,5 ve R-H1299 hücrelerinde bu oran 2 olduğunu görmekteyiz. Bu karşılık sağlıklı hücre hattı olan Bj hücrelerinde bu oran 1 değerinin altında kalarak 0,80 olarak hesaplanmıştır. Bax/Bcl-2 oranının arttığı görülen P-H1299 ve R-H1299 hücrelerinde proapoptotik yolak yönünde bir eğilim olduğu, Bj hücrelerinde ise antiapoptotik yolak yönünde bir eğilim olduğu söylenebilir.

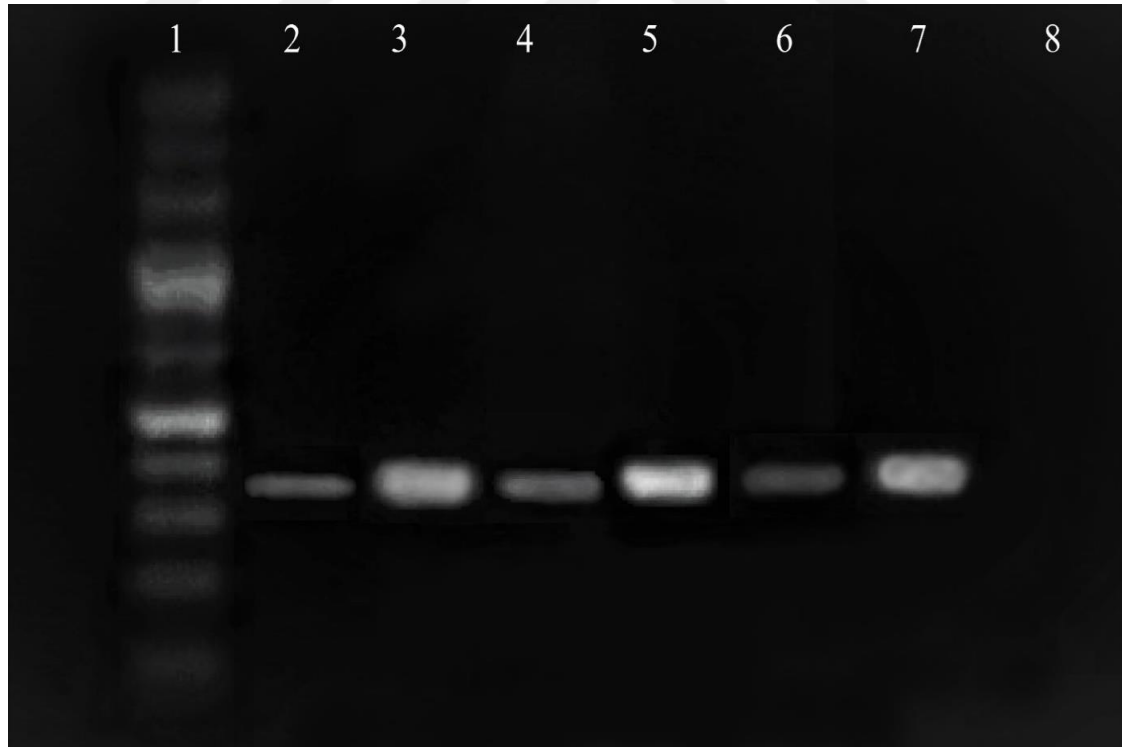


Şekil 4.11. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile Siklin D1'in mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder, 2. kuyucuk P-H1299 kontrol, 3. kuyucuk P-H1299 IC₅₀ katekol, 4. kuyucuk R-H1299 kontrol, 5. kuyucuk R-H1299 IC₅₀ katekol, 6. kuyucuk Bj kontrol, 7. kuyucuk Bj IC₅₀ katekol, 8. kuyucuk (-) kontrol

Katekolün IC_{50} konsantrasyonuna maruz kalan P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde siklin D1 mRNA ekspresyonu kontrol grubuna göre sırasıyla %72, %47 ve %70 oranında azalma göstermiştir (Şekil 4.11). Katekolün hücre döngüsü inhibisyonundaki etkisini ortaya koymak için ölçülen ve hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişi sırasında aktive olan siklin D1'in mRNA ekspresyonunun en fazla P-H1299 hücrelerinde düşük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca siklin D1 mRNA ekspresyonu değişim yüzdeleri baz alınarak hücreler arasında yapılan karşılaştırma Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10. Siklin D1 geninin mRNA ekspresyonunun hücreler arasındaki karşılaştırmalı değişim yüzdeleri

Karşılaştırılan hücre hatları	Siklin D1 mRNA ekspresyonu
P-H1299/ R-H1299	P-H1299 %53 daha <u>az</u> eksprese olmuştur.
P-H1299/ Bj	P-H1299 %3 daha <u>az</u> eksprese olmuştur.
R-H1299/Bj	R-H1299 %33 daha <u>fazla</u> eksprese olmuştur.



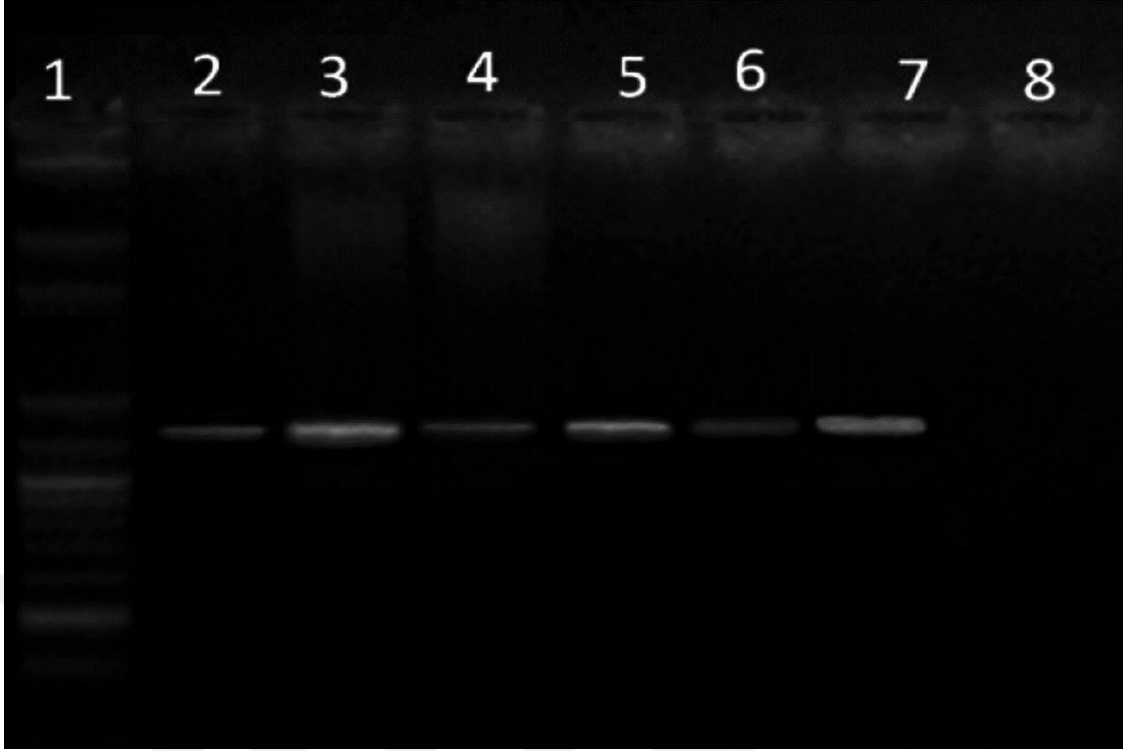
Şekil 4.12. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile ATM'nin mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder, 2. kuyucuk P-H1299 kontrol, 3. kuyucuk P-H1299 IC_{50} katekol, 4. kuyucuk R-H1299 kontrol, 5. kuyucuk R-H1299 IC_{50} katekol, 6. kuyucuk Bj kontrol, 7. kuyucuk Bj IC_{50} katekol, 8. kuyucuk (-) kontrol

Apoptotik yolda en son basamak DNA hasar meydana gelmesi sonucu DNA kırıklarının oluşumudur. DNA hasarına karşı verilen hücresel yanıtta görev alan ATM ve ATR proteinleri DNA'da meydana gelen çift ve tek zincir kırıklarının oluşması durumunda eksprese olmaktadır. ATM/ATR genlerinin ekspresyon seviyeleri DNA'da meydana gelen hasarın seviyesini belirler.

Katekolün IC₅₀ konsantrasyonu ile muamele edilen P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde ATM mRNA ekspresyonu kontrole göre sırasıyla %162, %112 ve %150 artmıştır (Şekil 4.12). Katekol uygulaması P-H1299 hücrelerinde ATM mRNA ekspresyonunu arttırmada daha etkili olmuştur. ATM mRNA ekspresyonu değişim yüzdeleri baz alınarak hücreler arasında yapılan karşılaştırma Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. ATM geninin mRNA ekspresyonunun hücreler arasındaki karşılaştırmalı değişim yüzdeleri

Karşılaştırılan hücre hatları	ATM mRNA ekspresyonu
P-H1299/ R-H1299	P-H1299 %45 daha <u>fazla</u> eksprese olmuştur.
P-H1299/ Bj	P-H1299 %8 daha <u>fazla</u> eksprese olmuştur.
R-H1299/ Bj	R-H1299 %25 daha <u>az</u> eksprese olmuştur.



Şekil 4.13. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile ATR'nin mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk 100 bp DNA ladder, 2. kuyucuk P-H1299 kontrol, 3. kuyucuk P-H1299 IC₅₀ katekol, 4. kuyucuk R-H1299 kontrol, 5. kuyucuk R-H1299 IC₅₀ katekol, 6. kuyucuk Bj kontrol, 7. kuyucuk Bj IC₅₀ katekol, 8. kuyucuk (-) kontrol

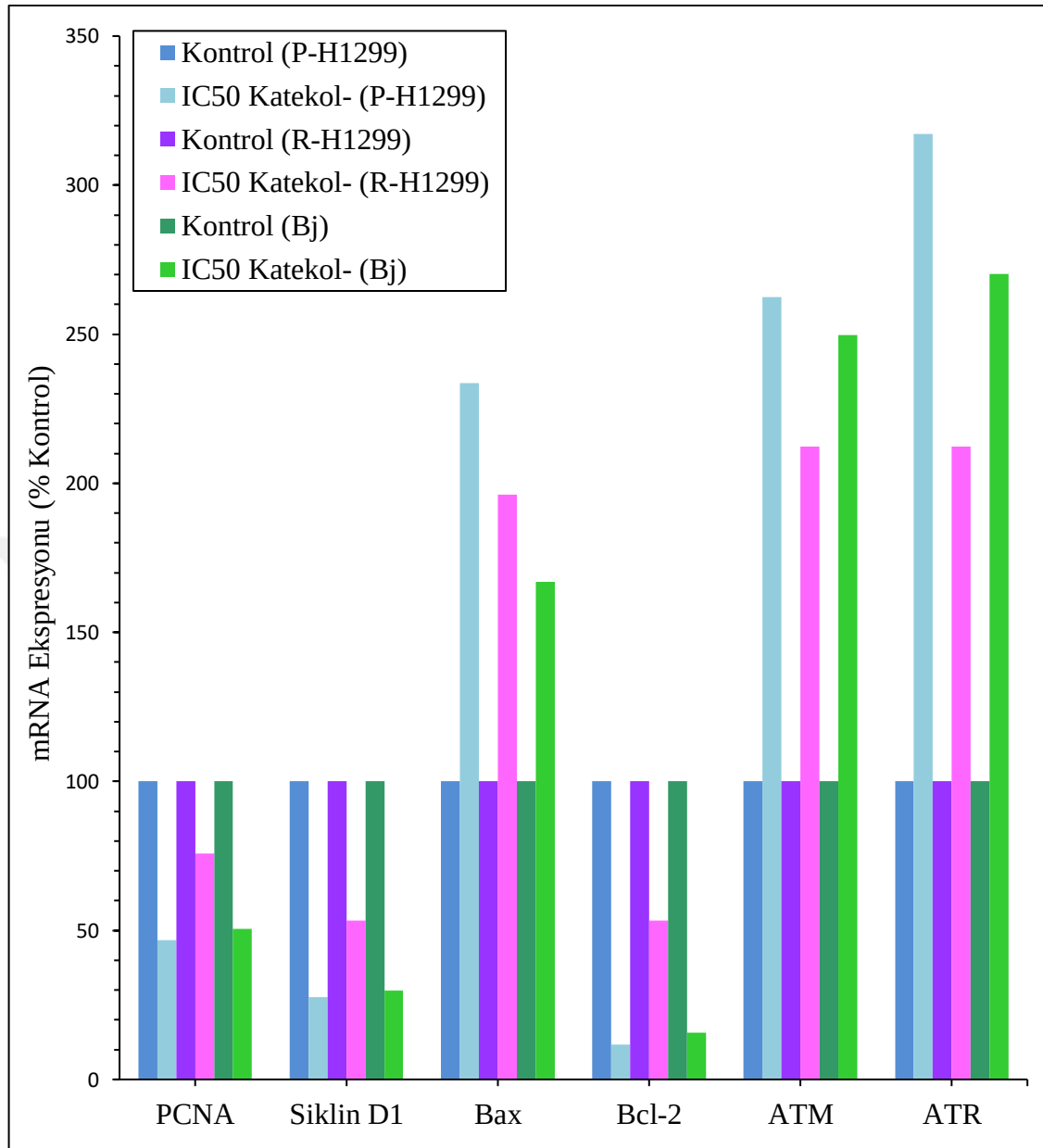
Katekol maruziyeti sonrasında P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde ATR mRNA ekspresyonu kontrole göre sırasıyla %217, %112 ve %170 artmıştır (Şekil 4.13). Katekol P-H1299 hücrelerinde, ATR'nin mRNA ekspresyonunu arttırmada daha etkili olmuştur. Buna ek olarak ATR mRNA ekspresyonu değişim yüzdeleri baz alınarak hücreler arasında yapılan karşılaştırma Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. ATR geninin mRNA ekspresyonunun hücreler arasındaki karşılaştırmalı değişim yüzdeleri

Karşılaştırılan hücre hatları	ATR mRNA ekspresyonu
P-H1299/ R-H1299	P-H1299 %94 daha <u>fazla</u> eksprese olmuştur.
P-H1299/ Bj	P-H1299 %28 daha <u>fazla</u> eksprese olmuştur.
R-H1299/ Bj	R-H1299 %34 daha <u>az</u> eksprese olmuştur.

Çizelge 4.13. RT-PCR ile analiz edilen mRNA ifade düzeylerinin Adobe CS4 programı ile ölçülen değerleri

Gen	Uygulama	Hücre	Yoğunluk Değeri	Kontrole göre % fark
PCNA	Kontrol	P-H1299	156,072471	↓ 53%
	IC ₅₀ katekol	P-H1299	72,857624	
	Kontrol	R-H1299	155,738656	↓ 24%
	IC ₅₀ katekol	R-H1299	118,091337	
	Kontrol	Bj	144,634279	↓ 49%
	IC ₅₀ katekol	Bj	73,070066	
Siklin D1	Kontrol	P-H1299	82,249123	↓ 72%
	IC ₅₀ katekol	P-H1299	22,814035	
	Kontrol	R-H1299	45,593657	↓ 47%
	IC ₅₀ katekol	R-H1299	24,295682	
	Kontrol	Bj	120,602969	↓ 70%
	IC ₅₀ katekol	Bj	35,974494	
BAX	Kontrol	P-H1299	27,179207	↑ 134%
	IC ₅₀ katekol	P-H1299	63,471728	
	Kontrol	R-H1299	30,092795	↑ 96%
	IC ₅₀ katekol	R-H1299	59,021432	
	Kontrol	Bj	26,025992	↑ 67%
	IC ₅₀ katekol	Bj	43,452436	
Bcl-2	Kontrol	P-H1299	98,577377	↓ 88%
	IC ₅₀ katekol	P-H1299	11,475497	
	Kontrol	R-H1299	45,782056	↓ 47%
	IC ₅₀ katekol	R-H1299	24,385225	
	Kontrol	Bj	124,177045	↓ 84%
	IC ₅₀ katekol	Bj	19,497052	
ATM	Kontrol	P-H1299	33,781160	↑ 162%
	IC ₅₀ katekol	P-H1299	88,624100	
	Kontrol	R-H1299	44,712881	↑ 112%
	IC ₅₀ katekol	R-H1299	94,941274	
	Kontrol	Bj	33,999030	↑ 150%
	IC ₅₀ katekol	Bj	84,896330	
ATR	Kontrol	P-H1299	11,836819	↑ 217%
	IC ₅₀ katekol	P-H1299	37,531808	
	Kontrol	R-H1299	13,664706	↑ 112%
	IC ₅₀ katekol	R-H1299	29,014597	
	Kontrol	Bj	11,355120	↑ 170%
	IC ₅₀ katekol	Bj	30,673638	



Şekil 4.14. Tüm hücrelerin karşılaştırmalı PCNA, siklin D1, Bax, Bcl-2, ATM ve ATR mRNA ekspresyon seviyeleri

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, dünya çapında her iki cinsiyette de yaklaşık %23 ölüm oranıyla kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir; tanı ve tedavideki son gelişmelere rağmen, prognoz kötü olmaya devam etmektedir (Anonymous 1). Akciğer kanseri ülkemizde de insidansı en yüksek olan kanser türler arasındadır. Erkeklerde ilk sırada kadınlarda ise 4. sırada bulunmaktadır (Anonymous 1). Bugüne kadar, hedefe yönelik tedavi, radyoterapi ve kemoterapi, akciğer kanseri tedavisi için en yaygın yöntemler olmuştur. Akciğer kanseri tedavisinde önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, hala ilaç direnci ve istenmeyen yan etkiler gibi birçok zorluk bulunmaktadır. Akciğer kanseri hastalarının sağ kalımlarını arttırabilmek ve tedavi yöntemlerindeki başarı yüzdelerini arttırabilmek için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

Üçüncü evre KHDAK hastalarına genellikle platin bazlı kemoterapi ve radyoterapi uygulanmakta iken dördüncü evre KHDAK hastalarına ise sadece kemoterapinin uygulandığı bilinmektedir (Hopper-Borge and Wangari-Talbot 2014; Cagle et al. 2013). Antrasiklin türevi kemoterapötikler (doxorubicin, epirubicin vb), meme, akciğer, glioblastoma, glioma ve tiroid kanserleri gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan güçlü bir kemoterapötik ajanlardır (Mohammadi et al. 2020). Ancak kanser hücrelerinin, geleneksel kemoterapiye direnç geliştirdiği bilinmektedir. Doxorubicin (DOX), optimal dozda kullanıldığında kanser ilerlemesini etkili bir şekilde bastırır. Bununla birlikte, sık uygulanmasının ardından kanser hücreleri, ilacın antitümör aktivitesini önlemek için çeşitli moleküler yollarla direnç geliştirmektedir. Buna karşın DOX konsantrasyonunu artırma stratejisi önerilmez çünkü DOX, kalp gibi vücudun diğer organlarını olumsuz etkileme potansiyeline sahiptir. Bu hücrelerde kardiyotoksisite ve apoptotik hücre ölümü DOX'un iyi bilinen bir olumsuz etkisidir (Zhang et al. 2020). DOX'un bilinen yan etkilerinin yaratacağı olumsuz etkilerden kaçınmak amacıyla çalışmalarda bir doxorubicin türevi olan epirubicin-HCl tercih edilmektedir. Antrasiklin analogu epirubicin-HCl (EPI), yoğun güçlü sitotoksik bir bileşiktir. Eşit antitümör aktivite üreten dozlarda doksorubisin türevlerinden daha az kalp hasarına neden olur bu yüzden bu grupta en çok tercih edilen antikanser ajan olmuştur. Sitotoksik etkileri için önerilen mekanizma, antrasiklinin kinon grubunun neden olduğu hücre içi serbest radikallerin oluşumunu içerir (Dobbs 1994).

Yeni antikanser ilaç araştırmalarında bitkisel ürünlerin antiproliferatif ve sitotoksik etkilerinin araştırılması temel stratejilerdendir (Öztürk ve Duran 2018). Klinik öncesi ve klinik araştırmaların birçok bitkisel ürün ve bileşenlerinde sürdürüldüğü bu bileşenlerin umut verici antikanser etkinliklerinin olduğu görülmektedir. Söz konusu araştırmalardaki antikanser ajanların genel olarak hücre içi apoptozis yollarını aktive ettikleri bildirilmiştir (Halabi ve ark. 2014, Bonofiglio ve ark. 2016, Engel ve ark. 2011). Programlı hücre ölümünün tek örneği olarak bilinen apoptozis, hücrede organize olarak gerçekleşen ölüm düzenlenmesi şeklinde tanımlanmaktadır. Buna ek olarak son zamanlarda programlı hücre ölümü terimi içerisine otofaji ve nekroptoz (programlanmış nekroz) olayları da dahil edilmiştir. Programlı hücre ölümünün iki örneği olan apoptozu ve nekroptoz organizma için zararlı olabilecek hücrelerin canlılığının devamına engel olan bir bariyer olarak işlev görmektedir. Çok hücreli canlılarda homeostazisi engelleyecek hücrelerin ortadan kaldırılması canlılık için oldukça önemlidir. Apoptozis süreci zar kabarcıklanması, hücre büzülmesi, DNA parçalanması ve zarla kaplı veziküllere ayrıştırmayı içeren

oldukça düzenli ve programlı işleyen bir süreçtir. Hücrelerin düzensiz olarak ölümü klinik zoukluklardaki artış ile karakterizedir. Apoptozisin dokularda düzensiz sıklığı da birtakım sorunlara yol açabilir nörodejeneratif hastalıklar ve iskemi aşırı apoptozis sonucunda gelişirken kanser ve otoimmün rahatsızlıklar ise yetersiz apoptozis sonucunda meydana gelmektedir. Ayrıca bilinmektedir ki apoptozis süreci karmaşık bir olay kaskadı gerektirmektedir (Goldar ve ark. 2015).

Bitki kaynaklı doğal moleküller, çeşitli kanserlerin iyileştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu moleküllerin çoğunun apoptozu indüklediği ve/veya kanser hücrelerinde hücre döngüsü mekanizmalarına etki ettiği bilinmektedir (George et al. 2017; George et al. 2012; Vazhappilly et al. 2019a; Vazhappilly et al 2019b). Katekol, *Semecarpus anacardium*, *Bonellia macrocarpa*, soğan, elma ve zeytinyağı gibi bitkilerde doğal olarak bulunan küçük bir halka bileşiğidir. Endüstriyel olarak boya ve ilaç sanayisinde de kullanıldığı bilinen bu halka bileşiğinin atık malzemelerle doğaya karışması bu bileşiğin canlılardaki etkisinin incelenmesi gerekliliğini ortaya çıkarmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda katekolün DNA'ya zarar verdiği gösterilmiştir ve bu nedenle 1999 yılında Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IACR) tarafından grup 2B kanserojen olarak sınıflandırılmıştır (Oikawa et al. 2001). Yapılan çalışmalarda katekolün metal aracılı H_2O_2 , semikinon ve hidrokinon gibi bileşenlerin sentezinde öncül bileşen olduğu (Şekil 2.5) ve bu yolla da p53, p16 gibi tümör supressör genlerin tahribatına neden olduğu ortaya konulmuştur (Oikawa et al. 2001) Katekolün etki mekanizması da epirubicin-HCl'nin etki mekanizmasına benzer bir yol izlemektedir. Her iki bileşenin etki mekanizmasında da kinon bileşenlerinin aracılığı ile hücre içi serbest radikal üretiminin neden olduğu sitotoksik etkiyi görmekteyiz.

Yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçlarına karşı kanser hücrelerinin direnç geliştirdiği bilinmektedir ayrıca sağlık hücrelerde zarar görmektedir bu yüzden daha çok ve farklı antikanser ilaca ihtiyaç vardır. Katekol bitkisel bir bileşik olduğu için sağlıklı hücreleri koruyabilme potansiyelinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir. Parental (P-H1299), epirubicin-HCl dirençli H1299 (R-H1299) ve sağlıklı fibroblast (Bj) hücrelerinde katekolün etkilerinin karşılaştırıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda bir benzen türevi olan katekolün, parental ve ilaca direnç kazandırılmış H1299 hücreleri üzerindeki antikanser etkisini hangi apoptotik yol ile sağladığı araştırılmıştır ve elde edilen sonuçlar katekolün sağlıklı fibroblast hücrelerindeki etkileriyle karşılaştırılmıştır. Katekol 24 saat hücrelere uygulandıktan sonra yarattığı sitotoksik etkiye en yüksek hassasiyeti P-H1299 hücreleri göstermiştir. Katekolün artan konsantrasyonlarına maruz kalan P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinin IC_{50} değerleri sırasıyla 58 $\mu g/ml$, 90 $\mu g/ml$ ve 207 $\mu g/ml$ olarak hesaplanmıştır. Bir çalışmada katekolün hücrelerdeki sitotoksik etkisi MTS testi ile değerlendirilmiştir. Normal akciğer kanseri hücrelerinde (NL20) katekolün toksik olmadığı ancak mürin akciğer kanseri (KP2), insan büyük hücreli akciğer (H460) hücrelerinde büyümenin baskılandığı gözlenmiştir (Lim et al. 2016). Yapılan bu çalışmanın sonuçları ile paralel bir şekilde Cell Titer-Blue® Hücre canlılığı testini kullanarak elde ettiğimiz sonuçlarda da kanser hücrelerinde toksik olan dozlar sağlıklı hücre hatlarında toksisite göstermemiştir. Sonuçlarımızın benzer olması bulguları destekler niteliktedir. Elde edilen bu sonuçlar, katekolün tercihen tümör hücrelerini öldürdüğünü göstermektedir. Başka çalışmada karaciğer kanseri hücrelerinde (HCC)

katekolün etkisini incelemek için farklı konsantrasyonlarda 24 saatlik maruziyet sonrasında hücre canlılığı WST-8 tahlili ile ölçülmüştür. Sonuç olarak HCC hücrelerinde katekolün canlılığı doza bağımlı olarak azalttığı gözlenmiştir (Lim et al. 2020). *Bonellia macrocarpa*'dan elde edilen alkil katekolün (bonediol) parental ve metastatik prostat kanseri hücreleri (LNCaP, PC-3, PC3-M) ve sağlıklı böbrek hücreleri (Hek-293) üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında tüm hücre hatlarında doza bağlı antiproliferatif etki göstermiştir. Ancak bonediolün seçici olarak LNCaP, PC-3 ve PC3-M hücrelerindeki sitotoksik etkisi sağlıklı hücelere kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Moo pack et al. 2015). *Semecarpus anacardium*'dan izole edilen katekol bileşiğinin (SA-3C) sitotoksik etkisini değerlendirmek için yapılan MTT testinde insan lösemi hücre hattı (CEM), ilaca direnç kazandırılan lösemi hücreleri (CEM/VLB), meme kanseri (MCF-7), kolon kanseri (SW620), ilaca dirençli kazandırılan kolon kanseri (SW620Ad300) hücreleri ile periferik kan mononükleer hücreleri (PBMN) karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. SA-3C'nin 0,32 - 18,70 μM konsantrasyon aralığında tüm kanser hücre hatlarında PBMN'ye göre daha sitotoksik olduğu görülmüştür. SA-3C'nin lösemi ve kolon kanseri hücreleri üzerindeki etkisi hem parental hem de dirençli hatlarında değerlendirilmiştir ve duyarlılıkları aynı bulunmuştur (Nair et al. 2009). Katekol ve doksorubisinin meme kanseri hücreleri (MCF-7 ve MDA-MB-231) üzerindeki sitotoksik etkilerinin, MTT testi kullanılarak değerlendirildiği bir çalışmada hücreler farklı katekol (0-80 μM) ve doksorubisin (0,005 - 5 μM) konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Katekolün, sırasıyla 43.71 ve 73.71 μM IC_{50} değerleriyle hem MCF-7 hem de MDA-MB-231 hücreleri üzerinde doza bağlı önemli sitotoksik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Buna karşılık, doksorubisin, 1 μM 'de bile, her iki hücre hattında da önemli sitotoksik etki sergilemiştir. Antiproliferatif etkiyi doğrulamak için, daha sonra katekolün bu hücreler üzerindeki koloni inhibe etme potansiyeli analiz edilmiştir ve her iki hücre hattında da 10 μM 'lik konsantrasyonda kolonilerin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği gözlenmiştir. Herhangi bir antikanser bileşiğinin güvenlik profilini araştırmak, terapötik bir bakış açısında oldukça önemlidir; bu nedenle, katekolün kanserli olmayan hücreler (F-180 ve HK2) üzerindeki farmakokinetik etkisi de araştırılmıştır. 5-10 μM 'lik düşük konsantrasyonlarda, katekol, sadece besiyeri ile muamele edile hücelere kıyasla hem F-180 hem de HK2 hücrelerinde hücre çoğalmasını desteklerken, 40 ve 80 μM 'lik daha yüksek konsantrasyonlarda, F-180 ve HK2 hücrelerinde minimal oranda sitotoksik etki sergilemiştir (Vazhappily et al. 2020).

Katekol, kardiotoksikite gibi ciddi yan etkileri olan antikanser ilaçların neden olduğu yüksek sitotoksik etkiye sahip olmasa da konsantrasyona bağlı olarak artan bir sitotoksik etki göstermiştir. Bu sitotoksik etki kanser hücrelerinde sağlıklı hücelere kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Katekolün hücrelerde neden olacağı değişiklikleri araştırmak için ilk olarak apoptotik ölüm yolağı enzimlerinden biri olan kaspaz 3/7 aktivitesi P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde ölçülmüştür. Kaspaz 3/7 aktivitesinin IC_{50} katekol uygulanan hücrelerde, kontrol grubuna kıyasla P-H1299 hücrelerinde 2,8 kat, R-H1299 hücrelerinde 2,3 kat ve Bj hücrelerinde 1,6 kat arttığı görülmüştür. Apoptoz da kritik bir öneme sahip olana kaspaz 3 enzimi hücrede meydana gelen ve geri dönüşü olmayana hasar durumlarında gözlenen spesifik morfolojik değişikliklerden, proteinlerin parçalanmalarından ve hücre iskeletinin yıkımından sorumludur. Yapılan bir çalışmada apoptozis gözlenen hücrelerde kaspaz artışı olup olmadığını incelemek amacıyla meme kanseri (MCF-7) ve dirençli meme kanseri

(MDA-MB-23) hücre hatlarında DAPI nükleer floresan boyama kullanarak katekolün kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma potansiyeli araştırılmıştır. Katekol ile muamele edilen MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri görüntülerinde apoptotik hücre ölümü özellikleri olduğu gözlenmiştir. Daha sonra Western blot ile kaspaz- 3 ve kaspaz -9 ifadelerinin kontrol grubuna kıyasla değerlendirildiğinde her iki hücre hattında da aktif kaspaz-9 ekspresyonunun arttığı kaydedilmiştir. Kaspaz- 3 ekspresyonu MDA-MB-231 hücrelerinde artış gösterirken, kaspaz-3 geni eksikliği ile bilinen hücreler olan MCF-7 hücrelerinde beklendiği üzere bir kaspaz 3 ekspresyonu gözlenmemiştir. (Vazhappily et al. 2021). Bu çalışmanın sonuçlarında katekolün meme kanseri hücrelerinde kaspaz aracılı apoptotik hücre ölümünü indükleyebileceğini gösterilmektedir. Bir başka çalışmada bir katekol türevi olan 5-S-cysteinyl-dopamine (CysDA) ile muamele edilen nöroblastoma (SH-SY5Y) hücrelerindeki kaspaz-8 ve -9 aktiviteleri ölçülmüştür. 24 saatlik muamele sonrasında CysDA ile muamele edilmiş hücrelerde kaspaz-9'un aktivitesinin, kaspaz-8'inkinden belirgin şekilde daha yüksek olduğu görülmüştür. Buna ek olarak western blot analizi ile sitokrom c salınımının da arttığı belirlenmiştir. Kaspaz- 8 seviyesinin düşük olması durumu mitokondriden sitokrom c salınmasına, BID proteininin indüklenmesine ve bu da kaspaz-9'un aktivasyonuna yol açar, artan kaspaz-9 seviyeleri efektör kaspazlardan olan kaspaz-3'ü aktive eder ve hücre ölüm yoluna girmiş olur (Mosca et al. 2008).

Hücrelerde apoptozis varlığını göstermede kaspaz 3/7 enzim aktivitesi önemli bir biyobelirteç olmakla birlikte hücrede ölüm sinyalinin başlatan yolların anlaşılmasında gen ekspresyonlarının incelenmesi daha belirleyici olabilmektedir. Proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin faaliyetleri hücre ölüm mekanizmalarını düzenler (Warren et al. 2019) ve bu proteinlerin ekspresyonu, western blot kullanılarak ya da mRNA ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile ölçülerek belirlenir. Bcl-2 protein ailesi, hücrelerin proliferasyona mı yoksa apoptoza mı gittiğini belirlemek için bir "apoptotik anahtar" görevi görür (Pistritto Trisciuglio et al. 2016). Bir çalışmada katekolün Bcl-2 ailesi üyeleri olan Bcl-XL, MCL-1, Bax ve Bcl-2 düzeyleri üzerindeki etkisi analiz edilmiştir. 80 µM katekol ile muamele edilmiş olan meme kanseri (MCF-7) ve dirençli meme kanseri (MDA-MB-231) hücrelerinde antiapoptotik Bcl-XL protein ekspresyonu seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir. Farklı katekol konsantrasyonları ile muamele edildiğinde her iki hücre hattında da Bcl-2 ekspresyonunda azalma görülürken Bax ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Her iki hücre hattında da artan Bax/Bcl-2 oranı apoptotik yolun aktive olduğunu göstermektedir (Vazhappily et al. 2020). Katekol muamelesi ile Bax'ın upregülasyonunu değerlendirmek için, 48 saat boyunca bu bileşiğe maruz bırakılan glioblastoma hücrelerinde (GL-15) Western blot analizi yapılmıştır. Artan konsantrasyonlarda uygulanan katekol, Bax seviyesinde 100 mM'dan sonra artışa neden olurken Bcl-2 seviyesinde 600 mM'dan sonra bir azalmaya neden olmuştur (de Oliveira et al. 2010). Yukarıda tartışılan çalışmalar bizim bulgularımız ile paralellik göstermektedir. Katekolün hücrelerde Bax/Bcl-2 oranını arttırmada etkin bir rol oynadığı ve apoptozise neden olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda Bax/Bcl-2 oranının P-H1299 ve R-H1299 arttığı, B_j hücrelerinde ise azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum katekolün P-H1299 ve R-H1299 hücrelerinde apoptozisi tetiklediğini göstermektedir. B_j hücrelerinde ise antiapoptotik yolak yönünde bir eğilimin varlığından söz edilebilir.

Akciğer kanseri hücrelerinde Bax/Bcl-2 seviyesini arttırarak apoptotik yolu aktive etme potansiyeli belirlenen katekolün bir DNA polimeraz bileşeni olan ve hücredeki antiproliferatif etkiyi gösteren PCNA ekspresyonu ve hücre döngüsü üzerindeki etkisini incelemek amacıyla G1 fazından S fazına geçiş sırasında aktive olan siklin D1'in ekspresyonuna etkisi de ölçülmüştür. Katekol muamelesinden sonra P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde siklin D1 ve PCNA ekspresyon seviyelerinin kontrole kıyasla daha düşük olduğu ölçülmüştür. Bu sonuçlar bize katekolün hücrelerimizde proliferasyonu azaltarak hücre döngüsünü azalttığını ve yavaşlattığını göstermektedir. Lim ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada katekolün mürin ve insan akciğer kanserinde (KP2 ve H460) hücre döngüsü düzenleyicileri olan CDK-siklin kompleksi üzerine etkileri propidyum iyodür boyamanın floresans görüntüsü incelenerek belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlarda her iki hücre hattında da CDK2, CDK4 ve bunların düzenleyici ortakları olan siklin E ve siklin D1'in ekspresyonunda doza bağlı bir şekilde azalma olduğu görülmüştür (Lim et al. 2016). *Semecarpus anacardium*'dan izole edilen katekol bileşiğine (SA-3C) maruz kalan parental ve çoklu ilaca dirençli lösemi kanseri (CEM ve CEM/VLB) hücrelerinde hücre döngüsünün doza bağlı olarak inhibe olduğu flow sitometri analizi ile ortaya konulmuştur. CEM hücrelerinde kontrol grubunda G0/G1 evresindeki hücre yüzdeki %0,4 iken katekol maruziyetinden sonra %10,8'e yükselmiştir. Benzer şekilde G2/M evresinde hücre döngüsü bloke edilen hücre oranı da kontrole kıyasla 2 kat artmıştır. CEM/VLB hücrelerinde ise G0/G1 evresinde hücre döngüsü inhibisyonu kontrol grubuna göre yaklaşık 7 kat artmış olarak ölçülmüştür (Nair et al. 2009). Vazhappily ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada meme kanseri hücre hatlarında (MCF-7 ve MDA-MB-231) katekol kaynaklı hücre döngüsü inhibisyonu flow sitometri kullanılarak incelenmiştir. Katekolün yüksek dozları ile (40 ve 80 µM) 24 ve 48 saat muamele edilen hücrelerin yaklaşık %20'sinin kontrol grubuna göre G1 fazında durdurulduğu tespit edilmiştir. Daha sonra Western blot analizi ile hücre döngüsü proteinlerinin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Katekol (80 µM) uygulaması sonucunda MCF-7 hücrelerinde siklin E/CDK2 kompleksinin inhibe olduğu görülmüştür bu da hücrelerin G1 fazında durdurulduğunu desteklemektedir (Vazhappily et al. 2020).

Literatürde verilen sonuçlar ışığında katekolün akciğer kanseri hücrelerinde apoptozisi farklı mekanizmalar ile indükleyebildiği görülmüştür. Hücrelerde ölüm sinyalinin başlamasındaki en önemli olaylardan biri DNA hasarının meydana gelmesidir. Bilinen birçok antikanser ilacının mekanizması kanser hücrelerinde DNA hasarı oluşturma prensibine dayanır. Bu durumunda hücrede aktive olan DDR (DNA Damage Response) mekanizması proteinlerinin (ATM ve ATR) ekspresyon seviyeleri DNA'da meydana gelen hasarın boyutunu göstermektedir. Ökaryotik hücrelerde bulunan ATM ve ATR kinaz enzimleri DNA hasarına karşı oluşturulan cevapta önemli rol oynamaktadır. ATM ve ATR'nin işlevleri çok yakındır. DNA'da oluşan hasarın çeşidine bağlı olarak aktivasyonları meydana gelebilir. ATM, DNA'daki çift zincir kırıkları sonucunda aktive olurken, ATR ise DNA'daki tek zincir kırılmaları sonucunda aktive edilir. Çalışmamızda katekolün IC₅₀ konsantrasyonu ile muamele edilen P-H1299, R-H1299 ve Bj hücrelerinde hem ATM hem de ATR mRNA ekspresyonu kontrole göre yüksek bulunmuştur. ATM ve ATR'nin ekspresyonundaki artışa bağlı olarak katekolün akciğer kanseri hücreleri ve sağlıklı hücreler üzerinde DNA hasarına neden olduğu söylenebilir. Katekol P-H1299 hücrelerinde sağlıklı hücrelere kıyasla daha yüksek ATM ve ATR mRNA ekspresyonuna neden olarak DNA hasarının

boyutunu ortaya koymuştur. Buna ek olarak ATM ve ATR ekspresyonlarını arttırmada katekolün dirençli hücrelerde de etkili olduğu görülmüştür ancak bu etki sağlıklı hücrelerden daha yüksek değildir. Bu sonuç bize kanser tedavisinde kullanılan antikanser ilaçların ilaca dirençli hücrelere etkili olamayabileceğini göstermektedir. Vazhappily ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada katekolün bilinen sitotoksik etkisinin DNA hasarı ile ilişkili olup olmadığını incelemek amacıyla MCF-7 ve MDA MB-231 hücrelerinde DNA fragmentasyonu analiz edilmiştir. Katekol muamelesinden sonra her iki hücre hattında da DNA fragmentasyonunun gözlenmesi olası bir DDR mekanizmasını işaret etmektedir. DNA çift sarmal kopmalarını (DSB'ler) tanımlamak için erken bir işaretleyici olan γ -H2AX'in ifadesi analiz edildiğinde serinin 139 pozisyonlarındaki γ -H2AX fosforilasyonunun konsantrasyona bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla her iki hücre hattında da arttığı gözlenmiştir. Çalışmanın devamında bu hücrelerdeki DDR mekanizmasını daha iyi anlamak için ATR/ATM ve Chk1/Chk2'nin fosforilasyon seviyesi western blot ile analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda dirençli (MDA-MB-231) ve normal (MCF-7) meme kanseri hücre hatlarında birbirinden farklı bir DDR mekanizması olduğu görülmüştür. ATM'nin fosforilasyonunun, MDA-MB-231 hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, MDA MB-231 hücrelerinde ATR seviyesinin de arttığı kaydedilmiştir. Buna karşılık, artan katekol konsantrasyonu ile MCF-7 hücrelerinde ATR ekspresyonunda bir azalma ve Chk2 ekspresyonunda bir artma olduğu kaydedilmiştir. Ancak MDA-MB-231 hücrelerinde Chk1 veya Chk2 ekspresyonlarında bir farklılık gözlenmemiştir. DDR yanıt mekanizması, canlı hücrelerde önemli bir protein olan p53 tarafından düzenlenir ve genellikle hücresel yanıtın gidiş yönünü belirler (George et al. 2019). Konsantrasyona bağlı bir şekilde katekol ile muamele edildikten sonra MCF-7 hücrelerinde p53 ekspresyonunda bir artış gözlenirken, MDA-MB-231 hücrelerinde ekspresyonu değişmeden kalmıştır. Elde edilen sonuçlar katekolün MCF-7 hücrelerinde p53'e bağımlı ancak ATM/ATR'den bağımsız hücre ölümünü indükleyebildiğini, MDA-MB-231 hücrelerinde ise p53'ten bağımsız ve ATM/ATR'ye bağlı hücre ölümünü indükleyebildiğini göstermektedir (Vazhappily et al. 2020). de Oliveira ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada katekolün nükleer yoğunlaşma üzerindeki etkisini incelemek için hücreler Hoechst 33258 ile boyanarak kontrol hücrelerine karşı değerlendirilmiştir. Kontrol grubunda kromatin yoğunlaşması gözlenen çekirdek miktarı %8,1 olarak ölçülürken, 48 saat 600 μ M katekol uygulanan hücrelerde bu miktar %78'e yükselmiş olarak gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada yapılan Comet testi sonuçları 48 saat boyunca 600 mM katekol'e maruz bırakılan hücrelerde DNA hasarı olduğunu göstermiştir. Kontrol grubu hücrelerinde %14,4'ünde DNA hasarı gözlenirken katekole maruz kalan hücrelerde ise %55,8'inde DNA hasarı olduğu gözlemlenmiştir (de Oliveira et al. 2010). Katekolün çeşitli hücre hatlarında meydana getirdiği sitotoksik ve apoptotik etkinin farklı parametrelerle incelendiği çalışmalar da mevcuttur. Lima ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada katekolün (60 μ mol/L) nöroblastoma (N2a) hücrelerinde apoptozun bir belirteci olan annexin V proteinindeki artışa neden olduğu flow sitometri ile ortaya konulmuştur. Ayrıca Hoechst boyama yöntemi ile katekolün nükleer fragmentasyona neden olduğu da ortaya konulmuştur (Lima et al. 2008).

Tedavi için yüksek verimli teknolojiler kullanılarak yeni hedeflenebilir sinyal yolları araştırılıp belirlenebilecektir. Akciğer kanserine neden olan ve bilinen mutasyonları ya da sinyal yollarını hedef alan bileşenlerin keşfedilip geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Akciğer kanserinin farklı mutasyonlara sahip ve ilaca direnç

kazanmış hücre hatları yeni bileşen tespitleri için geliştirilmelidir. İlk ve ileri evrelerdeki klinik çalışmalar için yeni bileşikler belirlenmeli ve tedaviye uygun olarak tasarlanmalıdır.



6. SONUÇLAR

Bu çalışmada Cell Titer-Blue® Hücre Canlılığı testi ile katekolün parental akciğer kanseri hücreleri (P-H1299) ve epirubicin-HCl dirençli akciğer kanseri hücreleri (R-H1299) üzerine sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Katekolün sitotoksik etkisinin P-H1299 ve R-H1299 hücrelerinde sağlıklı fibroblast (Bj) hücrelerinden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca epirubicin-HCl dirençli (ilaca dirençli) H1299 hücrelerine 24 saat katekol uygulandıktan sonra elde edilen sonuçlara göre hesaplanan IC₅₀ değerinin parental H1299 hücrelerinden daha yüksek bulunması ilaca dirençli hücrelerin katekole karşıda bir miktar direnç gösterdiğini ortaya koymaktadır. Katekol ile muamele edilen P-H1299 ve R-H1299 hücrelerindeki kaspaz 3/7 aktivitesinin Bj hücrelerindeki aktiviteden yüksek olması katekolün kanser hücrelerindeki apoptotik potansiyelinin bir göstergesidir.

Katekol uygulamasına maruz kalan hücrelerde siklin D1 ve PCNA'nın mRNA ekspresyon seviyelerinin en çok P-H1299 hücrelerinde azaldığı görülmüştür. Katekol uygulaması, proapoptotik bir gen olan Bax'ın mRNA ekspresyonlarını arttırmada P-H1299 hücrelerinde diğer hücrelerden daha etkili olmuştur. Buna paralel olarak antiapoptotik bir gen olan Bcl-2'nin mRNA ekspresyonu da en çok P-H1299 hücrelerinde azalmıştır. Katekolün Bax/Bcl-2 oranına etkisine bakılarak P-H1299 ve R-H1299 hücrelerinde apoptotik etkiye neden olduğu ve Bj hücrelerinde ise antiapoptotik bir etkiye neden olduğu söylenebilir.

DNA hasarı durumunda aktive olan ATM ve ATR mRNA ekspresyonlarındaki katekole bağlı artış DNA'daki çift ve tek zincir kırıklarının oluşumunu ortaya koymuştur. Sağlıklı hücrelerle kıyaslandığında R-H1299 hücrelerinde ATM ve ATR mRNA ekspresyonu P-H1299 hücrelerinden daha düşük bulunmuştur. Katekol ile muameleden sonra tüm hücrelerde mRNA ekspresyon seviyeleri ölçülen genlerin (PCNA, siklin D1, Bax, Bcl-2, ATM ve ATR) içerisinde en fazla ATM ve ATR genlerinin mRNA ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Elde edilen veriler ışığında katekolün çoklu sinyal yolu ile apoptotik etkiye neden olduğu görülmüştür ancak tüm hücrelerde en etkili uyarılan sinyal yolunun DNA'da tek ve çift zincir kırıklarının varlığı ile açıklanan ATM ve ATR sinyal yolu olduğu ortaya konulmuştur.

Çalışmamız katekolün parental ve ilaca dirençli insan akciğer kanseri (H1299) hücrelerine olan apoptotik etkisinin sağlıklı hücreler ile kıyaslanarak açıklandığı ilk çalışma olup gelecekteki olası klinik stratejiler için yol gösterici olabilir. Katekolün kanser hücrelerinde en etkili olduğu ATM ve ATR sinyal yolağını hedef alan klinik antikanser ilaçlarının katekol ile kombine olarak tedavide kullanılması daha etkili bir antikanser etkiye sahip olabileceğinden bu sonuçlar gelecek çalışmalara ışık tutacaktır. Doğal bileşiklere dayalı alternatif tedavilerin canlılarda yan etkilerinin sentetik bileşiklerden daha düşük olması beklenmektedir ve doğal bileşiklerin kanser tedavisinde kullanılması ülke ekonomisine sağlayacağı katkı açısından önemlidir.

7. KAYNAKLAR

- Abotaleb, M. Samuel, S.M. Varghese, E. Varghese, S. Kubatka, P. Liskova, A. Büsselberg, D. 2018. Flavonoids in cancer and apoptosis. *Cancers (Basel)*, 11(1): 28.
- Adams, J.M. Cory, S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26(9): 1324-1337.
- Anonim 1: <https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri> [Son erişim tarihi: 10.05.2022].
- Anonim 2: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals/> [Son erişim tarihi: 26.05.2022].
- Anonymous 1: <https://gco.iarc.fr/> [Son erişim tarihi: 10.05.2022].
- Anonymous 2: <https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga> [Son erişim tarihi: 10.05.2022].
- Atkinson, T.J. 2008. A review of the role of benzene metabolites and mechanisms in malignant transformation: Summative evidence for a lack of research in nonmyelogenous cancer types. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 212(1): 1-10.
- Bade, B.C. Dela Cruz, C.S. 2020. Epidemiology, etiology, and prevention. *Clin Chest Med*, 41(1): 1-24.
- Barnard, W.G. 1926. The nature of the “oat-celled sarcoma” of the mediastinum. *J Pathol Bacteriol*, 29(3): 241-244.
- Blackford, A.N. Jackson, S.P. 2017. ATM, ATR, and DNA-PK: The trinity at the heart of the dna damage response. *Mol Cell*, 66(6): 801-817.
- Blaney, J.E. Jr. Matro, J.M. Murphy, B.R. Whitehead, S.S. 2005. Recombinant, live-attenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad, and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in rhesus monkeys. *J Virol*, 79(9): 5516-5528.
- Bolton, J.L. Pisha, E. Zhang, F. Qiu, S. 1998. Role of quinoids in estrogen carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*, 11: 1113-1127.
- Bonofiglio, D. Giordano, C. De Amicis, F. Lanzino, M. Andò, S. 2016. Natural Products as Promising Antitumoral Agents in Breast Cancer: Mechanisms of Action and Molecular Targets. *Mini Rev Med Chem*, 16(8): 596-604.
- Boyd, E.M. Meharg, A.A. Wright, J. Killham, K. 1997. Assessment of toxicological interactions of benzene and its primary degradation products (catechol and phenol) using a lux-modified bacterial bioassay. *Environ Toxicol Chem*, 16: 849-856.
- Bukowska, B. Kowalaska, S. 2004. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes, *Toxicol. Lett*, 152: 73-84.
- Cagle, P.T. Allen, T.C. Olsen, R.J. 2013. Lung cancer biomarkers: present status and future developments. *Arch Pathol Lab Med*, 137(9): 1191-98.

- Capasso, R. Evidente, A. Schivo, L. Orru, G. Marcialis, M.A. Cristinzio, G. 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J Appl Bacteriol*, 79: 393-398.
- Carrington, E.M. Zhan, Y. Brady, J.L. Zhang, J.G. Sutherland, R.M. Anstee, N.S. Schenk, R.L. Vikstrom, I.B. Delconte, R.B. Segal, D. Huntington, N.D. Bouillet, P. Tarlinton, D.M. Huang, D.C. Strasser, A. Cory, S. Herold, M.J. Lew, A.M. 2017. Anti-apoptotic proteins Bcl-2, MCL-1 and A1 summate collectively to maintain survival of immune cell populations both in vitro and in vivo. *Cell Death Differ*, 24(5): 878-888.
- Cavalcante, G.C. Schaan, A.P. Cabral, G.F. Santana-da-Silva, M.N. Pinto, P. Vidal, A.F. Ribeiro-Dos-Santos, A.A. 2019. Cell's Fate: An overview of the molecular biology and genetics of apoptosis. *Int J Mol Sci*, 20(17): 4133.
- Celepli, S. Bigat, İ. Celepli, P. Karagin, P.H. 2020. Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. *Güncel Gastroenteroloji Dergisi*, 24(3): 103-111.
- Chen, Z. Fillmore, C.M. Hammerman, P.S. Kim, C.F. Wong, K.K. 2014. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer*, 14: 535-546.
- Cheng, E.H. Wei, M.C. Weiler, S. Flavell, R.A. Mak, T.W. Lindsten, T. Korsmeyer, S.J. 2001. Bcl-2, Bcl-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*, 8(3): 705-711.
- Chipuk, J.E. Green, D.R. 2008. How do Bcl-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization. *Trends Cell Biol*, 18: 157-164.
- Choo, Z. Loh, A.H.P. Chen, Z.X. 2019. Destined to die: apoptosis and pediatric cancers. *Cancers (Basel)*, 11(11): 1623.
- Chouchane, S. Wooten, J.B. Tewes, F.J. Wittig, A. Müller, B.P. Veltel, D. Diekmann, J. 2006. Involvement of semiquinone radicals in the in vitro cytotoxicity of cigarette mainstream smoke. *Chem Res Toxicol*, 19(12): 1602-1610.
- Churg, A. 1994. Lung cancer cell type and occupational exposure. *Lung biology in health and disease*, 74: 413-436.
- Crawford, R.L. 1981. Lignin biodegradation and transformation. John Wiley and Sons, New York: USA. 154 s.
- Cummings, B.S. and Schnellmann R.G. 2002. Cisplatin-Induced Renal Cell Apoptosis: Caspase 3-Dependent and -Independent Pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 302: 8-17.
- Çakal, C. Katekolaminlerin Tayini İçin Mikro Toplam Analiz Sistemlerinin (µ-TAS) Geliştirilmesi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2010.
- D'Arcy, M.S. 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*, 43(6): 582-592.
- Dang, C.V. Lewis, B.C. 1997. Role of oncogenic transcription factor c-Myc in cell cycle regulation, apoptosis and metabolism. *J Biomed Sci*, 4: 269-278.
- de Oliveira, D.M. Pitanga, B.P. Grangeiro, M.S. Lima, R.M. Costa, M.F. Costa, S.L. Clarêncio, J. El-Bachá, R.S. 2010. Catechol cytotoxicity in vitro: induction of glioblastoma cell death by apoptosis. *Hum Exp Toxicol*, 29(3): 199-212.

- de Sousa, V.M.L. Carvalho, L. 2018. Heterogeneity in lung cancer. *Pathobiology*, 85: 96-107.
- Dinçel, G.Ç. Kul, O. 2016. Patolojik apoptozis ve tanı yöntemleri. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1): 86-108.
- Dobbs, N.A. Twelwes, C.J. Rizzi, P. Warwick, J.D. Metivier, E.M. Williams, R. Johnson, P.J. 1994. EPI in hepatocellular carcinoma: pharmacokinetics and clinical activity. *Cancer Chemother Pharmacol*, 34: 405-410.
- Dondossolaa, E. Dobroff, A.S. Marchio, S. Cardo-Vila, M. Hosoya, H. Libutti, S.K. Corti, A. Sidman, R.L. Arap, W. Pasqualini, R. 2016. Self-targeting of TNF-releasing cancer cells in preclinical models of primary and metastatic tumors. *Proc Natl Acad Sci*, 113: 2223-2228.
- Dou, J. L. 1990. Occupational medicine. Prentice-Hall International, USA, 594 s.
- Doyle, L. A. Yang, W. Abruzzo, L.V. Krogmann, T. Gao, Y. Rishi, A. K. Ross, D.D. 1998. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95(26), 15665 -15670.
- Duruiseaux, M. Esteller, M. 2018. Lung cancer epigenetics: from knowledge to applications. *Semin Cancer Biol*, 51: 116-128.
- Dustin, P.J. 1950. The action of mitotic poisons on normal and pathological blood cell formation. *Sang*, 21: 297.
- Elmore, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4): 495-516.
- Engel, N. Oppermann, C. Falodun, A. Kragl, U. 2011. Proliferative effects of five traditional Nigerian medicinal plant extracts on human breast and bone cancer cell lines. *J Ethnopharmacol*, 137(2): 1003-1010.
- Eroğul, Ş. 2015. Hidrokinon ve katekol tayini için Fe₃O₄ nanopartikül-grafen oksite dayanan elektrokimyasal sensör hazırlanması. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 78 s.
- Eskes, R. Desagher, S. Antonsson, B. Martinou, J.C. 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*, 20: 929-935.
- Fan, H. Peng, J. Hamann, M.T. Hu, J.F. 2008. Lamellarins and related pyrrole-derived alkaloids from marine organisms. *Chem. Rev*, 108: 264-287.
- Farago, A. F. Keane, F. K. 2018. Current standards for clinical management of small cell lung cancer. *Transl Lung Cancer Res*, 7(1), 69.
- Farkas, G.L. Kiraly, Z. 1962. Role of phenolic compounds in the physiology of plant diseases and disease resistance. *Phytopathology*, 44, 105-150.
- Flores-Romero, H. García-Sáez, A.J. 2019. The incomplete puzzle of the Bcl-2 proteins. *Cells*. 8(10): 1176.
- Fonseca, V. Bouloux, P-M. 1993. Pheochromocytoma and paraganglioma. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 7: 509-44.

- Fritz, H. Reineke, W. Schmidt, E. 1992. Toxicity of chlorobenzene on *Pseudomonas* sp. strain RHO1, a chlorobenzene-degrading strain. *Biodegradation*, 2: 165-170.
- García-Aranda, M. Pérez-Ruiz, E. Redondo, M. 2018. Bcl-2 inhibition to overcome resistance to chemo- and immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12): 3950.
- Garton, G.A. Williams, R.T. 1948. Studies in detoxication. 17. The fate of catechol in the rabbit and the characterization of catechol monoglucuronide. *Biochem J*, 43: 206-211.
- Gazdar, A.F. 2009. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: Role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, 28(1): 1-14.
- George, V.C. Ansari, S.A Chelakkot, V.S. Chelakkot, A.L. Chelakkot, C. Menon, V. Ramadan, W. Ethiraj, K.R. El-Awady, R. Mantso, T. Mitsiogianni, M. Panagiotidis, M.I. Dellaire, G. Vasantha Rupasinghe, H.P. 2019. DNA-dependent protein kinase: Epigenetic alterations and the role in genomic stability of cancer. *Mutat Res Rev*, 780: 92-105.
- George, V.C. Dellaire, G. Rupasinghe, H.P.V. 2017. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: Role in genome stability. *J Nutr Biochem*, 45: 1-14.
- George, V.C. Kumar, D.R.N. Suresh, P.K. Kumar, S. Kumar, R.A. 2013. Comparative Studies to Evaluate Relative in vitro Potency of Luteolin in Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HaCaT and A375 Cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14(2): 631-637.
- Ghosh, G. Lian, X. Kron, S.J. Palecek, S.P. 2012. Properties of resistant cells generated from lung cancer cell lines treated with EGFR inhibitors. *BMC Cancer*, 12(1): 95.
- Gloeckner, H. Jonuleit, T. Lemke, H.D. 2001. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye alamar blue (Tm). *J Immunol Methods*, 252: 131-138.
- Goldar, S. Khaniani, M.S. Derakhshan, S.M. Baradaran, B. 2015. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(6): 2129-2144.
- Gordon, E. Ravicz, J. Liu, S. Chawla, S. Hall, F. 2018. Cell cycle checkpoint control: The cyclin G1/Mdm2/p53 axis emerges as a strategic target for broad-spectrum cancer gene therapy-A review of molecular mechanisms for oncologists. *Molecular and Clinical Oncology*, 9(2): 115-134.
- Govindan, R. Ding, L. Griffith, M. Subramanian, J. Dees, N.D. Kanchi, K.L. Maher, C.A. Fulton, R. Fulton, L. Wallis, J. et al. 2012. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell*, 14; 150: 1121-34.
- Grant, C.E. Valdimarsson, G. Hipfner, D.R. Almquist, K.C. Cole, S.P. Deeley, R.G. 1994. Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural product drugs. *Cancer Res*, 54: 357-361.

- Greenblatt, M.S. Bennett, W.P. Hollstein, M. Harris, C.C. 1994. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 54: 4855-4878.
- Grilo, A. L. Mantalaris, A. 2019. Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnol Adv*, 37(3): 459-475.
- Halabi, M.F. Sheikh, B.Y. 2014. Anti-proliferative effect and phytochemical analysis of *Cymbopogon citratus* extract. *Biomed Res Int*, 906239.
- Hattula, M.L. Wasenius, V.M. Reunanen, H. Arstila, A.U. 1981. Acute toxicity of some chlorinated phenols, catechols and cresols to trout. *Bull Environ Contam Toxicol*, 26: 295-298.
- Hayakawa, F. Kimura, T. Maeda, T. Fujita, M. Sohmiya, H. Fujii, M. Ando, T. 1997. DNA cleavage reaction and linoleic acid peroxidation induced by tea catechins in the presence of cupric ion. *Biochim Biophys Acta*, 1336: 123-131.
- He, Z. Chen, A.Y. Rojanasakul, Y. Rankin, G.O. Chen, Y.C. Gallic acid, a phenolic compound, exerts anti-angiogenic effects via the PTEN/AKT/HIF-1 α /VEGF signaling pathway in ovarian cancer cells. *Oncol Rep*, 35: 291-297.
- Heist, R.S. Sequist, L.V. Engelman, J.A. 2012. Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *J Thorac Oncol*, 7: 924-933.
- Hellmer, L. Bolcsfoldi, G. 1992. An evaluation of the *E. coli* K-12 uvrB/recA DNA repair host-mediated assay. I. In vitro sensitivity of the bacteria to 61 compounds. *Mutat Res*, 272(2): 145-60.
- Heuvel, V.D. Harlow, E. 1993. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science*, 262: 2050-2054.
- Hill, B.T. Whelan, R.D.H. 1982. A comparison of the lethal and kinetic effects of doxorubicin and 4'-epi-doxorubicin in vitro. *Tumori*, 68: 29-37.
- Hong, S. Won, Y.J. Park, Y.R. Jung, K.W. Kong, H.J. Lee, E.S. 2017. Community of Population Based Regional Cancer R Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival, and prevalence in 2017. *Cancer Res Treat*, 52: 335-350.
- Hopkins, S.J. 1983. Epirubicin. *Drugs Future*, 8: 402-406.
- Hopper-Borge, E. Wangari-Talbot, J. 2014. Drug resistance mechanisms in non-small cell lung carcinoma. *J Can Res Updates*, 2(4): 265-282.
- Horn, A.S. Korf, J. Westerink, B.H.C. 1979. The Neurobiology of Dopamine. Westerink Academic Press London. New York, 723 s.
- Inamura, K. 2017. Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Front Oncol*, 7: 193.
- Inderjit, Dakshini K.M.M. Foy, C. L. 1999. Plant Ecology. CRC Press, New York, USA, 608 s.
- Iurlaro, R. Muñoz-Pinedo, C. 2016. Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *FEBS J*, 283(14): 2640-2652.

- Jansson, O. Motlagh, P.B. Persson, M. Henrikson, R. Grankvist, K. 1999. Increase in doxorubicin cytotoxicity by carvedilol inhibition of P-glycoprotein activity. *Biochem Pharmacol*, 58: 1801-1806.
- Jürgensmeier, J.M. Xie, Z. Deveraux, Q. Ellerby, L. Bredesen, D. Reed, J.C. 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci*, 95(9): 4997-5002.
- Kaldis, P. Russo, A.A. Chou, H.S. Pavletich, N.P. Solomon, M.J. 1998. Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities, *Mol Biol Cell*, 9(9): 2545-2560.
- Kale, J. Osterlund, E.J. Andrews, D.W. 2018. Bcl-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*, 25(1): 65-80.
- Kalkavan, H. Green, D.R. 2018. MOMP, cell suicide as a Bcl-2 family business. *Cell Death Differ*, 25(1): 46-55.
- Kang, C. Xu, Q. Martin, T.D. Li, M.Z. Demaria, M. Aron, L. Lu, T. Yankner, B.A. Campisi, J. Elledge, S.J. 2015. The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science*, 349: 5612.
- Kars, M.D. Iseri, O.D. Gündüz, U. Ural A.U. Arpacı, F. Molnar, J. 2006. Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. *Anticancer Res*, 26: 4559-4568.
- Kastan, M.B. Bartek, J. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer, *Nature*, 432: 316-323.
- Kastan, M.B. Onyekwere, O. Sidransky, D. Vogelstein, B. Craig, R.W. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, 51: 6304-6311.
- Kawabata, S. Oka, M. Soda, H. Shiozawa, K. Nakatomi, K. Tsurutani, J. Nakamura, Y. Doi, S. Kitazaki, T. Sugahara, K. et al. 2003. Expression and functional analyses of breast cancer resistance protein in lung cancer. *Clin Cancer Res*, 9: 3052-3057.
- Khodavirdipour, A. Piri, M. Jabbari, S. Keshavarzi, S. Safaralizadeh, R. Alikhani, M.Y. 2021. Apoptosis Detection Methods in Diagnosis of Cancer and Their Potential Role in Treatment: Advantages and Disadvantages: a Review. *J Gastrointest Cancer*, 52: 422-430.
- Kiefer, C.S. Claes, A.R. Nzayisenga, J.C. Pietra, S. Stanislas, T. Huser, A. Ikeda, Y. Grebe, M. 2015. Arabidopsis AIP1-2 restricted by WER-mediated patterning modulates planar polarity. *Development*, 142: 151-161.
- Kitazono, M. Sumizawa, T. Takebayashi, Y. Chen, Z.S. Furukawa, T. Nagayama, S. Tani, A. Takao, S. Aikou, T. Akiyama, S. 1999. Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells. *J Natl Cancer Inst*, 91: 1647-1653.
- Kocaçalışkan, I. Talan, I. Terzi, I. 2006. Antimicrobial activity of catechol and pyrogallol as allelochemicals. *Z Naturforsch C J Biosci*, 61(9-10): 639-642.

- Lemjabbar-Alaoui, H. Hassan, O.U. Yang, Y.W. Buchanan, P. 2015. Lung cancer: biology and treatment options. *Biochim Biophys Acta*, 1856: 189-210.
- Levine, B. Kroemer, G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132: 27-42.
- Lewis, R.J. 1993. Hawley's Condensed Chemical Dictionary. Van Nostrand Reinhold, New York, 981 s.
- Li, P. Nijhawan, D. Budihardjo, I. Srinivasula, S.M. Ahmad, M. Alnemri, E.S. Wang, X. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4): 479-489.
- Lim do, Y. Shin, S.H. Lee, M.H. Malakhova, M. Kurinov, I Wu, Q. Xu, J. Jiang, Y. Dong, Z. Liu, K. Lee, K.Y. et al. 2016. A natural small molecule, catechol, induces c-Myc degradation by directly targeting ERK2 in lung cancer. *Oncotarget*, 7: 35001-35014.
- Lim, W.C. Kim, H. Kim, Y.J. Jeon, B.N. Kang, H.B. Ko, H. 2020. Catechol inhibits epidermal growth factor-induced epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell-like properties in hepatocellular carcinoma cells. *Sci Rep*, 10(1): 7620.
- Lima, R.M. Alvarez, L.D. Costa, M.F. Costa, S.L. Clarêncio, J. El-Bachá, R.S. 2008. Cytotoxic effects of catechol to neuroblastoma N2a cells. *Gen Physiol Biophys*, 27(4): 306-314.
- Lindeman, N.I. Cagle, P.T. Beasley, M.B. Chitale, D.A. Dacic, S. Giaccone, G. Jenkins, R.B. Kwiatkowski, D.J. Saldivar, J.S. Squire, J. 2013. Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol*, 8: 823-859.
- Liu, W.J. Du, Y. Wen, R. Yang, M. Xu, J. 2020. Drug resistance to targeted therapeutic strategies in non-small cell lung cancer. *Pharmacol Ther*, 206: 107438.
- Lopes, G.L. Vattimo, E.F. Castro Junior, G.d. 2015. Identifying activating mutations in the EGFR gene: prognostic and therapeutic implications in non-small cell lung cancer. *J Bras Pneumol*, 41(4): 365-375.
- Luo, Y.H. Luo, L. Wampfler, J.A. Wang, Y. Liu, D. Chen, Y.M. Adjei, A.A. Midthun, D.E. Yang, P. 2019. 5-year overall survival in patients with lung cancer eligible or ineligible for screening according to US Preventive Services Task Force criteria: a prospective, observational cohort study. *Lancet Oncol*, 20: 1098-1108.
- Macurek, L. Benada, J. Müllers, E. Halim, V.A. Krejčíková, K. Burdová, K. Pecháčková, S. Hodný, Z. Lindqvist, A. Medema, R. H. et al. 2013. Downregulation of Wip1 phosphatase modulates the cellular threshold of DNA damage signaling in mitosis. *Cell Cycle*, 12: 251-262.
- Mahipal, A. Kothari, N. Gupta, S. 2014. Epidermal growth factor receptor inhibitors: coming of age. *Cancer Control*, 21: 74-79.
- Malumbres M. 2014. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology*, 15: 122.

- Mansoor, S. Gupta, N. Luczy-Bachman, G. Limb, G.A. Kuppermann, B.D. Kenney, M.C. 2010. Protective effects of memantine and epicatechin on catechol-induced toxicity on Muller " cells in vitro. *Toxicol*, 271: 107-114.
- Mason, H.S. Spencer, E. Yamazaki, I. 1961. Identification by electron spin resonance spectroscopy of the primary product of tyrosinase catalyzed catechol oxidation. *Biochem Biophys Res Commun*, 4: 236-238.
- Matsuura, K. Canfield, K. Feng, W. Kurokawa, M. 2016. Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *Int Rev Cell Mol Biol*, 327: 43-87.
- Mays, A.N. Osherooff, N. Xiao, Y. Wiemels, J.L. Felix, C.A. Byl, J.A. Saravanamuttu, K. Peniket, A. Corser, R. Chang, C. Hoyle, C. et al. 2010. Evidence for direct involvement of epirubicin in the formation of chromosomal translocations in (15;17) therapy-related acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 115(2): 326330.
- Mcdaniel, J. Pillai, S.D. 2002. Gel alignment and band scoring for DNA fingerprinting using Adobe Photoshop. *Biotechniques*, 32 (1): 120-123.
- McIlwain, D.R. Berger, T. Mak, T.W. 2013. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(4): 008656.
- McKay, G. El-Geundi, M. Nassar, M.M. 1997. Equilibrium studies for the adsorption of dyes on bagasse pith. *Adsorption Science & Technology*, 15(4): 251-270.
- Mens, M. M. Ghanbari, M. 2018. Cell cycle regulation of stem cells by microRNAs, *Stem Cell Rev Rep*, 14(3): 309-322.
- Min, H.Y. Lee, H.Y. 2021. Mechanisms of resistance to chemotherapy in non-small cell lung cancer. *Arch Pharm Res*, 44(2): 146-164.
- Mohammadi, Z. Samadi, F.Y. Rahmani, S. Mohammadi, Z. 2020. Chitosan-Raloxifene nanoparticle containing doxorubicin as a new double-effect targeting vehicle for breast cancer therapy. *Daru*, 28(2): 433-442.
- Mohana-Kumaran, N. Hill, D. S. Allen, J. D. Haass, N. K. 2014. Targeting the intrinsic apoptosis pathway as a strategy for melanoma therapy. *Pigment cell & melanoma research*, 27(4): 525-539.
- Moo-Puc, R. Caamal-Fuentes, E. Peraza-Sánchez, S.R. Slusarz, A. Jackson, G. Drenkhahn, S.K. Lubahn, D.B. 2015. Antiproliferative and Antiestrogenic Activities of Bonediol an Alkyl Catechol from *Bonellia macrocarpa*. *Biomed Res Int*, 847457.
- Moran, J.F. Klucas, R.V. Grayer, R.J. Abian, J. Becana, M. 1997. Complexes of iron with phenolic compounds from soybean nodules and other legume tissues: Prooxidant and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*, 22: 861-870.
- Mosca, L. Tempera, I. Lendaro, E. Di Francesco, L. D'Erme, M. 2008. Characterization of catechol-thioether-induced apoptosis in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of neuroscience research*, 86(4): 954-960.
- Nagatsu, T. Levitt, M. Udenfriend, S. 1964. Tyrosine hydroxylase. the initial step in norepinephrine biosynthesis. *The Journal of biological chemistry*, 239: 2910-2917.

- Nair, P.K. Melnick, S.J. Wnuk, S.F. Rapp, M. Escalon, E. Ramachandran, C. 2009. Isolation and characterization of an anticancer catechol compound from *Semecarpus anacardium*. *J Ethnopharmacol*, 122(3): 450-456.
- Neilson, A.H. Allard, A.S. Hynning, P.A. Remberger, M. 1991. Distribution, fate and persistence of organochlorine compounds formed during production of bleached pulp. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 30(1-2): 3-41.
- Nelson, D.L. Cox, M.M. 2005. Lehninger Biyokimyanın Temelleri. Palme Yayıncılık, Ankara, 1158 s.
- Nirmala, J.G. Lopus, M. 2020. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell biology and toxicology*, 36(2): 145-164.
- O'Connor M.J. 2015. Targeting the DNA Damage Response in Cancer. *Molecular cell*, 60(4): 547-560.
- Obeng, E. 2020. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. *Brazilian Journal of Biology*, 81.
- Oikawa, S. Hirosawa, I. Hirakawa, K. Kawanishi, S. 2001. Site specificity and mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic catechol. *Carcinogenesis*, 22(8): 1239-1245.
- Olcina, M. Lecane, P.S. Hammond, E.M. 2010. Targeting hypoxic cells through the DNA damage response. *Clinical Cancer Res*, 16(23): 5624-5629.
- Oshima, T. 1965. On the anaerobic metabolism of aromatic compounds in the presence of nitrate by soil microorganisms. *Z Allg Mikrobiol*, 5(5): 386-394.
- Ou, Y.H. Chung, P.H. Sun, T.P. Shieh, S.Y. 2005. p53 C-terminal phosphorylation by CHK1 and CHK2 participates in the regulation of DNA-damage-induced C-terminal acetylation. *Molecular biology of the cell*, 16(4): 1684-1695.
- Ozkan, A. Fişkin, K. 2004. Epirubicin HCl toxicity in human-liver derived hepatoma G2 cells. *Pol J Pharmacol*, 56(4), 435-444.
- Ozkan, A. 2007. Lymphokine-activated killer cell susceptibility in epirubicin-resistant and parental human non-small cell lung cancer (NSCLC). *Biologia*, 62(2), 232-237.
- Ozkan, A. Ayhan, A. Fiskin, K. 2004. Combined effect of epirubicin and lymphokine-activated killer cells on the resistant human breast cancer cells. *Cell biology and toxicology*, 20(5): 261-271.
- Öztürk, Ş. Duran, N. 2018. Antiproliferative effects of *Origanum syriacum* L. and *Myrtus communis* L. on human colon cancer cell line. *International Conference on Advanced Materials and Systems, (ICAMS)*, 255-260.
- Paraschiv, B. Diaconu, C.C. Dumitrache-Rujinski, S. Belaconi, I.N. Constantinescu, T. Stroescu, C.C. Dantes, E. Fildan, A.P. Bogdan, M.A. Toma, C.L. 2016. Treatment options in stage III non-small cell lung cancer. *Pneumologia (Bucharest, Romania)*, 65(2): 67-70.

- Pelinson, L.P. Assmann, C.E. Palma, T.V. da Cruz, I.B.M. Pillat, M.M. Manica, A. Stefanello, N. Weis, G.C.C. de Oliveira Alves, A. de Andrade, C.M. et al. Antiproliferative and apoptotic effects of caffeic acid on SK-Mel-28 human melanoma cancer cells. *Mol Biol Rep*, 46: 2085-2092.
- Pellack-Walker, P. Walker, J.K. Evans, H.H. Blumer, J.L. 1985. Relationship between the oxidation potential of benzene metabolites and their inhibitory effect on DNA synthesis in L5178YS cells. *Molecular pharmacology*, 28(6): 560-566.
- Peña-Blanco, A. García-Sáez, A.J. 2018. Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis. *FEBS J*, 285(3): 416-431.
- Perry, M.C. 2008. The Chemotherapy Source Book. Lippincott Williams & Wilkins, 779 s.
- Pesch, B. Kendzia, B. Gustavsson, P. Jöckel, K.H. Johnen, G. Pohlabein, H. Olsson, A. Ahrens, W. Gross, I.M. Brüske, I. et al. 2012. Cigarette smoking and lung cancer--relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. *International journal of cancer*, 131(5): 1210-1219.
- Pfeffer, C.M. Singh, A. 2018. Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2): 448.
- Pistritto, G. Trisciuglio, D. Ceci, C. Garufi, A. D'Orazi, G. 2016. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, 8(4): 603-619.
- Plumbridge, T.W. Brown, J.R. 1978. Studies on the mode of interaction of 4'-epidoxorubicin and 4-demethoxydaunomycin with DNA. *Biochem. Pharmacol*, 27: 1881-1882.
- Porteous, J.W. Williams, R.T. 1948. Studies in detoxication 20. The metabolism of benzene. II. The isolation of phenol, catechol, quinol and hydroxyquinol from the ethereal sulfate fraction of the urine of rabbits receiving benzene orally. *Biochem J*, 44: 56-61.
- Pryor, W.A. Stone, K. Zang, L.-Y. Bermúdez, E. 1998. Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: Fractions that contain the tar radical cause DNA damage. *Chem Res Toxicol*, 11: 441-448.
- Rahouti, M. Steiman, R. Seigle-Murandi, F. Chritov, L.P. 1999. Growth of 1044 strains and species of fungi on 7 phenolic lignin model compounds. *Chemosphere*, 38: 2549-2559.
- Rampino, N. Yamamoto, H. Ionov, Y. Li, Y. Sawai, H. Reed, J. C. Peruchó, M. 1997. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science (New York, N.Y.)*, 275(5302): 967-969.
- Razak, N.A. Abu, N. Ho, W.Y. Zambari, N.R. Tan, S.W. Alitheen, N.B. Long, K. Yeap, S.K. 2019. Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. *Scientific reports*, 9(1): 1514.

- Reed J.C. 2008. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects. *Blood*, 111(7): 3322-3330.
- S Ramadan, W. Saleh, E.M. Menon, V. Vazhappilly, C.G. Abdu-Allah, H. El-Shorbagi, A.A. Mansour, W. El-Awady, R. 2020. Induction of DNA damage, apoptosis and cell cycle perturbation mediate cytotoxic activity of new 5-aminosalicylate-4-thiazolinone hybrid derivatives. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 131: 110571.
- Scagliotti, G.V. Novello, S. Selvaggi, G. 1999. Multidrug resistance in non-small-cell lung cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 10 Suppl 5: 83-86.
- Schabath, M. B. Cote, M.L. 2019. Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 28(10): 1563-1579.
- Scheff, R.J. Schneider, B.J. 2013. Non-small-cell lung cancer: treatment of late stage disease: chemotherapeutics and new frontiers. *Seminars in interventional radiology*, 30(2): 191-198.
- Scheffer, G.L. Schroeijers, A.B. Izquierdo, M.A. Wiemer, E.A. Scheper, R. J. 2000. Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug-resistant cancer. *Current opinion in oncology*, 12(6): 550-556.
- Schweigert, N. Acero, J.L. von Gunten, U. Canonica, S. Zehnder, A.J.B. Eggen, R.I.L. 2000. DNA degradation by the mixture of copper and catechol is caused by DNA-copper-oxo complexes, probably DNA-Cu (I) OOH. *Environ Mol Mutagen*, 36: 5-12.
- Schweigert, N. Zehnder, A.J. Eggen, R.I. 2001. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental microbiology*, 3(2): 81-91.
- Senderowicz, A.M. Sausville, E.A. 2000. Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(5): 376-387.
- Sève, P. Dumontet, C. 2005. Chemoresistance in non-small cell lung cancer. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*, 5(1): 73-88.
- Sgambato, A. Casaluze, F. Maione, P. Rossi, A. Ciardiello, F. Gridelli, C. 2014. Cetuximab in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): the showdown. *Journal of thoracic disease*, 6(6): 578-580.
- Sherr C.J. 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer research*, 60(14): 3689-3695.
- Shi Y. 2002. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular cell*, 9(3): 459-470.
- Shimada, M. Nakanishi, M. 2013. Response to DNA damage: why do we need to focus on protein phosphatases? *Frontiers in oncology*, 3: 8.

- Siddiqui, S. S. Rahman, S. Rupasinghe, H. Vazhappilly, C.G. 2020. Dietary Flavonoids in p53-Mediated Immune Dysfunctions Linking to Cancer Prevention. *Biomedicines*, 8(8): 286.
- Siddiqui, W.A. Ahad, A. Ahsan, H. 2015. The mystery of Bcl-2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update. *Archives of toxicology*, 89(3): 289-317.
- Silva, V.R. Corrêa, R.S. Santos, L.S. Soares, M. Batista, A.A. Bezerra, D.P. 2018. A ruthenium-based 5-fluorouracil complex with enhanced cytotoxicity and apoptosis induction action in HCT116 cells. *Scientific reports*, 8(1): 288.
- Singh, R. Letai, A. Sarosiek, K. 201). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of Bcl-2 family proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 20(3): 175-193.
- Sitarek, P. Skala, E. Toma, M. Wielanek, M. Szemraj, J. Skorski, T. Bialas, A.J. Sakowicz, T. Kowalczyk, T. Radek, M. et al. Transformed Root Extract of *Leonurus sibiricus* Induces Apoptosis through Intrinsic and Extrinsic Pathways in Various Grades of Human Glioma Cells. *Pathol. Oncol. Res*, 23: 679-687.
- Smythe W.R. 2001. Treatment of stage I and II non-small-cell lung cancer. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center*, 8(4): 318-325.
- Soussi, T. 2000. p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. *Cancer research*, 60(7): 1777-1788.
- Steenken, S. Neta, P. 1979. Electron transfer rates and equilibria between substituted phenoxide ions and phenoxyl radicals. *The Journal of Physical Chemistry*, 83(9): 1134-1137.
- Stone, K, Bermúdez, E. Zang, L.Y. Carter, K.M. Queenan, K.E. Pryor, W.A. 1995. The ESR properties, DNA nicking, and DNA association of aged solutions of catechol versus aqueous extracts of tar from cigarette smoke. *Archives of biochemistry and biophysics*, 319(1): 196-203.
- Sugawara, I. Yamada, H. Nakamura, H. Sumizawa, T. Akiyama, S. Masunaga, A. Itoyama, S. 1995. Preferential expression of the multidrug-resistance-associated protein (MRP) in adenocarcinoma of the lung. *International journal of cancer*, 64(5): 322-325.
- Sun, B. Ross, S. M. Rowley, S. Adeleye, Y. Clewell, R.A. 2017. Contribution of ATM and ATR kinase pathways to p53-mediated response in etoposide and methyl methanesulfonate induced DNA damage. *Environmental and molecular mutagenesis*, 58(2): 72-83.
- Sun, W. Yuan, X, Tian, Y. Wu, H. Xu, H. Hu, G. Wu, K. 2015. Non-invasive approaches to monitor EGFR-TKI treatment in non-small-cell lung cancer. *Journal of hematology & oncology*, 8: 95.
- Suntur, M. 2021. Meme karsinomlarında immünohistokimyasal olarak siklin d1 ekspresyonunun intratümoral lenfositik yanıt ve diğer prognostik faktörler ile arasındaki ilişki. Uzmanlık Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Rize, 60 s.
- Suriguga, Li, X. F. Li, Y. Yu, C. H. Li, Y. R. Yi, Z. C. 2013. The role of catechol-O-methyltransferase in catechol-enhanced erythroid differentiation of K562 cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 273(3): 635-643.

- Suster, D. I. Mino-Kenudson, M. 2020. Molecular Pathology of Primary Non-small Cell Lung Cancer. *Archives of medical research*, 51(8): 784-798.
- Svenson, A. Hynning, P.-AE. 1997. Increased aquatic toxicity following photosynthetic conversion of an organochlorine pollutant. *Chemosphere*, 34: 1685-1692.
- Taylor, R.C. Cullen, S.P. Martin, S.J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(3): 231-241.
- Toptaş, B. Ateş-Alagöz, Z. 2016. Kurkumin ve analoglarının antikanserojen etkileri. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 40(2): 58-82.
- Tressl, R. Grünewald, K.G. Köppler, H. Silwar, R. 1978. Flüchtige Phenole in Röstkaffees verschiedener Sorten. I [Phenols in roasted coffees of different varieties. I. (author's transl)]. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 167(2): 108-110.
- Tsvetkova, E. Goss, G.D. 2012. Drug resistance and its significance for treatment decisions in non-small-cell lung cancer. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 19: 45-51.
- Twelves, C.J. Dobbs, N.A. Michael, Y. Summers, L.A. Gregory, W. Harper, P.G. Rubens, R.D. Richards, M.A. 1992. Clinical pharmacokinetics of epirubicin: the importance of liver biochemistry tests. *British journal of cancer*, 66(4): 765-769.
- Ulakoglu, G. Altun, S. 2004. The effects of epirubicin on proliferation and DNA synthesis of Ehrlich ascites carcinoma cells in vitro and in vivo. *Biologia. Section Cellular and Molecular Biology*, 596: 727-734.
- Ulukaya, E. 2001. Akciğer Kanseri, Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar: Hücre Siklusu ve Apoptozis. Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul.
- Van Den Heuvel, R.L. Leppens, H. Schoeters, G.E. 1999. Lead and catechol hematotoxicity in vitro using human and murine hematopoietic progenitor cells. *Cell biology and toxicology*, 15(2): 101-110.
- van der Meer, J.R. de Vos, W.M. Harayama, S. Zehnder, A.J. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiological reviews*, 56(4): 677-694.
- Varagnat, J. Poulenc, R. 2005. Hidrokinon, Resorsinol, Catechol. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4th Edition, 100 s.
- Vazhappilly, C.G. Ansari, S.A. Al-Jaleeli, R. Al-Azawi, A.M. Ramadan, W.S. Menon, V., Hodeify, R. Siddiqui, S.S. Merheb, M. et al. 2019. Role of flavonoids in thrombotic, cardiovascular, and inflammatory diseases. *Inflammopharmacol*, 27(5): 863-869.
- Vazhappilly, C.G. Hodeify, R. Siddiqui, S.S. Laham, A.J. Menon, V. El-Awady, R. Matar, R. Merheb, M. Marton, J. Al Zouabi, H. et al. 2021. Natural compound catechol induces DNA damage, apoptosis, and G1 cell cycle arrest in breast cancer cells. *Phytotherapy research*, 35(4): 2185-2199.
- Vazhappilly, C.G. Saleh, E. Ramadan, W. Menon, V. Al-Azawi, A.M. Tarazi, H. Abdu-Allah, H. El-Shorbagi, A.N. El-Awady, R. 2019. Inhibition of SHP2 by new compounds induces differential effects on RAS/RAF/ERK and PI3K/AKT

- pathways in different cancer cell types. *Investigational new drugs*, 37(2): 252-261.
- Verma M. 2012. Personalized medicine and cancer. *Journal of personalized medicine*, 2(1): 1-14.
- Vermeulen, K. Van Bockstaele, D.R. Berneman, Z.N. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3): 131-149.
- Volm, M. Mattern, J. Koomägi, R. 1997. Expression of lung resistance-related protein (LRP) in non-small cell lung carcinomas of smokers and non-smokers and its predictive value for doxorubicin resistance. *Anti-cancer drugs*, 8(10): 931-936.
- Vyvyan, J.R. 2002. Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*, 58(9): 1631-1646.
- Wang, X. Goldstein, D. Crowe, P.J. Yang, J.L. 2016. Next-generation EGFR/HER tyrosine kinase inhibitors for the treatment of patients with non-small-cell lung cancer harboring EGFR mutations: a review of the evidence. *OncoTargets and therapy*, 9: 5461-5473.
- Wang, Y.J. Niu, X.P. Yang, L. Han, Z. Ma, Y.J. 2013. Effects of celecoxib on cycle kinetics of gastric cancer cells and protein expression of cytochrome C and caspase-9. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 14(4): 2343-2347.
- Warren, C. Wong-Brown, M. W. Bowden, N.A. 2019. Bcl-2 family isoforms in apoptosis and cancer. *Cell death & disease*, 10(3): 177.
- Wei, M.C. Zong, W.X. Cheng, E.H. Lindsten, T. Panoutsakopoulou, V. Ross, A.J. Roth, K.A. MacGregor, G.R. Thompson, C.B. Korsmeyer, S. J. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292(5517): 727-730.
- Weil, P. 2018. DNA organization, replication and repair. Harper's Illustrated Biochemistry, McGraw Hill, 31e.
- Westover, D. Zugazagoitia, J. Cho, B. C. Lovly, C. M. Paz-Ares, L. 2018. Mechanisms of acquired resistance to first- and second-generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 29(1): 10-19.
- Westphal, D. Dewson, G. Czabotar, P.E. Kluck, R.M. 2011. Molecular biology of Bax and Bak activation and action. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(4): 521-531.
- Wojcieszynska, D. Hupert, K.K. Jankowska, A. Guzik, U. 2012. Properties of catechol 2,3-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels. *Biochem Eng J*. 6:1.
- Wong R.S. 2011. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 30(1): 87.
- Wongvaranon, P. Pongrakhananon, V. Chunchacha, P. Chanvorachote, P. 2013. Acquired resistance to chemotherapy in lung cancer cells mediated by prolonged nitric oxide exposure. *Anticancer research*, 33(12): 5433-5444.

- Yohe, S. Thyagarajan, B. 2017. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 141(11): 1544-1557.
- Yoon, S. Park, S.J. Han, J.H. Kang, J.H. Kim, J.H. Lee, J. Park, S. Shin, H.J. Kim, K. Yun, M. et al. 2014. Caspase-dependent cell death-associated release of nucleosome and damage-associated molecular patterns. *Cell death & disease*, 5(10): e1494.
- Young, R.C. Ozols, R.F. Myers, C.E. 1981. The anthracycline antineoplastic drugs. *The New England journal of medicine*, 305(3): 139-153.
- Yu, J. Xiao, J. Yang, Y. Cao, B. 2015. Oxaliplatin-Based Doublets Versus Cisplatin or Carboplatin-Based Doublets in the First-Line Treatment of Advanced Nonsmall Cell Lung Cancer. *Medicine*, 94(27): e1072.
- Yüksel, B. Handemir Kılıç, S. Taşdemir, N. Batıoğlu, S. 2008. Apoptosis ve kaspaz sistemi. *Jinekoloji Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi*, 10: 58.
- Zannini, L. Delia, D. Buscemi, G. 2014. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *Journal of molecular cell biology*, 6(6): 442-457.
- Zhang, S. Zhou, L. Zhang, M. Wang, Y. Wang, M. Du, J. Gu, W. Kui, F. Li, J. Geng, S. et al. 2020. Berberine Maintains the Neutrophil N1 Phenotype to Reverse Cancer Cell Resistance to Doxorubicin. *Frontiers in pharmacology*, 10: 1658.

ÖZGEÇMİŞ
Zeynep DEMİR

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2020- 2022	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2016-2020	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- 1. Zeynep Demir, Aysun Özkan. 2018. Saponinlerin Antikanser Etki Mekanizmalarının Araştırılması. 1st INTERNATIONAL HEALTH SCIENCE and LIFE CONGRESS (IHSLC 2018). Burdur/Türkiye , ("Sözlü Bildiri" olarak sunulmuştur).**
- 2. Zeynep Demir, Aysun Özkan, İhsan Burak Çam, Esin Arı. 2018. Prooxidant and Antioxidant Effect of Root Extract Obtained from *Gypsophila bicolor* (Caryophyllaceae) in Lung and Epidermoid Cancer Cells. 1 st EBAT CONGRESS. Antalya/ Türkiye, (Poster Bildiri olarak sunulmuştur).**

3. **Zeynep Demir**, Aysun Özkan. 2020. *Vaccaria hispanica*'dan (Caryophyllaceae) Elde Edilen Tohum Ekstraktının Kanser Hücreleri (A549, A431) Üzerine Sitotoksik Etkisi. 2nd International Young Researchers Student Congress (IYRSC). Burdur/Türkiye , ("**Sözlü Bildiri**" olarak sunulmuştur).

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1. **Zeynep Demir**, Aysun Özkan. 2018. Saponinlerin Antioksidan Etki Mekanizmalarının Araştırılması. 24. Ulusal Biyoloji Kongresi, 10-14 Eylül, Manisa Celal Bayar Üniversitesi. Manisa/Türkiye (**Poster Bildiri olarak sunulmuştur**).

