



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



Doktora Tezi

**KİMYASAL AJANLARIN HÜCRE SİKLUSUNA ETKİSİ ve
MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI**

Gizem AKMAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Genel Biyoloji Programı

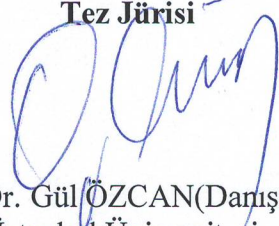
**DANIŞMAN
Prof. Dr. Gül ÖZCAN**

Haziran, 2019

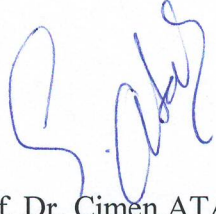
İSTANBUL

Bu çalışma, 28.06.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Genel Biyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

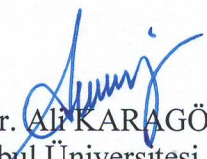
Tez Jürisi



Prof. Dr. Gül ÖZCAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



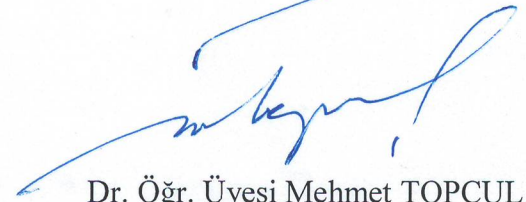
Prof. Dr. Çimen ATAK
İstanbul Kültür Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Prof. Dr. Ali KARAGÖZ
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Doç. Dr. Cenk KIĞ
İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Dr. Öğr. Üyesi Mehmet TOPÇUL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FDK-2017-23923 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu Doktora Tez çalışmasında, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan “Moleküler Kanseri Biyolojisi ve Biyoinformatik Araştırma Laboratuvarı”nda gerçekleştirilmiştir.

Doktora Tez çalışmam boyunca, bilgi ve deneyimleriyle beni aydınlatarak, sabrını, ilgisini ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam, Prof. Dr. Gül ÖZCAN'a en derin teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamda yardımlarıyla her zaman yanımda olan Dr. Öğr. Üyesi Nazlıhan AZTOPAL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen Dr. Özlem DAĞDEVİREN ÖZSÖYLEMEZ, Araş. Gör. Dr. İdil ÇETİN ve Doktora öğrencisi Ayşe Müge ŞAHİN'e teşekkürlerimi iletirim.

Bu süreçte tüm zorluklara benimle birlikte göğüs geren, benden manevi desteklerini ve yardımlarını asla esirgemeyen, bugünlere gelmemde en büyük rol sahibi olan değerli annem Ayşe Müjde AKMAN'a ve babam Ali Suat AKMAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2019

Gizem AKMAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	vii
TABLO LİSTESİ.....	xii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. HÜCRE SİKLUSU	4
2.1.1. Hücre Siklusunun Düzenlenmesi	6
2.2. AKCİĞER KANSERİ.....	13
2.3. CİSPLATİN	15
2.3.1. Cisplatinin Etki Mekanizması	16
2.4. PEMETREKSET DİSODYUM.....	19
2.4.1. Pemetrekset Disodyumun Etki Mekanizması.....	21
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	23
3.1. HÜCRE SOYLARI.....	23
3.1.1. A549 Hücre Soyu	23
3.1.2. BEAS-2B Hücre Soyu.....	23
3.2. HÜCRE PASAJI	23
3.3. HÜCRE EKİMİ.....	24
3.4. İLAÇ KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI	24
3.5. MİTOKONDİRİYAL DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ	25
3.6. MORFOLOJİK DEĞERLENDİRME	25
3.7. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME	25
3.7.1. Kaspaz Aktivasyon Analizi	25
3.8. MOLEKÜLER DEĞERLENDİRME	26
3.8.1. Total RNA İzolasyonu.....	26

3.8.2. cDNA Sentezi	27
3.8.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	27
3.8. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. SİTOTOKSİK ETKİLERİN BELİRLENMESİ	31
4.2. MORFOLOJİK DEĞERLENDİRME	55
4.3. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME	71
4.3.1. Kaspaz Aktivasyon Analizi	71
4.4. MOLEKÜLER DEĞERLENDİRME	76
4.4.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi.....	76
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	81
KAYNAKLAR.....	91
ÖZGEÇMİŞ	103

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Normal memeli hücrelerinde ve kanser hücrelerinde hücre siklusu (Malumbres ve Barbacid, 2009).	4
Şekil 2.2: Hücre siklusu kontrol noktaları (Anon-A, 2018).	6
Şekil 2.3: Hücre siklusunda yer alan moleküller (Anon-B, 2016).	7
Şekil 2.4: Türkiyede en sık görülen kanser türleri (Global Cancer Observatory-IARC, WHO, 2018).	14
Şekil 2.5: Cisplatinin yapısal formülü (Anon-C, 2012).	15
Şekil 2.6: Cisplatinin etki mekanizması (Anon-D, 2019).	17
Şekil 2.7: Pemetrekset disodyumun yapısal formülü (Anon-E, 2006).	20
Şekil 2.8: Pemetrekset disodyumun etki mekanizması (Velez ve diğ., 2012).	22
Şekil 4.1: 24 saat süresince A549 hücrelerine uygulanan Cisplatin konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm$ SD).	32
Şekil 4.2: 48 saat süresince A549 hücrelerine uygulanan Cisplatin konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm$ SD).	33
Şekil 4.3: 72 saat süresince A549 hücrelerine uygulanan Cisplatin konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm$ SD).	33
Şekil 4.4: Farklı Cisplatin konsantrasyonları uygulanan A549 hücrelerinde % inhibisyon değerleri.	34
Şekil 4.5: 24 saat süresince BEAS-2B hücrelerine uygulanan Cisplatin konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm$ SD).	35
Şekil 4.6: 48 saat süresince BEAS-2B hücrelerine uygulanan Cisplatin konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm$ SD).	36
Şekil 4.7: 72 saat süresince BEAS-2B hücrelerine uygulanan Cisplatin konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm$ SD).	36
Şekil 4.8: Farklı Cisplatin konsantrasyonları uygulanan BEAS-2B hücrelerinde % inhibisyon değerleri.	37
Şekil 4.9: 24 saat süresince A549 hücrelerine uygulanan Pemetrex konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm$ SD).	38

Şekil 4.10: 48 saat süresince A549 hücrelerine uygulanan Pentrex konsantrasyonlarında tespit edilen absorbands değerleri ($\pm$ SD).	39
Şekil 4.11: 72 saat süresince A549 hücrelerine uygulanan Pentrex konsantrasyonlarında tespit edilen absorbands değerleri ($\pm$ SD).	39
Şekil 4.12: Farklı Pentrex konsantrasyonları uygulanan A549 hücrelerine ait % inhibisyon grafiği.....	40
Şekil 4.13: 24 saat süresince BEAS-2B hücrelerine uygulanan Pentrex konsantrasyonlarında tespit edilen absorbands değerleri ($\pm$ SD).	41
Şekil 4.14: 48 saat süresince BEAS-2B hücrelerine uygulanan Pentrex konsantrasyonlarında tespit edilen absorbands değerleri ($\pm$ SD).	42
Şekil 4.15: 72 saat süresince BEAS-2B hücrelerine uygulanan Pentrex konsantrasyonlarında tespit edilen absorbands değerleri ($\pm$ SD).	42
Şekil 4.16: Farklı Pentrex konsantrasyonları uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait % inhibisyon grafiği.....	43
Şekil 4.17: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin ve Pentrex ilaçlarının tespit edilen absorbands değerleri ($\pm$ SD).	45
Şekil 4.18: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin ve Pentrex ilaçlarının tespit edilen absorbands değerleri ($\pm$ SD).	45
Şekil 4.19: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin (D4: 40 μ M) ve Pentrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.	46
Şekil 4.20: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin (D5:80 μ M) ve Pentrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.....	46
Şekil 4.21: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin (D6:160 μ M) ve Pentrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.	47
Şekil 4.22: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin (D4: 40 μ M) ve Pentrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.	47
Şekil 4.23: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin (D5: 80 μ M) ve Pentrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.	48
Şekil 4.24: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin (D6: 160 μ M) ve Pentrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.	48
Şekil 4.25: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pentrex ve Cisplatin ilaçlarının tespit edilen absorbands değerleri ($\pm$ SD).	51
Şekil 4.26: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pentrex ve Cisplatin ilaçlarının tespit edilen absorbands değerleri ($\pm$ SD).	51

Şekil 4.27: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pentrex (D4: 1µM) ve Cisplatin (D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.....	52
Şekil 4.28: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pentrex (D5: 2 µM) ve Cisplatin (D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.....	52
Şekil 4.29: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pentrex (D6: 4µM) ve Cisplatin (D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.....	53
Şekil 4.30: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pentrex (D4: 1µM) ve Cisplatin (D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.	53
Şekil 4.31: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pentrex (D5: 2µM) ve Cisplatin (D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.	54
Şekil 4.32: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pentrex (D6: 4µM) ve Cisplatin (D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.	54
Şekil 4.33: A549 hücrelerinde Cisplatin'in çeşitli konsantrasyonlarının (D1: 5 µM, D2: 10 µM, D3: 20 µM, D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) 24 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).....	56
Şekil 4.34: A549 hücrelerinde Cisplatin'in çeşitli konsantrasyonlarının (D1: 5 µM, D2: 10 µM, D3: 20 µM, D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) 48 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).....	57
Şekil 4.35: A549 hücrelerinde Cisplatin'in çeşitli konsantrasyonlarının (D1: 5 µM, D2: 10 µM, D3: 20 µM, D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) 72 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).....	58
Şekil 4.36: BEAS-2B hücrelerinde Cisplatin'in çeşitli konsantrasyonlarının (D1: 5 µM, D2: 10 µM, D3: 20 µM, D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) 24 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).....	59
Şekil 4.37: BEAS-2B hücrelerinde Cisplatin'in çeşitli konsantrasyonlarının (D1: 5 µM, D2: 10 µM, D3: 20 µM, D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) 48 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).....	60
Şekil 4.38: BEAS-2B hücrelerinde Cisplatin'in çeşitli konsantrasyonlarının (D1: 5 µM, D2: 10 µM, D3: 20 µM, D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) 72 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).....	61
Şekil 4.39: A549 hücrelerinde Pentrex konsantrasyonlarının (D1: 0,125 µM, D2: 0,25 µM, D3: 0,5 µM, D4: 1 µM, D5: 2 µM, D6: 4 µM, D7:8 µM, D8:16 µM) 24 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).	62
Şekil 4.40: A549 hücrelerinde Pentrex konsantrasyonlarının (D1: 0,125 µM, D2: 0,25 µM, D3: 0,5 µM, D4: 1 µM, D5: 2 µM, D6: 4 µM, D7:8 µM, D8:16 µM) 48 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).	63

Şekil 4.41: A549 hücrelerinde Pemetrex konsantrasyonlarının (D1: 0,125 µM, D2: 0,25 µM, D3: 0,5 µM, D4: 1 µM, D5: 2 µM, D6: 4 µM, D7:8 µM, D8:16 µM) 72 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).	64
Şekil 4.42: BEAS-2B hücrelerinde Pemetrex konsantrasyonlarının (D1: 0,125 µM, D2: 0,25 µM, D3: 0,5 µM, D4: 1 µM, D5: 2 µM, D6: 4 µM, D7:8 µM, D8:16 µM) 24 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).	65
Şekil 4.43: BEAS-2B hücrelerinde Pemetrex konsantrasyonlarının (D1: 0,125 µM, D2: 0,25 µM, D3: 0,5 µM, D4: 1 µM, D5: 2 µM, D6: 4 µM, D7:8 µM, D8:16 µM) 48 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).	66
Şekil 4.44: BEAS-2B hücrelerinde Pemetrex konsantrasyonlarının (D1: 0,125 µM, D2: 0,25 µM, D3: 0,5 µM, D4: 1 µM, D5: 2 µM, D6: 4 µM, D7:8 µM, D8:16 µM) 72 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).	67
Şekil 4.45: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonlarının (Cisplatin D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM; Pemetrex D4:1 µM, D5:2 µM, D6:4 µM) faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).	68
Şekil 4.46: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pemetrex ve Cisplatin konsantrasyonlarının (Pemetrex D4:1 µM, D5:2 µM, D6:4 µM; Cisplatin D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).	69
Şekil 4.47: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonlarının (Cisplatin D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM; Pemetrex D4:1 µM, D5:2 µM, D6:4 µM) faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).	70
Şekil 4.48: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pemetrex ve Cisplatin konsantrasyonlarının (Pemetrex D4:1 µM, D5:2 µM, D6:4 µM; Cisplatin D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).	71
Şekil 4.49: 24 saat ara ile Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonları uygulanan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz 3,7 aktivasyonu (Cisplatin D4: 40 µM; Pemetrex D4:1 µM, D5:2 µM, D6:4 µM).	72
Şekil 4.50: 24 saat ara ile Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonları uygulanan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz 9 aktivasyonu (Cisplatin D4: 40 µM; Pemetrex D4:1 µM, D5:2 µM, D6:4 µM).	73
Şekil 4.51: 24 saat ara ile Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonları uygulanan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz 3,7 aktivasyonu (Cisplatin D5: 80 µM; Pemetrex D4:1 µM, D5:2 µM, D6:4 µM).	74
Şekil 4.52: 24 saat ara ile Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonları uygulanan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz 9 aktivasyonu (Cisplatin D5: 80 µM; Pemetrex D4:1 µM, D5:2 µM, D6:4 µM).	74
Şekil 4.53: 24 saat ara ile Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonları uygulanan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz 3,7 aktivasyonu (Cisplatin D6: 160 µM; Pemetrex D4:1 µM, D5:2 µM, D6:4 µM).	75

Şekil 4.54: 24 saat ara ile Cisplatin ve Pentrex konsantrasyonları uygulanan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz 9 aktivasyonu (Cisplatin D6: 160 µM; Pentrex D4:1 µM, D5:2 µM, D6:4 µM).	76
Şekil 4.55: Siklin ve siklin bağımlı kinaz genlerinin ifadesinde meydana gelen değişimler.	78
Şekil 4.56: CDKI, antiapoptotik ve DNA hasar tanıma ve tamir genlerinin ifadesinde meydana gelen değişimler.	78
Şekil 4.57: Siklin ve siklin bağımlı kinaz gen anlatımlarının hücre siklusu üzerindeki gösterimi.	79



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.1: cDNA sentez bileşenlerinin hazırlanması.	27
Tablo 3.2: qRT-PCR için kullanılan primer dizilimleri.	28
Tablo 3.3: PCR karışımı tablosu.....	30
Tablo 3.4: PCR cihazı programı tablosu.	30
Tablo 4.1: A549 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat Cisplatin uygulaması sonunda ölçülen absorbans ortalamaları ve standart sapma ($\pm$ SD) değerleri (D1: 5 μ M, D2: 10 μ M, D3: 20 μ M, D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M).	32
Tablo 4.2: BEAS-2B hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat Cisplatin uygulaması sonunda ölçülen absorbans ortalamaları ve standart sapma ($\pm$ SD) değerleri (D1: 5 μ M, D2: 10 μ M, D3: 20 μ M, D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M).	35
Tablo 4.3: A549 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat Pemetrex ilacının uygulanması sonunda ölçülen absorbans ortalamaları ve standart sapma ($\pm$ SD) değerleri (D1: 0,125 μ M, D2: 0,25 μ M, D3: 0,5 μ M, D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M, D7: 8 μ M, D8: 16 μ M).	38
Tablo 4.4: BEAS-2B hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat Pemetrex ilacının uygulanması sonunda ölçülen absorbans ortalamaları ve standart sapma ($\pm$ SD) değerleri (D1: 0,125 μ M, D2: 0,25 μ M, D3: 0,5 μ M, D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M, D7: 8 μ M, D8: 16 μ M).	41
Tablo 4.5: A549 ve BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının uygulanması sonunda ölçülen absorbans değerleri ($\pm$ SD)..	44
Tablo 4.6: A549 ve BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile Pemetrex ve Cisplatin ilaçlarının uygulanması sonunda ölçülen absorbans değerleri ($\pm$ SD)..	50
Tablo 4.7: A549 ve BEAS-2B hücreleri gen anlatımında katlı değişim.	77

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

%	: Yüzde
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
cm ²	: Santimetre kare
cm ³	: Santimetre küp
g	: Gram
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
°C	: Santigrat
γ	: Gama

Kisaltmalar	Açıklama
-------------	----------

APC/C	: Anafazı Teşvik Eden Kompleks / Siklosom
ATP	: Adenozin Trifosfat
Bcl-2	: B Hücre Lenfoması-2
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDK1	: Siklin Bağımlı Kinaz 1
CDK2	: Siklin Bağımlı Kinaz 2
CDK4	: Siklin Bağımlı Kinaz 4
CDK6	: Siklin Bağımlı Kinaz 6
cDNA	: Komplementer DNA
Ct	: Eşik
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FBS	: Fötal Bovin Serum
FC	: Eşik Döngüsü
GAPDH	: Gliseraldehid-3-fosfat dehidrojenaz

HBSS	: Hank's Dengeli Tuz Çözeltisi
IC₅₀	: Hücrelerin %50'sini öldüren doz/konsantrasyon
Mcl-1	: Apoptoz Regülatörü
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum-bromid
p53	: Tümör baskılayıcı p53
PARP1	: Poli (ADP-riboz) polimeraz -1 geni Aaaa
PLK-1	: Polo Benzeri Kinaz 1
qRT-PCR	: Kantitatif Gerçek zamanlı Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu
Rb	: Retinoblastoma geni
RNA	: Ribonükleik Asit
RPMI-1640	: Roswell Park Memorial Institute-1640
SCF	: Skp1 / Cullin / F-box
TOP1	: Topoizomeraz 1
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
XIAP	: X'e bağlı apoptoz inhibitör proteini

ÖZET

DOKTORA TEZİ

KİMYASAL AJANLARIN HÜCRE SİKLUSUNA ETKİSİ ve MOLEKÜLER MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Gizem AKMAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Gül ÖZCAN

Hücre siklusunun doğru bir şekilde düzenlenmesi, genomun kendini hatasız eşlemesi ve kromozomların düzgün ayrılması için büyük önem taşımaktadır. Bu süreçte görev yapan siklinler, siklin bağımlı kinazlar, kontrol noktaları ve tamir mekanizmalarında meydana gelen hasarlar hücrelerde kontrolsüz hücre bölünmesine neden olarak, kanser gelişimine neden olmaktadır.

Akciğer kanseri, dünyada kanser bağımlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir. Kemoterapi, akciğer kanseri hastalarının iyileşme oranlarını ve yaşam kalitelerini yükseltmektedir. Platin içerikli ilaçlar, birçok kanserin tedavisinde tercih edilmektedir. Antifolat türevi olan ilaçlar pleural mezoteliyom ve küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde platin içeren ilaçlar ile sıkça kombine olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, platin türevi olan Cisplatin ve antifolat türevi olan Pentrex'in akciğer kanser ve normal hücrelerinin, hücre siklusları üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla, Cisplatin ve Pentrex ilaçlarının ayrı ayrı ve 24 saat ara ile uygulanarak, A549 ve BEAS-2B hücrelerinde neden olduğu toksisite MTT yöntemi ile incelenmiştir. Cisplatin ilacının tek başına uygulandığında BEAS-2B hücrelerinde daha yüksek toksisiteye neden olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). Pentrex ilacı tek başına uygulandığında BEAS-2B hücrelerinde 48 ve 72 saat deney gruplarının A549 hücrelerine göre daha yüksek toksisiteye neden olduğu tespit edilmiştir ($p<0,01$). Önce Cisplatin, 24 saat sonra Pentrex ilaçları uygulanan deney

gruplarında ise A549 hücrelerinde oluşan toksisitenin BEAS-2B hücrelerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Önce Pemetrex, 24 saat sonra Cisplatin uygulanan deney gruplarında ise, her iki hücre soyunda da toksisiteye neden olduğu belirlenmiştir. Hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler faz kontrast mikroskobu ile belirlenmiştir. Kaspaz 3, 7 ve 9 aktivasyonunun A549 hücrelerinde arttığı tespit edilmiştir. Hücre siklusunda yer alan genlerin anlatımları qRT-PCR yöntemi ile gösterilmiştir. Siklin ve siklin bağımlı kinaz genler ile DNA tamir genlerinin A549 hücrelerinde aşağı regüle olurken, BEAS-2B hücrelerinde yukarı regüle oldukları saptanmıştır.

Sonuç olarak, elde edilen bulgular doğrultusunda, A549 hücreleri üzerinde en yüksek toksisitenin Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının 24 saat ara ile uygulanması sonucunda meydana geldiği belirlenmiştir. Bu çalışmada, kanserli hücre üzerinde toksisite yaratırken, normal hücre üzerinde toksik etkisi bulunmayan konsantrasyonla yapılan moleküler analizlerde, gen anlatım seviyeleri arasındaki farkın ortaya konmuş olması, bu bağlamda yapılacak diğer çalışmalara temel teşkil edecektir.

Haziran 2019, 122 sayfa.

Anahtar kelimeler: Hücre siklusu, in vitro, siklinler, CDK, kanser

SUMMARY

Ph.D. THESIS

EFFECT of CHEMICAL AGENTS on CELL CYCLE and INVESTIGATION of MOLECULAR MECHANISMS

Gizem AKMAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Gül ÖZCAN

The tight cycle of the cell cycle is essential for the genome duplication and the correct separation of chromosomes. Damages in cyclin, cyclin-dependent kinases, cell cycle checkpoints and repair mechanisms involved in this process cause uncontrolled cell division in cells and cause cancer development.

Lung cancer is one of the leading causes of cancer-dependent deaths in the world. Chemotherapy improves the recovery rates and quality of life of lung cancer patients. Platinum containing drugs are preferred in the treatment of many cancers. Antifolate derived drugs are often used in combination with platinum containing drugs in pleural mesothelioma and non-small cell lung cancer.

The aim of this study was to investigate the effects of platinum derivative Cisplatin and antifolate derivative Pentrex on lung cancer and normal cells on cell cycles.

For this purpose, the toxicity caused by Cisplatin and Pentrex separately and intermittently on A549 and BEAS-2B cells was investigated by MTT method. Cisplatin caused higher toxicity in BEAS-2B cells ($p < 0.01$). When Pentrex drug was applied alone, it was determined that BEAS-2B cells caused higher toxicity than the A549 cells in the 48 and 72 hours experimental groups ($p < 0.01$). The toxicity in A549 cells was higher in BEAS-2B cells in experimental

groups treated with Cisplatin and Pemetrex 24 hours later. The experimental groups in which Cisplatin was applied 24 hours after than Pemetrex, toxicity was detected in both cell lines. Morphological changes in the cells were determined by phase contrast microscopy. Activation of caspase 3, 7 and 9 was found to increase in A549 cells. The expression of the genes in the cell cycle at the molecular level was investigated by qRT-PCR method. Cyclin and cyclin-dependent kinase genes and DNA repair genes were downregulated in A549 cells and upregulated in BEAS-2B cells.

As a result, it was determined that the highest toxicity on A549 cells occurred after Pemetrex after Cisplatin drugs. While creating toxicity on cancerous cells, the difference between gene expression levels in molecular analyzes with concentration that does not have toxic effects on normal cells will be the basis of other studies in this context.

June 2019, 122 pages.

Keywords: Cell cycle, in vitro, cyclins, CDK, cancer

1. GİRİŞ

Hücre bölünmesi, sonuçta DNA'nın çoğalmasına ve yeni çoğaltılmış genomların iki yeni hücreye ayrılmasına yol açan, toplu olarak hücre siklusu olarak bilinen bir dizi olayı gerektirmektedir (Salazar-Roa ve Malumbres, 2017). Hücre siklusunda, siklinler ve siklin bağımlı kinazlar gibi ana hücre siklusu molekülleri, hücre siklusu ilerlemesini sıralı ve tek yönlü bir şekilde düzenlemektedir. Hücreler, genetik ve fonksiyonel bütünlüğü korumak amacıyla hücre siklusunda G1 evresi, DNA replikasyonunun gerçekleştiği S evresi, G2 evresi ve hücrelerin bölündüğü M evresi olmak üzere dört farklı evreden geçmektedir (Hustedt ve Durocher, 2017). Moleküler düzeyde, hücre döngüsünün ilerlemesi, siklinler ile kompleks oluşturan siklin bağımlı kinazların geçici ve ardışık aktivasyonuna dayanmaktadır. Siklin ve siklin bağımlı kinazların oluşturdıkları kompleksler, hücre siklusunun belirli zamanlarında çeşitli olayları tetiklemektedir (Satyanarayana ve Kaldis, 2009). Hücrelerin siklus içerisindeki ilerlemesi, bir önceki evrenin uygun şekilde tamamlanmasına bağlıdır. Geçici olarak bölünmeyi durdurmuş olan hücreler, G0 fazı denilen hareketsizlik evresine geçmektedir (Gaucher ve diğ., 2018). Hücre bölüneceği zaman mitojenik sinyaller, Siklin D ekspresyonunu indüklemektedir. Siklin D, CDK4 ve CDK6'ya bağlanarak, hücreyi G1 evresi boyunca geri döndürülemez bir şekilde ilerletmekte ve hücreyi replikasyona hazırlamaktadır. Siklin E protein seviyesi G1 evresinin sonuna doğru artmakta ve bunun sonucu olarak, hücrenin G1/S evresinden geçmesine neden olarak, DNA replikasyonunun başlamasını sağlayan Siklin E/CDK2 kompleksi oluşmaktadır. Siklin A, S evresinde ortaya çıkmaktadır. Katalitik alt birimi CDK2 ile birlikte, DNA replikasyonu ve S evresi ilerlemesi için gerekmektedir. Siklin B geni, S evresi sırasında transkribe olmakta ve Siklin B/CDK1 kompleksi G2 evresinin sonuna doğru en üst düzeye ulaşmaktadır (Gaucher ve diğ., 2018). Özelleşmiş CDK1 rezidüleri üzerindeki Wee1 kinazın aracılık ettiği fosforilasyon, başlangıçta mitozun zamanından önce başlamasından kaçınmak için Siklin B/CDK1 kompleksini inaktif tutmaktadır. Protein seviyeleri yeterince yükseldiğinde Siklin B, mitozu girişi teşvik eden CDK1 fosforilasyonunu tetiklemektedir. Bunların haricinde, Siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerinin kinaz aktivitesi, p16, p21, p27 gibi siklin bağımlı kinaz inhibitörleri tarafından oldukça sıkı bir biçimde düzenlenmektedir. Hücre siklusunda yer alan bu düzenleyicilerin aktivitesi hücre siklusunun doğruluğu ve sürekliliği açısından önem kazanmıştır (Hocheegger ve diğ., 2008).

Siklin bağımlı kinazların deregülasyonu, tümör gelişimine katkıda bulunan kontrolsüz hücre bölünmesine, genomik ve kromozomal instabiliteye neden olmaktadır (Kastan, 2005; Kops ve diğ., 2005). Siklin bağımlı kinazlar, genellikle kanserlerde hiperaktif durumdadır ve bunların uzun süreli proliferatif sinyalleri, malignansinin karakterize özelliğidir (Hanahan ve Weinberg, 2011; Goel ve diğ., 2018). Siklin bağımlı kinaz aktivitesinin inhibisyonu, tümörijenik proliferasyonu ve hastalık ilerlemesini sınırlandırmak için anahtar bir yaklaşımı temsil etmektedir (Casimiro ve diğ., 2017). Bu yüzden hücre çoğalmasını, genomik ve kromozomal kararsızlığı hedef alan moleküler tedaviler, önemli kombinasyonel hedefleri temsil edebilecek tamamlayıcı tedavi fırsatlarını temsil etmektedir (Malumbres ve Barbacid, 2009; Casimiro ve diğ., 2017). Ek olarak, antikanser ilaçları olarak siklin bağımlı kinazların sentetik inhibitörlerinin tasarlanması kemoterapi açısından önem kazanmıştır (Otto ve Sicinski, 2017).

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz olarak bölündüğü ve diğer dokuları istila edebildiği ve metastazla sonuçlanan heterojen malign hastalık olarak tanımlanmaktadır (Estanqueiro ve diğ., 2015). Dünya Sağlık Örgütü'nün son verilerine göre, kanser insidansı ve ölüm oranlarının yüksek ve artma eğiliminde olduğu bildirilmiştir. Akciğer, kolon ve mide kanserleri erkeklerde en önemli on ölüm nedeni arasında yer alırken; meme, kolon, akciğer, mide ve serviks kanserleri kadınlardaki en önemli on iki ölüm nedeni arasında yer almaktadır (Vlajinac ve diğ., 2006; Petrović ve Todorović, 2016).

İnsan malignitelerinin tedavisine multidisipliner yaklaşımlar, kanserin teşhis edildiği evreye bağlı olarak cerrahi, kemoterapi, radyasyon, immünoterapi gibi çeşitli tedavi yöntemlerini içermektedir (Petrović ve Todorović, 2016). Klinik olarak yararlı olan kemoterapötik ilaçlar, DNA, RNA, mRNA veya proteinlerin üretimini bloke etme, doğrudan DNA'ya zarar verme veya DNA replikasyonu veya kromozom ayrılması için gerekli bileşenleri inhibe etme gibi kanser hücresi büyümesi ve/veya proliferasyonu için gerekli işlemleri inhibe ederek, hücrelerde ölüm yollarını indüklemektedir (Petrović ve Todorović, 2016). Kanser hücrelerinin hücre bölünmelerinin durdurularak, ölüme teşvik edilmeleri, tedavi etkinliği açısından oldukça önem kazanmıştır.

Cisplatin, oldukça yaygın bir şekilde birçok solid kanser türünün tedavisinde kullanılan, önemli kemoterapötik ajanlardan birisidir. Cisplatinin etki mekanizmasını, DNA üzerindeki pürin bazlarıyla etkileşime girerek DNA hasarına neden olması, DNA tamir mekanizmalarına müdahale etmesi ve kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne neden olarak göstermektedir

(Petrović ve Todorović, 2016). Ayrıca hücre tipine ve ilacın uygulandığı konsantrasyona bağlı olarak, Cisplatin, transkripsiyon ve/veya DNA replikasyon mekanizmalarına müdahale ederek sitotoksisiteyi indüklemektedir. Bununla birlikte Cisplatin, kalsiyum sinyal yolları, hücre ölüm reseptörü sinyal yolları ve mitokondriyal yolları aktive etmektedir. Bu sinyal iletim yollarının aktivasyonu, apoptozu indükleyerek tümörleri yok etmektedir.

Pemetrekset disodyum, pürin ve pirimidin sentezlerinde yer alan birçok enzimi inhibe etme yeteneğine sahip olan, çok hedefli bir antifolattır. Pemetrekset, antiproliferatif aktivitesi için gerekli olan poli- γ -glutamilasyon ile hücre içi aktivasyona uğramaktadır. Poliglutamat türevler, hücre içi folat metabolizmasında görev alan üç ana enzimi inhibe etmektedir. Bu enzimler, timidilat sentaz, dihidrofolat redüktaz ve glisinamid ribonükleotid formiltransferazdır. Timidilat sentaz en önemli hedeftir. Özellikle küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde ve çok sayıda başka solid tümörde klinik aktivitesi gösterilen pemetrekset disodyum ayrıca Cisplatin ile kombine olarak pleural mezoteliyom kanserinde kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, kemoterapide oldukça sık olarak kullanılan Cisplatin ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri tedavisinde tercih edilen Pemtrex ilaçlarının, akciğer kanseri ve akciğer normal hücre hatları üzerinde tek başlarına ve birbiri ardına kullanıldığında meydana getirdiği etkilerin araştırılması ve ayrıca normal hücre hattı üzerine toksik etkisi olmayan ancak kanserli hücre hattı üzerine etki eden konsantrasyon bulunarak, bu konsantrasyonun hücre siklusu üzerindeki etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda, kimyasal ajanların sitotoksik etkisi MTT yöntemi gibi hücre kinetiği yöntemi ile, bu kimyasal ajanların hücrelerde meydana getirdiği morfolojik etkilerin görüntüleri ise faz kontrast mikroskopunda incelenmiştir. Hücrelerin apoptotik aktiviteleri Kaspaz 3,7 ve 9 aktivasyonu analizi ile florometrik olarak incelenirken, hücre siklusunda yer alan genlerin ifadesi de değerlendirilmiştir.

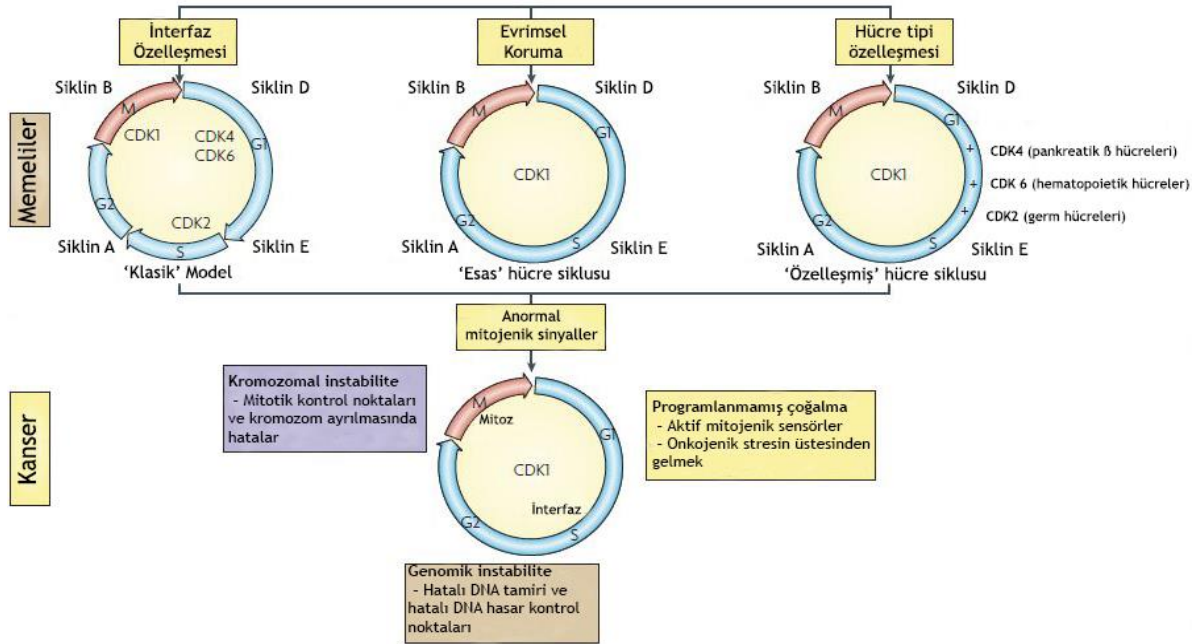
Bu bağlamda, çalışmamızda kullanılan parametreler ışığında günümüzde kanser tedavisinde sıkça kullanılan kemoterapi ilaçlarının kombine olarak kullanıldığında kanser ve normal hücre hatlarında hücre siklusu üzerine etkisinin belirlenmesi, kanser ve normal hücreler üzerindeki farkın ortaya konması, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve tedavi etkinliğinin artmasına katkı sağlayacaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. HÜCRE SIKLUSU

Hücre siklusu, hücrenin içeriğini iki katına çıkararak bölündüğü ve sonucunda aynı iki hücrenin oluştuğu oldukça organize ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş kompleks bir süreçtir. Bu süreçte, hücresel çoğalma için siklin ve siklin bağımlı kinaz proteinlerinin, onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerin, mitotik kontrol noktaları proteinlerini içeren birçok düzenleyici protein görev almaktadır (Wenzel ve Singh, 2018). Bu siklusun düzenlenmesinin, hücre büyümesi ve çoğalması için gerekli bir olay olduğu bilinmektedir. Hücre siklusu düzenlenmesi sırasında oluşan mutasyon ya da eksiklikler, kanser gibi önemli hastalıklara neden olabilmektedir.

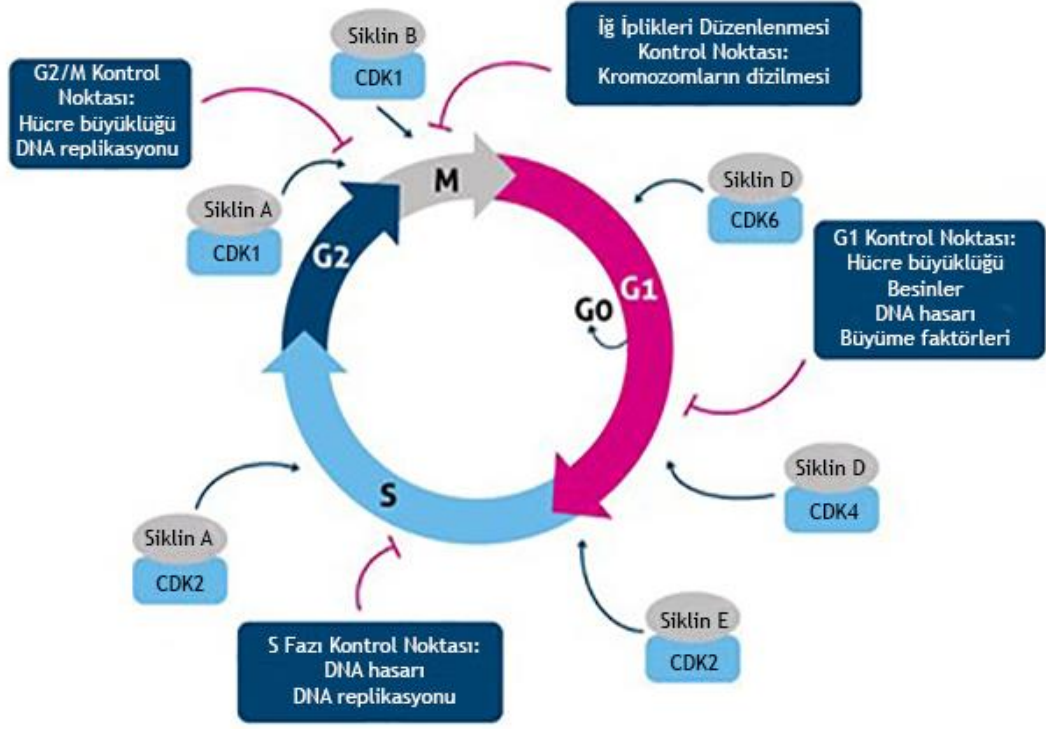
Kanser, hücre siklusunun normal olmayan aktivitesi ile karakterize edilmektedir. Kanser, sinyal yollarındaki mutasyonlardan kaynaklanabileceği gibi hücre siklusu proteinlerini kodlayan genlerdeki genetik lezyonların bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.1) (Otto ve Sicinski, 2017).



Şekil 2.1: Normal memeli hücrelerinde ve kanser hücrelerinde hücre siklusu (Malumbres ve Barbacid, 2009).

Hücre siklusunun düzenlenmesinde, büyüme düzenleyici ve genetik hasarı tespit etmek için genetik bütünlüğü izleyen sinyaller görev yapmaktadır. Hücre siklusunun evreleri siklin ve siklin bağımlı kinazlarla birlikte kompleks oluşturarak, hücre siklusunu sıkı bir şekilde düzenlemektedir. Hücre siklusunun kontrolü mitojenik sinyaller ile uyarılmakta ve DNA hasarına karşı hücre siklusu kontrol noktaları tarafından da inhibe edilebilmektedir (Otto ve Sicinski, 2017).

Hücre siklusu, G1, S ve G2 evrelerini içeren interfaz evresi ve mitotik evreden oluşmaktadır. İnterfaz sırasında, hücre büyüme ve DNA replikasyonu ile bölünmeye hazırlanmaktadır (Wenzel ve Singh, 2018). G1 evresi, bir önceki bölünmeye ait olan sitokinezin sonu ile S evresinin başlangıcı arasındaki süreçtir. Hücre bu evrede tekrar bölünmeye ya da dinlenme fazı olan G0'a girmeye karar vermektedir. Bu evrede, hücre bölünmeye karar verirse, DNA replikasyonu için hazırlanmaktadır. G1 evresinin erken safhasında büyüme faktörlerinin kaldırılması, hücreyi G0'a yönlendirmektedir (Schafer, 1998; Wenzel ve Singh, 2018). G1 evresi siklustaki en uzun evre olan büyüme evresidir. Bu evrede, birçok biyosentez olayı gerçekleşerek, hücreler için gerekli olan metabolitleri tedarik etmektedir. Hücreler protein sentezlemekte ve S evresinde gerçekleşecek olan DNA replikasyonu için hazırlanmaktadır (Icard ve diğ., 2019). S evresi sırasında, DNA replikasyonu meydana gelmekte ve her kromozom kendini eşleyerek, kardeş kromatidler oluşmaktadır (Wenzel ve Singh, 2018). G2 evresi, S ve mitoz evreleri arasındaki evreyi kapsamaktadır. G2 evresinde, hücreler membran oluşumu için gereken *de novo* lipid sentezini arttırmakta ve mitotik süreci başlatmaya hazır olmasını sağlamaktadır (Icard ve diğ., 2019). M evresi, siklusun diğer evrelerine göre daha kısa bir evredir. Bu evrede, hücrelerde kromozomların iğ ipliklerinin düzenlenmesi, bunu takiben ayrılmaları ve nüklear bölünme gerçekleşmektedir (Icard ve diğ., 2019). M evresi kendi içerisinde profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez olarak alt evrelere ayrılmaktadır (Morris ve diğ., 2019). Hücre siklusu aracılığıyla çoğalma sonucunda genetik açıdan aynı olan yavru hücreler meydana gelmektedir (Şekil 2.2) (Wenzel ve Singh, 2018).



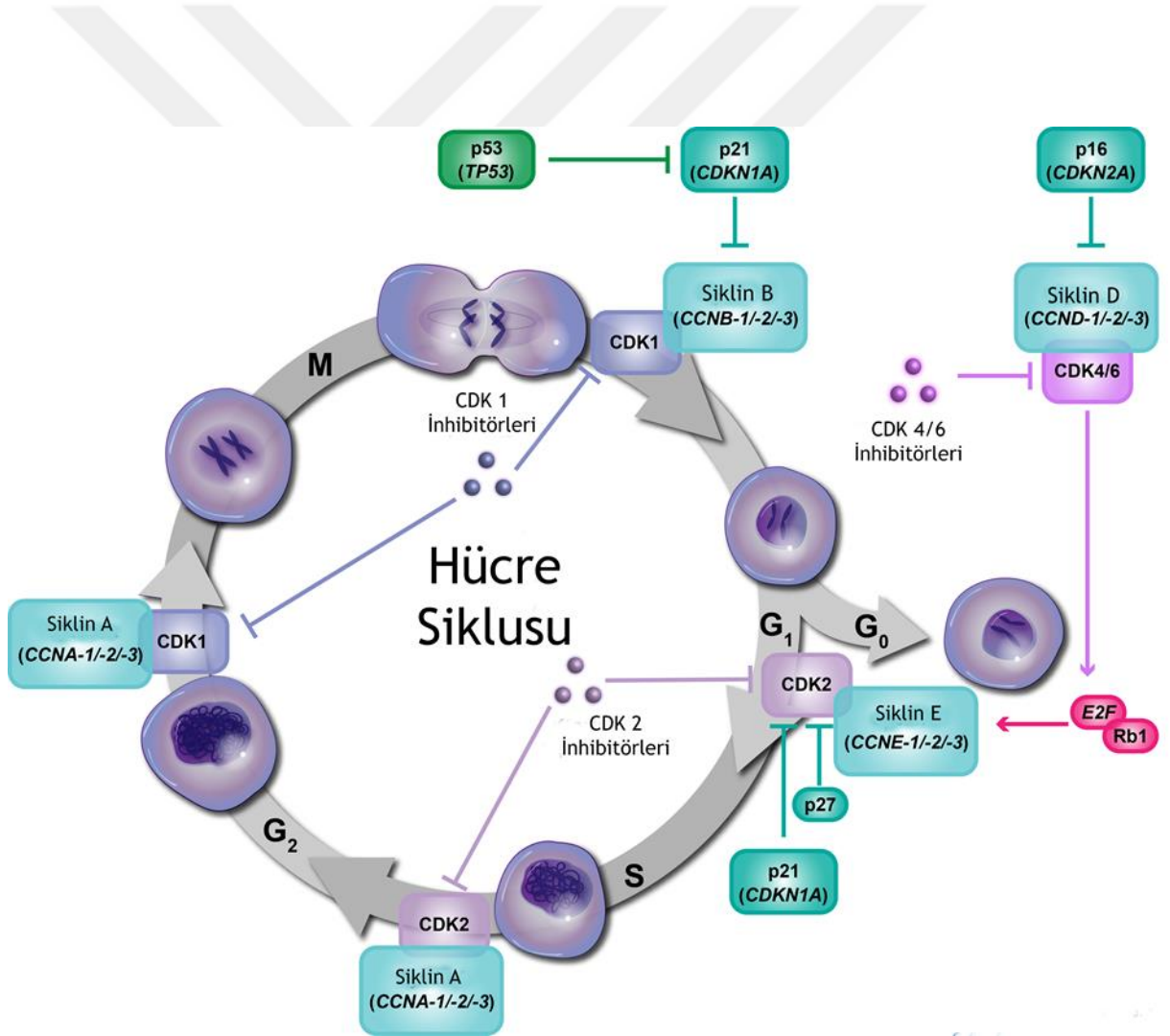
Şekil 2.2: Hücre siklusu kontrol noktaları (Anon-A, 2018).

Tümör hücreleri, programlanmamış çoğalmaya neden olan antimitojenik sinyallere karşı hatalı cevap ile sonuçlanan mutasyonları biriktirmektedir (Massague, 2004; Malumbres ve Barbacid, 2009). Bununla birlikte, birçok tümörde kromozomal instabilite gibi ek mutasyonlara neden olabilen genomik instabilite yer almaktadır (Kastan ve Bartek, 2004; Kops ve diğ., 2005). Bu mutasyonlar birlikte düşünüldüklerinde, sadece çoğalma avantajı olarak değil aynı zamanda tümörün ilerlemesine ve daha agresif fenotiplerin kazanılmasına katkıda bulunan ek genetik değişikliklerin birikimine karşı artan duyarlılıkla sonuçlanmaktadır. Programlanmamış çoğalma, genomik instabilite ve kromozomal instabilite gibi üç temel hücre siklusu hasarı, doğrudan ya da dolaylı olarak siklin bağımlı kinazların yanlış regülasyonuna neden olmaktadır (Malumbres ve Barbacid, 2009).

2.1.1. Hücre Siklusunun Düzenlenmesi

Hücre siklusunun düzenlenmesi, yavru hücrelerin doğru bir şekilde oluşması için gereklidir. Bu düzenlenmenin temeli, aktif olduklarında kompleks oluşturarak süreci katalizleyen siklin proteinleri ve siklin bağımlı kinazlarda yatmaktadır (Schafer, 1998; Wenzel ve Singh, 2018). Siklin proteinleri, holoenzimlerin düzenleyici alt üniteleridir. Siklin bağımlı kinazlar ile birlikte

hücre bölünmesi ve hücre siklusu ilerlemesini yönlendiren anahtar substratları fosforilleyerek görev yapmaktadırlar (Casimiro, 2017). Siklin bağımlı kinaz aktiviteleri, düzenleyici alt birim olan siklinlerin bağlanmasını gerektirmektedir. Siklinler, hücre siklusunun belirli zamanlarındaki sistematik sentezi ve yıkımı sonucunda, hücre siklusu düzenlenmesinin anahtar rolünü üstlenen siklin bağımlı kinazlar ile kompleks oluşturarak hücre siklusunda sadece belirli zamanlarda aktive olmaktadır (Darzynkiewicz ve diğ., 1996; Malumbres ve Barbacid, 2009). Bu komplekslerde, üç interfaz siklin bağımlı kinazı (CDK2, CDK4 ve CDK6) ve bir mitotik siklin bağımlı kinaz (CDK1 (hücre bölünme kontrol proteini 2 CDC2)) ve dört farklı sınıfa ait on siklin (A-, B-, D- ve E- tipi siklinler) yer almaktadır (Şekil 2.3) (Malumbres ve Barbacid, 2009).



Şekil 2.3: Hücre siklusunda yer alan moleküller (Anon-B, 2016).

CDK1, CDK2, CDK4, CDK6 hücre siklusu süreci sırasında oldukça önemli roller oynamaktadır. Bu süreç kanser hücrelerinde oldukça dengesizdir (Moncada ve diğ., 2012; Aarts ve diğ., 2013; Malumbres, 2014; Kalucka ve diğ., 2015; Kaplon ve diğ., 2015; Icard ve diğ., 2019). Büyüme faktörleri, G1 evresine girişi başlatmakta ve CDK4 veya CDK6 ile etkileşime giren siklin D1, D2 ve D3'ün aktivasyonunu indüklemektedir. Artan Siklin D/CDK4-CDK6 aktivitesi, retinoblastoma proteininin (pRB) fosforilasyonuna ve p53'ün etkisizleşmesine neden olarak, E2F'nin pRB-E2F kompleksinden salınmasını sağlamaktadır. Bu salınım, yeterli besin bulunmadığında hücre siklusunu durduran G1 sınırlama kontrol noktasının inaktivasyonuna yol açmaktadır (Icard ve diğ., 2019). Siklin E/CDK kompleksinin aktivasyonu, S evresine giriş için gerekli olan genlerin transkripsiyonuna neden olmaktadır. Siklin A/CDK2 kompleksi S evresinde, Siklin A/CDK1 kompleksi G2 evresinde, Siklin B/CDK1 kompleksi ise G2 sonundan mitozun bitişine kadar olan süreci ilerletmektedir (Moncada ve diğ., 2012; Malumbres, 2014). Polo benzeri kinaz 1 (PLK1) ve Aurora kinaz A/B gibi kinazlar da mitoz, kromozom ayrılması ve sitokinez süreçlerinde oldukça önem taşımaktadır (Aarts ve diğ., 2013). Hücre siklusunun geri dönüşümsüz ilerlemesi kademeli olarak biriken siklinlerin, iki E3 proteazomal ligaz (anafazi teşvik eden kompleks / siklosom (APC / C) ve Skp1 / Cullin / F-box (SCF)) tarafından belirli zamanlarda yıkılması nedeniyledir (Tudzarova ve diğ., 2011). Siklin bağımlı kinaz aktivitesi, iki inhibitör ailesi tarafından baskılanmaktadır. İlki, özel olarak CDK4 ve CDK6'ya bağlanan INK4 (p16, p15, p18 ve p19) ailesi, diğeri ise ana siklin bağımlı kinazları inhibe eden WAF1/CIP/KIP (p21, p27, p57) ailesidir (Malumbres ve Barbacid, 2009).. Bunların haricinde, özellikle CDK1 Wee1 ve Myt1 tarafından fosforillenerek inhibe edilebilmekte, bu olay mitozu girişi geçici olarak durdurmaktadır (Icard ve diğ., 2019). CDK1 inaktivasyonu Cdc25 fosfataz tarafından tersine çevrilebilmektedir (Aarts ve diğ., 2013; Malumbres, 2014). Kanser hücreleri, tümör baskılayıcı genlerin etkisizleştirilmesi veya mutasyonu ve onkogenlerin aşırı ekspresyonu veya amplifikasyonu, kontrolsüz hücre siklusu ilerlemesi ve mitozu yol açan, siklin/siklin bağımlı kinaz komplekslerinin yeniden düzenlenerek anormal transkripsiyonuyla sonuçlanan tüm değişiklikler nedeniyle bu inhibitör kontrol mekanizmalarının çoğunu kaybetmektedir (Icard ve diğ., 2019).

CDK4 ve CDK6, hücre döngüsünün G1 evresinden S evresine hücrel geçişi özel olarak düzenlemekte, CDK4 ve CDK6 inhibitörleri, G1 hücre siklusu yakalanmasını indükleyerek hassas kanser hücrelerinin proliferasyonunu etkili bir şekilde bloke etmektedir (Finn ve diğ., 2009). Hücre siklusuna girmek ve DNA replikasyonunu başlatmak için, bir hücrenin G1

fazından S fazına sıkıca ayarlanmış bir kısıtlama noktasından geçmesi gerekmektedir (Malumbres ve Barbacid, 2009; Goel ve diğ., 2018).

CDK aktivitesi INK4 proteinleri ve CIP/KIP ailesi olarak bilinen iki inhibitör ailesi ile düzenlenmektedir. CDK4 ve CDK6 aktivitelerinin deregülasyonu birçok tümör tipinde görülmektedir. Ayrıca D tip siklinlerin ve INK4 inhibitörlerin yanlış düzenlenmesi çoğu tümör tipinin ortak özelliği olarak bilinmektedir (Ortega ve diğ., 2002; Malumbres ve Barbacid, 2009). Bununla birlikte, E-tipi siklinlerin insan tümörlerinde sıklıkla aşırı eksprese edildiği, p21 ve p27 inhibitörlerinin ekspresyonunun tümör gelişimi sırasında sıklıkla susturulduğu bilinmektedir (Malumbres ve Barbacid, 2001). Bunlar, CDK2'nin insan kanserine potansiyel bir katılımı olduğunu göstermektedir. CDK aktivitesi ayrıca, hücrelerin önceki fazın başarıyla gerçekleştirildiğine emin olana kadar hücre siklusunun ilerlemesini önleyen kontrol noktaları ile de düzenlenir. Kontrol noktası kontrolünü etkileyen mutasyonlar, sonuçta malign transformasyona yol açan CDK aktivitesinin düzensizleşmesine neden olmaktadır (Malumbres ve Barbacid, 2009).

Tümör ile ilişkili mutasyonlar, sürekli çoğalmaya veya hücre siklusuna programlanmamış yeniden girişe yol açan bazı siklin-siklin bağımlı kinaz komplekslerini serbest bırakmaktadır. Bu durum çoğu insan tümör hücresinin iki özelliği olarak tanımlanmaktadır (Malumbres ve Barbacid, 2009). Hücre siklusu boyunca doğru ilerleme, DNA sentezi ve kromozom ayrılması sırasında olası hataları algılayan kontrol noktaları ile kontrol edilmektedir. Bu kontrol noktalarının aktivasyonu siklin bağımlı kinaz aktivitesinin düzenlenmesi yoluyla hücre siklusunun durmasını tetiklemektedir. Hücre siklusu kontrol noktaları, hücre siklustaki bir sonraki evreye geçmeden önceki her bir işlemin tamamlanmasından sorumludur. Bir kontrol noktasının aktivasyonu olası bir hatanın bulunduğu anlamına gelmektedir. Bunun sonucu olarak, siklin bağımlı kinaz seviyelerindeki değişim ve aktivasyon sayesinde hücre bulunduğu evre içinde tutulmakta ve uygun olmayan hücre bölünmesi engellenmektedir. Hücre siklusunun durması, hücrede bulunan hataları tamir etmesine fırsat vermekte, böylece bu hataların yavru hücrelere geçmesini önlemektedir. Sınırlama kontrol noktası (R kontrol noktası) esas olarak büyüme faktörlerinden, hücre büyüklüğünden, hücre besininden ve DNA hasarından etkilenmektedir (Zetterberg ve diğ., 1995; Schafer, 1998; Wenzel ve Singh, 2018). DNA replikasyon kontrol noktası, esas olarak uygun olmayan DNA replikasyonu ve hasarından etkilenmekte ve metafaz/anafaz kontrol noktası kromozomların dizilmesini denetlemektedir.

(Morris ve diğ., 2019). Bu kontrol noktalarında herhangi bir olayın tamamlanmamış ya da hatalı olması, siklin ve siklin bağımlı kinaz düzenleme aktivitesini engelleyerek, hücreyi sorunlar çözümlene ve hücre bir sonraki evreye hazır olana kadar siklusa ilerlemesini önlemektedir (Pines ve diğ., 1995; Morris ve diğ., 2019). Özellikle, interfaz sırasında görevli olan CDK2, CDK4 ve CDK6 evreler arasındaki çıkışı ve girişi düzenlemektedir (Malumbres ve Barbacid, 2009). Bir DNA hasarı sinyallerinin tespit edilmesi, bu siklin bağımlı kinazların inhibisyonuna neden olmakta ve hücre siklusunun durdurulması tetiklenmektedir. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler, özellikle sınırlama kontrol noktasında görevli olan p53 ve pRB yolakları hücre siklusunun düzenlenmesinde çok büyük rol oynamaktadırlar. Bu iki mekanizma insan kanserlerinde en yaygın rastlanan deregüle olan mekanizmalardır (Wahl ve Carr, 2001; Sherr ve McCormick, 2002; Kastan ve Bartek, 2004). p53, G1 evresi sırasında yanlış eşleşmiş ve tek iplikli DNA gibi DNA hasarlarına karşı, pRb'nin fosforillenmesini sağlayan G1 evresindeki gerekli siklin bağımlı kinazların aktivasyonunu engelleyen p21 transkripsiyonunu başlatarak cevap vermektedir (Kastan ve Bartek, 2004; Wenzel ve Singh, 2018). Bu cevapla siklusun DNA sentezine ilerlemesi engellenmektedir (Nataraj ve diğ., 1995, Wenzel ve Singh, 2018). p53 tamir edilemeyecek hasar durumlarında, hücrenin apoptoza gitmesinde yüksek oranda rol oynamaktadır (Clarke ve diğ., 1994; Wenzel ve Singh, 2018). p53 genindeki mutasyonlar, birçok insan kanser türlerinde yaygın şekilde bulunmakta ve bu p21 transkripsiyonunun eksikliği ile sonuçlanmaktadır. Bu eksiklik, DNA hasarının varlığında G1 tutuklanmasının azalması veya işlevsiz kalması, bu hasarın siklusa tamir edilmeden devam etmesine neden olmaktadır (Greenblatt ve diğ., 1994). Diğer bir tümör baskılayıcı olan pRb ve hedef siklin bağımlı kinazlar olan CDK2, CDK4 ve CDK6, G1 evresinde ve sınırlama kontrol noktasında görev yapmaktadır (Malumbres ve Barbacid, 2001). Hasarlı pRb fonksiyonu, E2F'ye bağlanma eksikliği ile sonuçlanmakta ve bu daha sonra proteinlerin düzenleme olmadan transkripsiyonuna izin vererek hücreyi siklus boyunca teşvik etmektedir (Wenzel ve Singh, 2018). Siklin E ve A, G1 evresinin sonlarına doğru indüklenmektedir.

DNA hasar kontrol noktası, eksojen ve endojen genotoksik ajanların hücrelere sürekli saldırmasından korumaktadır. Bu genotoksik ajanlar, kimyasallar, serbest radikaller, iyonize radyasyonlar, hücresel metabolizma ya da medikal tedavi ürünleri olabilmektedir. Bu ajanlar, DNA molekülünde çeşitli değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikler, sonuçta CDK inhibisyonuna ve hücre siklusunun durmasına neden olan bir sinyal yolu tarafından algılanmaktadır (Bartek ve diğ., 2004). Eğer kontrol noktası ya da DNA tamir mekanizması,

aşırı DNA hasarı ya da genetik kusurlar nedeniyle tamir başarısız olursa, hücreler yaşlanmakta ya da apoptoza uğramaktadır. DNA değişimlerinin birikmesi, hücre transformasyonuna ve onkogeneze yol açan genomik instabiliteye neden olmaktadır (Kastan ve Bartek, 2004). Genetik materyal kopyalandıktan sonra, uygun kromozom ayrımı, CDK1 aktivitesini düzenleyen ve kromozom ayrılmasındaki hataları önleyen bir sinyal yolu olan, iç ipliği kontrol noktası tarafından kontrol edilmektedir (Perez de Castro ve diğ., 2007; Mussachio ve Salmon, 2007). Bu kontrol noktasındaki hasarlar, genetik bilginin hatalı olarak dağıtılmasına neden olmaktadır. Eğer bu hasarlar tamir edilmez ise, kromozomal aberasyonları biriktirerek tümörün ilerlemesini kolaylaştırabilmektedir. Sadece belirli siklin-siklin bağımlı kinaz kompleksleri hücre siklusu sürecini kontrol etmektedir. Memeli hücre siklusunun klasik modeline göre, siklin-siklin bağımlı kinaz kompleksleri, interfaz sırasında gerçekleştiği bilinen çeşitli olayları sıralı ve düzenli bir şekilde yürütmekten sorumludur. Mitojenik sinyaller ilk olarak, hücrelerin DNA sentezini başlatmak için hazırladıkları hücre siklusunun bir evresi olan G1 evresi sırasında CDK4 ve CDK6'yı bağlayan ve aktive eden D tipi siklinlerin (D1, D2 ve D3) ekspresyonu ile algılanmaktadır (Malumbres ve Barbacid, 2009; Goel ve diğ., 2018). Bu yapıların aktivasyonu, CDK2'yi bağlayan ve aktive eden E tipi siklinlerin (E1 ve E2) ekspresyonuna izin vermek için rB, rB11 ve rB12 gibi proteinlerin inaktivasyonuna neden olmaktadır (Harbour ve diğ., 1999, Goel ve diğ., 2018). E tipi siklinlerin hücre siklusundaki varlığı, sıkı bir şekilde kontrol edilmekte ve DNA sentezinin erken aşamalarında yıkılmaktadırlar. Siklin E/CDK2 kompleksinin G1/2 geçişini gerçekleştirmek için gerekli olduğu bilinmektedir (Hocheegger ve diğ., 2008). CDK2 daha sonra G2 evresinden mitoz geçişi sağlamak için, DNA replikasyonunun geç aşamaları sırasında Siklin A2 tarafından aktive edilmektedir. CDK1'in, mitozun başlangıcını kolaylaştırmak için, interfazın sonunda A tipi siklinler tarafından aktive edildiği düşünülmektedir. Nükleer zarfların parçalanmasını takiben, A tipi siklinler bozulmakta ve hücrelerin mitoz boyunca ilerlemesinden sorumlu olan Siklin B/CDK1 komplekslerinin oluşumunu kolaylaştırmaktadır (Malumbres ve Barbacid, 2009).

G2/M kontrol noktası, hücrelerde G2 evresi sırasında DNA hasarı oluştuğunda veya önceki G1 ya da S evreleri sırasında ortaya çıkan bazı onarılmamış hasarlarla G2 evresinde ilerlerken mitoz başlatmasını önlemektedir (Nyberg ve diğ., 2002; Xu ve diğ., 2002). G2 kontrol noktasının kritik hedefi, mitozu teşvik eden siklin B/CDK1 kompleksinin aktivasyonudur. G2 kontrol noktasının korunması kısmen BRCA1 ve p53 tarafından düzenlenen transkripsiyonel programlara dayanmakta ve CDK inhibitörü p21 gibi hücre döngüsü inhibitörlerinin

düzenlenmesine yol açmaktadır (Taylor ve Stark, 2001; Nyberg ve diğ., 2002). Diğer kontrol noktalarının birinde hasar bulunan tümör hücrelerinde bile, DNA hasarından sonra G2 evresinde birikme eğiliminde olmaları, p53 bağımsız mekanizmaların G2 tutuklamasını sürdürmek için yeterli olduğunu göstermektedir.

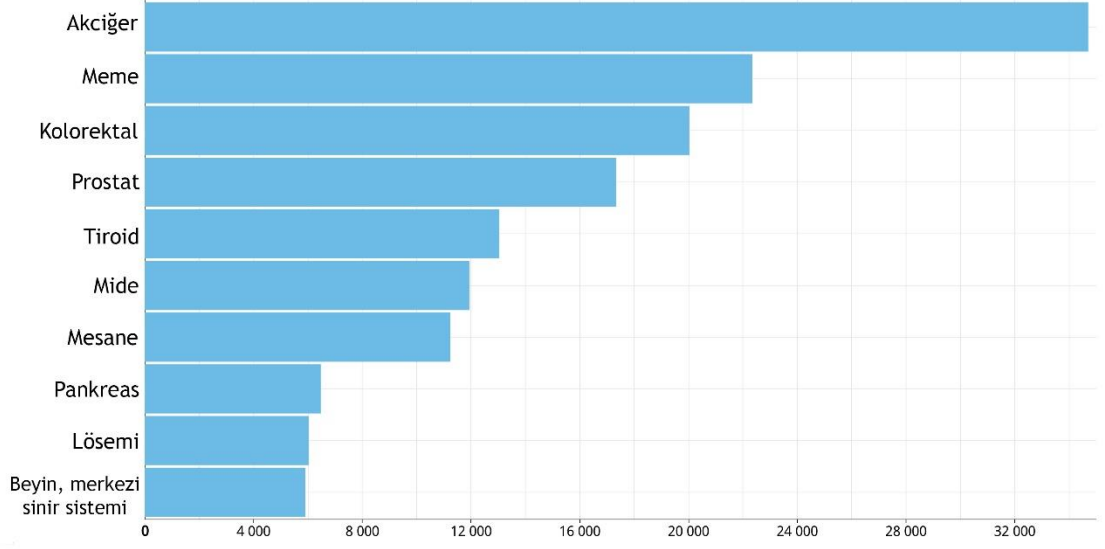
Normal hücrelerde, DNA hasarı genel olarak S evresi sırasında daha sık görülmektedir. DNA zincir kırıkları, anormal biçimde modifiye edilmiş bazlar ya da bazık olmayan kısımlar ve yanlış eşleştirilmiş bazlar dahil olmak üzere hücre siklusu sırasında çok çeşitli hasarları tanıyan ve onları onaran karmaşık protein mekanizmaları bulunmaktadır (Jackson ve Bartek, 2009; Ciccio ve Elledge, 2010; Bauer ve diğ., 2015; Kunkel, 2015). p53 bağımlı G1/S kontrol noktası, S evresine girmeden önce DNA onarımına izin vermek için hücre siklusunu durdursa da, diğer mekanizmalar DNA replikasyonunu geciktirebilmektedir (Bartek ve Lukas, 2007). Bu kontrol noktalarının her biri, DNA hasarının varlığını hisseden ve sinyal veren, farklı hasarları tamir etmek için çeşitli protein kompleksleri içermektedir (Hoeijmakers 2001; Jackson ve Bartek, 2009; Goldstein ve Kastan, 2015; O'Connor, 2015). Baz ve nükleotid kesip çıkartma tamiri, yanlış eşleşme tamiri, homolog rekombinasyon, homolog olmayan uçların birleşmesi gibi mekanizmalar genomu korumak için evrimleşmiştir (Reardon ve Sancar, 2005; Malkova ve Haber, 2012; Jasin ve Rothstein, 2013; Sale, 2013; Bauer ve diğ., 2015; Kunkel, 2015; Reyes ve diğ., 2015). Kalıcı çift zincir (ds) DNA kırıkları en zararlı hasar biçimi olarak gösterilmektedir. Bu hasarlar mitoz evresine taşınırlarsa yanlış kromozom ayrışması meydana gelebilmekte ve gerekli genetik materyal kaybolabilmektedir. S evresi sırasında, kardeş kromatid diğeri için bir tamir şablonu olarak kullanılabildiğinden dolayı, hücreler, DNA çift iplik kırıklarını düzeltmek amacıyla homolog olmayan uçların birleştirilmesi mekanizmasına ek olarak daha doğru bir tamir mekanizması olan homolog rekombinasyonu kullanabilmektedir (Jackson ve Bartek, 2009; Moynahan ve Jasin, 2010; Jasin ve Rothstein, 2013). Genellikle, DNA hasar yanıt mekanizmalarından birinde oluşan mutasyonlar, aslına uygunluğu ve verimliliği azalarak da olsa başka mekanizmalar tarafından telafi edilebilmektedir (Sherr ve Bartek, 2016). Kanseri hücrelerinin en belirgin özelliği, DNA hasar kontrol noktalarında ya da tamir yollarlarında bir veya daha fazla hasarın bulunması ile karakterize edilmektedir. ATM ve CHK2 hücre çoğalması için vazgeçilebilecek olmasına ve bunların aktifleştirici mutasyonları kanserde tolere edilebilmesine rağmen, ATR ve CHK1, replikasyon çatalı stabilitesini ve mitotik girişin zamanlamasını da içeren hayati hücre siklusu düzenleyici görevler gerçekleştirmektedir. Bu fonksiyonları, kanser hücrelerinin yaşama yeteneğinde sıklıkla gerekli

olmaktadır (Murga ve diğ., 2011; Bartek ve diğ., 2012; Velic ve diğ., 2015). Bununla birlikte, kanser hücreleri, kısmi ATR inhibisyonuna karşı normal hücelere göre önemli ölçüde daha hassas olduğu belirtilmiştir (Velic ve diğ., 2015). G2 evresindeki DNA hasarı, ATR/CHK1 sinyal yolağını aktive ederek, hücre bölünmesinde oldukça kritik bir rol oynayan bir tirozin protein fosfataz olan Cdc25'in fosforilasyonuna ve inaktivasyonuna, CDK1 inhibisyonuna ve hücre siklusunun G2'de durmasına yol açmaktadır. DNA hasarının daha sonra onarılması durumunda ise, hücre siklusu devam etmektedir. Polo benzeri kinaz 1 ve Aurora A dahil diğer kinazlar, kontrol noktalarının tersine alınmasında ve mitoz evresine giriş süreçlerine katkıda bulunmaktadır (Nigg, 2001; Keen ve Taylor, 2004; Strebhardt ve Ullrich, 2006; Aarts ve diğ., 2013; Dominguez-Brauer ve diğ., 2015, Sherr ve Bartek, 2016). CDK1'in mitotik siklinler tarafından aktivasyonu, metafaz-anafaz geçişine kadar mitotik durumun devamlılığını sağlamaktadır.

Hasarlı DNA'ya karşı genel hücresel cevap, DNA hasar yanıtı (DDR) olarak bilinen, hücre siklusu ilerlemesini durduran ve onarımı destekleyen, DNA hasarını tespit eden ve sinyal veren sensör proteinlerinden oluşmaktadır. DNA hasarına cevap olarak, G1 evresi, S evresi ve G2/M geçişinde bulunan hücre siklusu kontrol noktaları aktive edilebilmektedir (Kastan ve Bartek, 2004; Bartek ve Lukas, 2007; Visconti ve diğ., 2016). DNA hasarı S evresinde oluştuğunda replikasyonu önlemek için S evresi kontrol noktası aktifleştirilmektedir (Cimprich, 2007; Errico ve Costanzo, 2012). DNA hasarına cevap olarak, ATM ve ATR sadece hücre siklusunun ilerlemesini durdurmakla kalmamakta, aynı zamanda diğer birçok substratı fosforile ederek DNA onarımını da başlatmaktadır. Hasarın onarılamadığı durumlarda, hücrede kalıcı büyüme durması gerçekleşmekte ya da hücre ölmektedir (Cimprich ve Cortez, 2008; Shiloh ve Ziv, 2013). Wee1, tam olarak replike olmamış ya da hasar görmüş genomlara sahip hücrelerde mitozun başlamasını önleyen önemli bir kinazdır. DNA'da hasar bulunması durumunda, ATR ile aktive olan Wee1, G2/M geçişi kontrol noktasında hücreleri durdurmakta ve onarım için zaman kazandırmaktadır (O'Connel ve diğ., 1997; Visconti ve diğ., 2016).

2.2. AKCİĞER KANSERİ

Akciğer kanseri, akciğer hücrelerinde kontrolsüz hücre bölünmesi sonucunda bir ya da iki akciğerde birden tümörün oluşmasıdır (Cattamanchi, 2018). Akciğer kanseri, yirminci yüzyıl öncesinde oldukça seyrek görülürken (Proctor, 2001), şu anda kanserden kaynaklanan ölümlerde üst sıralarda yer almaktadır (Şekil 2.4) (Torre ve diğ., 2016).



Şekil 2.4: Türkiyede en sık görülen kanser türleri (Global Cancer Observatory-IARC, WHO, 2018).

Akciğer kanseri, bazen hiçbir belirti göstermediğinden, bazen solunum yolu hastalıkları ile benzerlik gösterdiğinden ilk aşamalarda teşhis edilememektedir (Cattamanchi, 2018). Akciğer kanserine yakalanan hastalarda, belirtiler geç evrelere kadar ortaya çıkmamaktadır. İştah kaybı, ses kısıklığı, bronşit veya zatürree gibi sık görülen göğüs enfeksiyonları, uzun süreli öksürük, nefes darlığı, kilo kaybı ve göğüs ağrısı akciğer kanseri belirtileri arasında sayılabilmektedir.

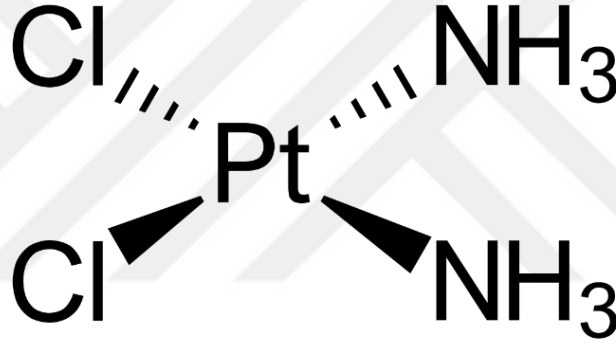
Akciğer kanseri herhangi birinde gelişebilirken, sigara kullanımı ya da sigara dumanına maruz kalmak bu olasılığı arttırmaktadır (Cattamanchi, 2018). Kimyasalların veya başka toksinlerin solunması akciğer kanseri olasılığını arttırırken, daha önce akciğer hastalığı geçirmiş olmak da kanser riskini tetiklemektedir (Collins ve diğ., 2007).

Işık mikroskobu altındaki görünüşlerine göre, küçük hücreli ve küçük hücreli dışı olarak iki tür akciğer kanseri teşhis edilmektedir (Collins ve diğ., 2007). Küçük hücreli dışı akciğer kanseri Evre 0, 1, 2, 3 ve 4 olarak ayrılırken, küçük hücreli akciğer kanseri sınırlı ya da yayılmış olarak sınıflandırılmaktadır (Collins ve diğ., 2007; Cattamanchi, 2018).

Cerrahi yöntem, kemoterapi ve radyoterapi gibi yöntemlerle akciğer kanseri tedavi edilmektedir. Uygulanacak tedavi, tümörün bulunduğu yere, evreye ve hastanın genel sağlık durumuna göre seçilmektedir (Collins ve diğ., 2007; Cattamanchi, 2018).

2.3. CİSPLATİN

Cisplatin beyaz ya da sarı renkli kristal toz halinde bulunan bir kimyasaldır. Ortada bulunan bir platin iyonunun iki amin ve iki klorür iyonuna bağlanması ile oluşan (Şekil 2.5), 301,1 g / mol moleküler ağırlığa, 3,74 g / cm³ yoğunluğa ve 270 °C'de erime noktasına sahip, nötr bir inorganik molekül olarak tanımlanmaktadır (Petrović ve Todorović, 2016).



Şekil 2.5: Cisplatinin yapısal formülü (Anon-C, 2012).

Cisplatin ya da cis-diamindikloroplatinyum (II) kanser hastalarının neredeyse yarısında kullanılan kemoterapötik bir ajan olduğu vurgulanmaktadır (Kelland, 2007). Cisplatin, ilk kez 1844 yılında Michele Peyrone tarafından sentezlenmiş olup, kimyasal yapısı ilk kez Alfred Werner tarafından 1893 yılında aydınlatılmıştır. Antitümöral aktivitesi 1960ların sonunda Michigan Üniversitesi'nde fizik öğretmeni olan Rosenberg tarafından bulunmuştur. FDA tarafından 1978 yılında ürogenital tümörlerin tedavisinde kullanılmak üzere klinik kullanımı onaylanmıştır. Cisplatin klinik olarak kullanılmaya başlandığından beri, kanser tedavisinde en çok kullanılan ilaçlardan biri olmuştur (Kelland, 2007). Çeşitli malignansilerin kemoterapötik tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Testis kanseri tedavisinde cisplatinin başarısı oldukça dikkat çekmektedir, başka kemoterapötikler ile birlikte kullanıldıklarında başarı oranı %90'dan fazla olduğu bildirilmiştir (Einhorn ve diğ., 1989; Petrović ve Todorović, 2016). Cisplatin baş

ve boyun, mesane, ovaryum, serviks, özafagus ve küçük hücreli akciğer kanseri tedavisinde kullanılmaktadır.

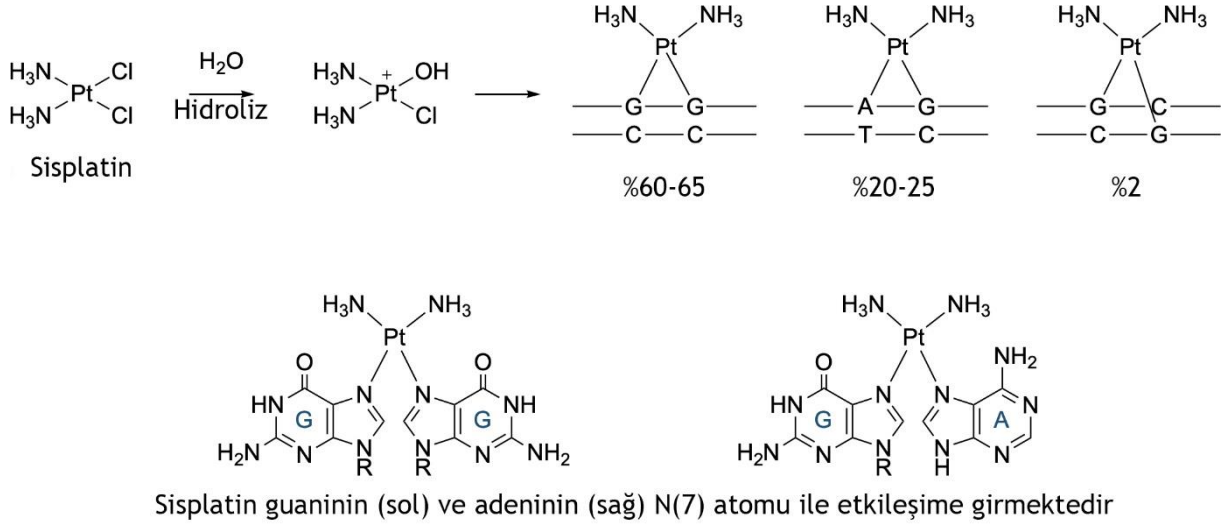
Kanser tedavisinde kombine olarak yapılan tedaviler oldukça yaygındır. Cisplatin sıklıkla bir, ya da iki, bazen dört ilaca kadar başka ilaçlarla pozitif sonuçlar vererek kullanılabilir (Florea ve Büsselberg, 2011).

2.3.1. Cisplatinin Etki Mekanizması

Cisplatin hücre içine girdiğinde, hücre içindeki düşük klor konsantrasyonu nedeniyle, iki klor iyonunu kaybederek, yerini su molekülleri almakta ve DNA bazlarına bağlanan reaktif bir tür oluşturmaktadır (Goodsell, 2006; Petrović ve Todorović, 2016).

Cisplatin için ana hücresel hedef genomik DNA'dır. Ancak hücre içindeki cisplatinin sadece %1'i nükleer DNA'ya bağlanmaktadır (Fuentes ve diğ., 2003). Cisplatin DNA'ya bağlanarak, zincir içi çapraz bağlara ve DNA eklentilerine neden olmaktadır. Cisplatin tarafından oluşturulan DNA eklentileri, DNA replikasyonunu ve / veya transkripsiyonu engellemekte ve apoptoz aktivasyonu ile sonuçlanan bazı sinyal iletim yollarını aktive etmektedir (Yen ve diğ., 2005).

Cisplatin DNA'ya iki basamak halinde bağlanmaktadır. İlk olarak N7 guanin ile bağ oluşturmakta, sonra aynı veya karşı ipliğindeki guanin ya da adenin ile bağlanmaktadır. Guanin ve adeninin N7 atomu en erişilebilir olanıdır. Cisplatin, zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturarak DNA'nın bozulmasına neden olmaktadır. En sık rastlanan DNA çapraz bağları 1,2-d(GpG)'dir. Cisplatinin etki mekanizmasında %60-70 olarak bu çapraz bağlara rastlanmaktadır. d(ApG) zincir içi eklentileri tüm hasarların %20'sini oluşturmaktadır (Şekil 2.6) (Payet ve diğ., 1993; Petrović ve Todorović, 2016). Etkin olmayan transplatin 1,2 zincir içi çapraz bağlarını oluşturamadığından, bu hasar en sitotoksik olanı olarak kabul edilmektedir. Bu hasarlar, çift sarmalın eğilmesine ve gevşemesine ve fonksiyon kaybına neden olmaktadır (Petrović ve Todorović, 2016).



Şekil 2.6: Cisplatinin etki mekanizması (Anon-D, 2019).

DNA hasarları, hasar tanıyan makromoleküller tarafından tanınmaktadır. Bu makromoleküller Cisplatin DNA eklentilerini tamir edebilmektedir. En önemli Cisplatin DNA hasar tamir protein aileleri:

- 1) Nükleotid kesip çıkartma onarımı (NER) proteinleri
- 2) Yanlış eşleşme onarımı (MMR) proteinleri
- 3) DNA bağımlı protein kinaz (DNA-PK) proteinleridir

Nükleotid kesip çıkartma tamiri (NER), XPA, RPA, XRC-HR23B, ERCC1-XPF ve XPG dahil olmak üzere en az 17 farklı proteinden meydana gelmektedir. Bu multiprotein yapısı zincir içi çapraz bağları tanımakta ve hasarı içeren 27-29 baz çifti uzunluğundaki oligonükleotidi kesip çıkartmaktadır (Moggs ve diğ., 1997). DNA sarmalı üzerinde oluşan boşluğu DNA polimeraz enzimi doldurmaktadır (Reardon ve diğ., 1999; Onur ve diğ., 2009). NER kompleksinde yer alan bazı genlerin aşırı ekspresyonu, Cisplatin direnci ile ilişkilendirilmiştir (Woźniak ve Błasiak, 2002).

Yanlış eşleşme onarımı (MMR) kompleksi, DNA'ya hasar veren ilaçlara karşı cevap için çok önemli olan, ATP bağımlı bir multiprotein sistemidir (Toft ve diğ., 1999). Yanlış eşleşme onarım kompleksi hücre siklusu yakalanmasına neden olmaktadır. Yanlış eşleşme onarım proteinleri, hasarlı olmayan ipliğin karşısında bulunan iki komşu guanin arasındaki zincir içi eklentilerin bulunduğu ipe doğru nükleotidi yerleştirmeye çalışmaktadır. Hasarı tamir

edemediği durumda, apoptotik yollar aktive olmaktadır (Vaisman ve diğ., 1998; Onur ve diğ., 2009; Petrović ve Todorović, 2016). DNA-PK proteinin alt birimi olan Ku, cisplatin-DNA hasarları ile etkileşim kurmakta ve bu da DNA-PK'nın kendisini veya başka transkripsiyon faktörlerini fosforile etmek için aktivasyonuna yol açmaktadır (Petrović ve Todorović, 2016).

p53 proteini kemoterapinin neden olduğu apoptozda merkezi bir rol oynamaktadır. p53 apoptotik süreci birçok yolk ile aktive edebilmektedir (Yu ve Zhang, 2005). p53 proteini hücre siklusunun durdurulmasında ve DNA onarımının aktivasyonunda rol oynayan genleri (p21 / waf1, mdm2, GADD45 ve diğ.eri) aktive etmektedir (Siddik, 2003). p53, cisplatin kaynaklı apoptozu, PUMA, kaspazlar, PIDD, MAPK protein ailesi ve mitokondride ve/veya sitozolde bulunan Bcl-2 ailesi proteinleri ile etkileşimi dahil olmak üzere proapoptotik genlerin aktivasyonu ile düzenlemektedir (Eliopoulos ve diğ., 1995; Lin ve diğ., 2000; Jeffers ve diğ., 2003; Dasari ve Tchounwou, 2014; Petrović ve Todorović, 2016).

Zincir içi ve zincirler arası DNA eklentileri, normalde geçici hücre siklusu yakalanmasını yöneten tamir mekanizmaları tarafından tanınmakta ve güvenli bir şekilde kaldırılmaktadır. G1/S ve G2/M kontrol noktaları tamir mekanizmalarının fonksiyonuna yardım etmek amacıyla hücre siklusunu durdurmaktadır. Cisplatin ile tedavi sırasında, çoğunlukla G2 yakalaması indüklenmektedir. Kontrol noktası kinazlarından Chk1 ve Chk2'nin fosforilasyonu, Cdc25C'nin aktivasyonu ve sitoplazmaya translokasyonu G2 evresinde hücre siklusu yakalanmasına neden olmaktadır (Hekmat-Nejad ve diğ., 2000). Eğer hasar onarılamayacak durumda ise, hücre apoptoz yoluyla hücrelerin ölümüne neden olan ve bu hücrelerin mitoz evresine geçişini önleyen mekanizmaları harekete geçirmektedir (Petrović ve Todorović, 2016).

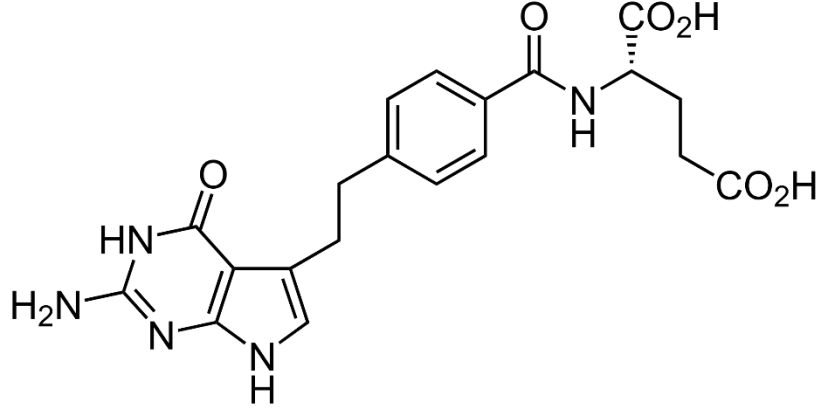
Oksidatif strese maruz kalmak, normal biyolojik fonksiyonları bozmaktadır. DNA hasarı dışında, cisplatinin reaktif oksijen türevlerine neden olarak hücre ölümünü tetiklemektedir (Florea ve Büsselberg, 2011). Hücre ölümü, bazı sinyal yollarının eşzamanlı aktivasyonu sonucunda meydana gelirken, özelleşmiş yollar kanser hücresine bağı olarak aktive olmaktadır. Reaktif oksijen türevlerinin oluşumu uygulanan cisplatinin konsantrasyonuna ve maruz kalma süresine bağı olarak artmaktadır (Brozovic ve diğ., 2010). Hücre içi redoks homeostazı, molekül içeren tiyol (-SH) grupları tarafından sağlanmaktadır. Belirli koşullar altında, bir tiyol grubu, moleküler oksijen ile etkileşime girebilen bunun sonucu olarak reaktif oksijen türevi oluşturan, tiyil radikallerinin oluşumuna yol açabilmektedir (Desoize, 2002; Florea ve Büsselberg, 2011).

Oksidatif stres, cisplatin sitotoksitesinde en önemli mekanizmalardan birisidir. Cisplatin oksidatif strese, süperoksit anyonlarını ve hidroksil radikallerini arttırarak neden olmaktadır (Masuda ve diğ., 1994; Petrović ve Todorović, 2016). Oksidatif stres koşulları altında, aşırı reaktif oksijen türevleri hücrel proteinlere, lipitlere ve DNA'ya zarar verebilmekte ve sağ kalım sinyal kaskadını düzenleyebilmektedir. Reaktif oksijen türevlerinin maruz kalma şiddetine ve süresine bağlı olarak sağ kalım ya da apoptotik cevap yolları aktive edilmektedir (Petrović ve Todorović, 2016).

Birçok metal reaktif oksijen türevlerini yaratabilmektedir. Bazı DNA hasarları, metalle indüklenmiş serbest radikaller tarafından oluşturulmaktadır. Buna ek olarak, metaller DNA tamirini inhibe edebilmektedir. Çeşitli mekanizmalar onarımın engellenmesine neden olmaktadır. Bunlardan ilki doğrudan serbest radikal tarafından, ikincisi ise dolaylı olarak, azaltılmış glutatyon seviyesini düşürerek gerçekleşmektedir (Desoize, 2002). Bu kısmen reaktif oksijen türevlerinin kanserojen olabileceği gibi kanseri tedavi etmek için yararlı olabileceğini de göstermektedir. Bu etkiler, farklı konsantrasyon ve sürelerle maruz kalma nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Genellikle her hücrede antioksidanlar ve serbest radikaller arasında bir denge bulunmaktadır. Reaktif oksijen türevleri, hücrenin redüksiyon kapasitesini azaltırken; lipid peroksidasyonunu, sülfidril gruplarının eksilmesini, değiştirilmiş sinyal iletim yollarını, kalsiyum homeostazını ve DNA hasarını indüklemektedir. Bunun sonucu olarak, yaşlanma ya da kanserleşme meydana gelmektedir (Desoize, 2002; Florea ve Büsselberg, 2011).

2.4. PEMETREKSET DİSODYUM

Antimetabolitler, solid tümörlerin ve hematolojik malignansilerin tedavisinde oldukça sık kullanılan ajanlardır. Antimetabolitlerin, antagonistler (antifolatlar), pürin analogları ve pirimidin analogları olmak üzere üç ana sınıflandırması bulunmaktadır (Calvert, 2004; Joerger ve diğ., 2010). Pemetrekset disodyum (Şekil 2.7) kemoterapi tedavilerinde kullanılan bir antifolatır.



Şekil 2.7: Pemetrekset disodyumun yapısal formülü (Anon-E, 2006).

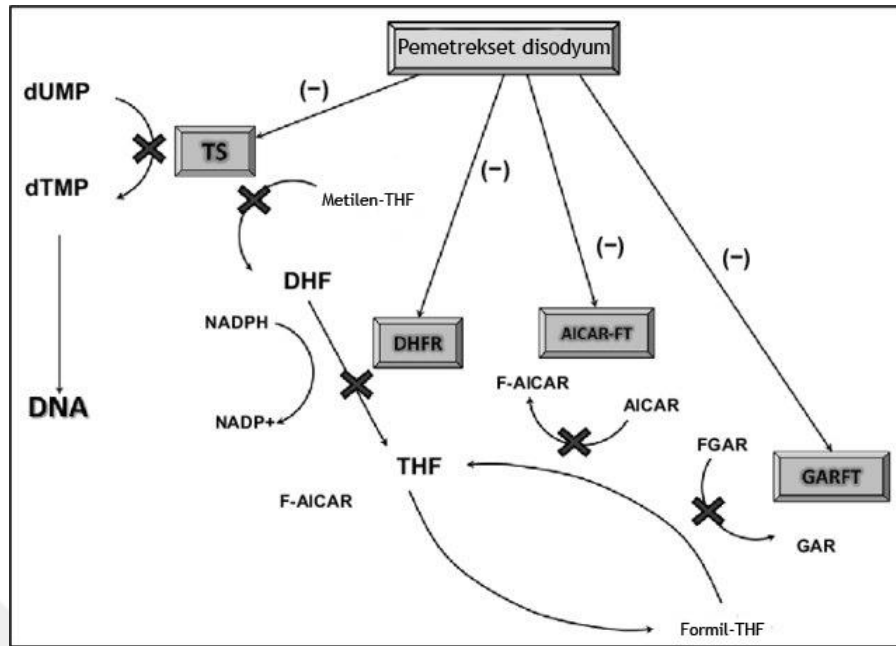
Antifolatlar, folat kofaktörlerinin biyosentetik enzimlere bağlanmasına müdahale ederek, kanser hücrelerinin çoğalmasını engelleyici olarak görev yapmaktadır. Timidilat sentaz, glisinamid ribonükleotid formil transferaz (GARFT) ve aminoimidazol karboksamid ribonükleotid formil transferaz (AICARFT) ve dihidrofolat redüktaz gibi enzimler folata ihtiyaç duymaktadır (Curtin ve Hughes, 2001; Calvert, 2004). Timidilat sentaz, DNA sentezinde deoksiüridin monofosfatı deoksitimidin monofosfata çevirmektedir. Glisinamid ribonükleotid ve aminoimidazol karboksamid ribonükleotid formil transferaz enzimleri DNA ve RNA için gerekli olan pürinlerin sentezinde önemli rol oynamaktadır. Dihidrofolat redüktaz enzimi, tetrahidrofolatı yeniden oluşturmaktadır. Bu enzimlerin işlevlerinin engellenmesi, nükleotidlerin sentezine ket vurarak, DNA ve RNA sentezini engellemektedir. Kanser hücreleri gibi oldukça hızla bölünen hücrelerde, nükleotidlerin sürekli olarak ortamda bulunması gerekmektedir. Bu nedenle, hücreler antifolatlarla maruz kaldıklarında, büyümeyi bırakmakta ya da ölmektedir (Adjei, 2004).

Pemetrekset disodyumun, birçok insan kanser hücresi üzerine oldukça geniş bir antitümöral etkisi olduğunu kanıtlamıştır. Pemetrekset disodyumun cisplatin ile birlikte kullanılması, cerrahi olarak çıkartılamayan ya da küratif cerrahi yöntemleri kullanılamayan malignant pleural mezoteliyoma hastalarında iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir (Vogelzang ve diğ., 2003; Muhsin, 2004). Pemetrekset disodyum tek başına ya da cisplatin bazlı kemoterapi sonrasında lokal olarak ileri ya da metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanseri tedavisinde de kullanılmaktadır (Teicher ve diğ., 2000; Hanna ve diğ., 2004; Scagliotti ve diğ., 2008; Ciuleanu ve diğ., 2009; Yang ve diğ., 2011; Chen ve diğ., 2014).

2.4.1. Pemetrekset Disodyumun Etki Mekanizması

Pemetrekset disodyum pürin ve pirimidin sentezinde görevli olan molekülleri hedefleyerek, inhibe etmektedir. Bu hedeflerin en önemlisi folat bağımlı bir enzim olan timidilat sentaz enzimidir (Schultz ve diğ., 1999; Adjei, 2004; Yang ve diğ., 2011). Timidilat sentaz, deoksiüridin monofosfatın deoksitimidin monofosfata dönüşümünü katalizlemektedir. Bu enzimin inhibisyonu, DNA sentezinde gerekli olan timidinin azalmasına neden olmaktadır (Grem, 1990; Schultz ve diğ., 1999). Ayrıca pemetrekset disodyum, dihidrofolat redüktaz enzimini ve pürin sentezinde görevli olan folat bağımlı glisinamid ribonükleotid formil transferaz enzimini engellemektedir (Şekil 2.8) (Shih ve diğ., 1997; Adjei, 2004). Pemetrekset disodyumun yarattığı sitotoksitenin bu enzimlerle ilişkili olduğu, özellikle timidilat sentaz enziminin bu sitotoksiteye neden olduğu ortaya konmuştur (Adjei, 2004). Pemetrekset disodyumun varsayılan etki mekanizması, hücrel deoksinükleotid kaynakları üzerine etkisiyle, DNA replikasyonunu durdurmaktadır. DNA replikasyon çatalındaki bu sorunlar, DNA çift iplik kırıklarına, ardından S fazı büyüme yakalanmasının tetiklenmesine ve potansiyel ölümcül hasarlara neden olmaktadır (Gonen ve Assaraf, 2012).

Pemetrekset disodyum hücrelere indirgenmiş folat taşıyıcıları ve membran folat bağlayıcı protein taşıma sistemleri aracılığı ile taşınmaktadır. Pemetrekset disodyum, hücrede hızlı ve etkin bir şekilde folipoliglutamat sentaz tarafından poliglutamat forma dönüştürülmektedir (Calvert, 2004). Oluşan poliglutamat formlar hücrelerde tutulmakta ve bunlar timidilat sentaz ile glisinamid ribonükleotid formil transferazın daha güçlü inhibitörleri olmaktadır (Li ve diğ., 2014). Poliglutaminasyon, tümör hücrelerinde meydana gelen, zaman ve konsantrasyon bağımlı bir süreçtir. Bu sürecin normal hücrelerde daha az miktarda olduğu düşünülmektedir. Poliglutaminasyonlanmış metabolitler, hücre içi yarılanma ömrünün artmasına neden olarak, malign hücrelerde daha uzun süreli ilaç etkisine neden olmaktadır (Baldwin ve diğ., 2009; Li ve diğ., 2014).



Şekil 2.8: Pemetrekset disodyumun etki mekanizması (Velez ve diğ., 2012).

3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada, cisplatin ve pemetrekset disodyum içeren kimyasal ajanların A549 ve BEAS-2B hücre soylarında meydana getirdikleri sitotoksik etkinin ve hücre siklusunda yer alan genlerin rollerinin hücresel ve moleküler olarak gösterilmesi amaçlanmıştır. Meydana gelen morfolojik değişiklikler faz kontrast mikroskopunda görüntülenmiştir. Belirlenen konsantrasyon ve sürelerde uygulanan kimyasal ajanların ortaya çıkardığı sitotoksik etki mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi ile, hücre siklusunda yer alan genlerin anlatım seviyeleri ise qRT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Tüm deneyler birbirlerinden bağımsız olarak, 3 kez tekrarlanmıştır.

3.1. HÜCRE SOYLARI

3.1.1. A549 Hücre Soyu

Deneylerimizde kullanılan tümöral hücre soyu olan A549 hücre soyu (ATCC, CCL-185), adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücreleridir. Laboratuvarımızda haftada iki kez düzenli olarak pasajı yapılan hücrelerde besiyeri olarak, %10 Fötal Bovine Serum (FBS, Gibco Lab.), 100 IU/ml penisilin (İecilline, İ.E. Ulagay) ve 100 µg/ml streptomisin (Streptomisin sülfat, İ.E. Ulagay) içeren, RPMI 1640 (RPMI 1640, Gibco) kullanılmıştır. Hücreler, steril kültür kaplarında, %5 CO₂ ve %95 hava içeren nemli atmosferde, 37°C de tek tabaka kültür olacak şekilde inkübe edilmiştir.

3.1.2. BEAS-2B Hücre Soyu

BEAS-2B hücre soyu normal bronşiyal epitel hücreleridir (ATCC, CRL-9609). Bu hücreler, laboratuvarımızda %10 Fötal Bovine Serum (FBS, Gibco Lab.), 100 IU/ml penisilin (İecilline, İ.E. Ulagay) ve 100 µg/ml streptomisin (Streptomisin sülfat, İ.E. Ulagay) içeren, RPMI 1640 (RPMI 1640, Gibco) besiyeri ile haftada 2 ya da 3 kez pasajlanmaktadır. BEAS-2B hücreleri 25cm²'lik kültür kaplarında, %5 CO₂ ve %95 hava içeren nemli atmosferde, 37°C de yetiştirilmektedir.

3.2. HÜCRE PASAJI

A549 ve BEAS-2B hücreleri yetiştirildikleri kültür kapları içerisinde yeterli yoğunluğa eriştiklerinde pasaj işlemine başlanmıştır. Öncelikle kültür kabı içerisindeki besiyeri uzaklaştırılarak, HBSS ile hücre yüzeyi yıkanmıştır. Hücreler bulundukları yüzeyden

kaldırılması amacıyla 1 ml %0,05 tripsin-EDTA ile 1 dakika inkübe edilmiştir. Santrifüj tüpüne alınan hücrelerin üzerine tripsini inaktive etmesi için 5 ml besiyeri eklenerek, 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Çöken hücrelerden süpernatant kısım uzaklaştırılarak, pelet 3 ml taze besiyeri ile süspanse edilmiştir. Hücreler 25 cm²'lik kültür kaplarında aktararak, 37°C'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir.

Deneylerde gerekli olan hücre sayısı hemositometrede sayılarak hesaplanmıştır. Bunun için tripsinizasyon ile kaldırılan hücreler santrifüj edilmiş, süpernatant kısmı uzaklaştırıldıktan sonra 5 ml taze besiyeri ile sulandırılmıştır. 100 µl örnek, eşit miktarda %0,5 tripan mavisi ile karıştırılarak homojen şekilde süspanse edilmiştir. Bu süspansiyondan 100 µl alınarak, hemositometrede canlı ve ölü hücreler sayılmıştır. Bulunan sayı sulandırma faktörü ile sayılarak, hücre sayısı belirlenmiştir (Hücre Konsantasyonu = Sayılan Hücre x Sulandırma Faktörü x 10⁴).

3.3. HÜCRE EKİMİ

Sitotoksisite deneyi için, 96 kuyucuklu hücre kaplarına 30000/kuyucuk olacak şekilde ekim yapılmıştır. Feulgen metodu için 12 kuyucuklu kültür kaplarına lamel üzerine 30000 hücre/ml, moleküler analizler için 6 kuyucuklu kültür kaplarına 250000 hücre/ml olacak şekilde hücreler ekilmiştir. Hücreler ekim işleminden sonra %5 CO₂ ve %95 hava içeren etüv içerisinde, 37 °C'de 24 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır.

3.4. İLAÇ KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

Deneylerde kullanılan cisplatin içeren kimyasal ajan olarak Cisplatin (Koçak Farma), pemetrekset disodyum içeren kimyasal ajan olarak ise Pemetrex (Koçak Farma) kullanılmıştır. Deneylerimizde uygulanan konsantrasyonlar için daha önce yapılmış olan çalışmalar referans alınmıştır (Cortes-Dericks ve diğ., 2010; Prabhakaran ve diğ., 2013; Rathinam ve diğ., 2015; Tundo ve diğ., 2015; Horibe ve diğ., 2015). Serumsuz besiyeri ile 1 mM'lık ana stoklar hazırlandıktan sonra deneylerde kullanılacak olan konsantrasyonlar (Cisplatin için D1: 5 µM, D2: 10 µM, D3: 20 µM ,D4: 40 µM D5: 80 µM , D6: 160 µM; Pemetrex için; D1: 0.125 µM, D2: 0.25 µM, D3: 0.5 µM, D4: 1 µM, D5: 2 µM, D6: 4 µM, D7: 8 µM, D8: 16µM) %10 FBS içeren besiyeri ile sulandırılarak hazırlanmıştır.

Hücreler deney için kültür kaplarına ekildikten 24 saat sonra besiyerleri uzaklaştırılarak, ilaç konsantrasyonları eklenmiş ve 24, 48 ve 72 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır.

3.5. MİTOKONDRIYAL DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ

Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının 24, 48 ve 72 saat ve iki ilacın kombine olarak 24 saat aralıklarla uygulanmasının ardından meydana gelen sitotoksik etki MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir.

96 kuyucuklu hücre kaplarına ekilen hücrelerin üzerindeki ilaçlı besiyerleri inkübasyon süreleri sonunda uzaklaştırılarak, bütün kuyucuklara 1/5 oranında PBS ile sulandırılan 40 µl steril MTT (5 mg/ml) (Sigma, Kat. No: M5655) eklenerek, ışık almayacak şekilde 4 saat süresince 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda her kuyucuğa 160 µl dimetil sülfoksit (DMSO) eklenerek bir gece ışık alması engellenerek inkübe edilmiştir. Deney gruplarının absorbans değerleri 690 nm dalga boyu referans alınarak, 570 nm dalga boyunda ELISA Plate Reader ile ölçülmüştür (BioTek, ELx800) (Özcan ve diğ., 2016).

3.6. MORFOLOJİK DEĞERLENDİRME

Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının uygulanmasının ardından A549 ve BEAS-2B hücrelerinde meydana gelen morfolojik değişiklikler 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda faz kontrast mikroskopuyla 10x25 büyütmede incelenerek, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak meydana gelen morfolojik değişiklikler görüntülenmiştir.

3.7. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

3.7.1. Kaspaz Aktivasyon Analizi

Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının uygulandığı A549 ve BEAS-2B hücre kültürlerindeki kaspaz aktivasyonlarının tespiti Kaspaz 3/7 ve Kaspaz 9 deney kiti (CaspaTag™ Caspase-3,7 In Situ Assay Kit, Fluorescein Kat. No. 92590, Millipore) (CaspaTag™ Caspase-9 In Situ Assay Kit, Fluorescein Kat. No. APT409, Millipore) kullanılarak belirlenmiştir.

Bu amaçla Cisplatin ve Pemetrex kombinasyonlarının uygulandığı A549 ve BEAS-2B hücre soylarının besiyerleri deney sürelerinin sonunda steril tüpe alınmıştır. Kültür kabında bulunan hücreler için yüzeyi kaplanacak kadar tripsin-EDTA eklenerek kalkması sağlanmıştır. Tüm hücreler toplandıktan sonra 800 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.

Hücreler 10^5 hücre/ml olacak şekilde besiyeri ile süspanse edildikten sonra, 300 μ l alınarak steril tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine 10 μ l 30x FLICA reaktifi eklenerek 1 saat süresince %5 CO₂ ve %95 hava içeren inkübatörde 37 °C’ de karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 1x yıkama tamponundan 2 ml eklenerek 400 xg hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak 1x yıkama tamponundan 1 ml eklenerek tekrardan santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra 400 μ l PBS eklenerek hücreler süspanse edilmiştir. Hücreler siyah mikrolatelere her bir deney grubundan 100 μ l olacak şekilde koyulmuştur. Floresan Plate Reader (Flx-800, Bio-Tek Instruments Inc.) kullanılarak 490 nm eksitasyon dalga boyu ve 520 nm emisyon dalga boyunda (λ_{ex} 490, λ_{em} 520) ölçümler yapılmıştır (Serbes ve diğ., 2016).

3.8. MOLEKÜLER DEĞERLENDİRME

3.8.1. Total RNA İzolasyonu

Kullanılan kimyasal ajanların hücre siklusuna olan etkilerinin moleküler düzeyde incelenebilmesi için, A549 ve BEAS-2B hücrelerine ait kontrol grubu ve deney grubuna ait hücreler deney süreleri sonunda total RNA izolasyon kiti (Ambion PureLink RNA Mini Kit, Cat. No: 12183-018A) kullanılarak izole edilmiştir.

Kontrol grupları ve kimyasal ajan uygulanmış olan deney grupları inkübasyon süreleri sonunda tripsin ile kaldırıldıktan sonra steril tüplere alınarak santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak içerisinde 2-merkaptoetanol bulunan liziz tamponundan 600 μ l eklenmiştir. Pellet liziz olana kadar vortekslenmiştir. Sonrasında homojenatlar 12000 xg’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Her bir homojenata 600 μ l %70 etanol eklenerek tekrardan vortekslenmiştir. Hücre homojenatından 700 μ l alınarak, toplama tüplerinin içine yerleştirilmiş olan RNA saflaştırma kolonlarına eklenmiştir. 12000 xg’de 15 saniye santrifüj edilerek, toplama tüpündeki kısım atılmıştır. Bu işlem geri kalan homojenat için tekrarlanarak, saflaştırma kolonu aynı toplama tüpünün içine yerleştirilmiştir. Saflaştırma kolonuna 700 μ l Yıkama Tamponu I eklenerek, 12000 xg’de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü atılarak, saflaştırma kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Saflaştırma kolonlarına, etanol eklenmiş Yıkama Tamponu II’den 500 μ l eklenerek, 12000 xg’de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Toplama tüpündeki kısım uzaklaştırılarak, bu işlem tekrarlanmıştır. RNA bağlı membranın kuruması için tüpler tekrardan 12000 xg’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü atılarak, saflaştırma kolonları mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. 30 μ l nükleaz içermeyen su saflaştırma kolonunun ortasına eklenerek, RNA eldesi için 12000 xg’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Saflaştırma

kolonu atılarak, mikrosantrifüj tüpüne toplanan total RNA mikro hacimli spektrofotometre (NanoDrop 2000, Thermo Scientific Inc.) kullanılarak ölçülmüştür (Ozturk ve diğ., 2017).

3.8.2. cDNA Sentezi

İzole edilen kontrol ve deney gruplarına ait total RNA örnekleri High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Applied Biosystems™, USA) kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. Bu bağlamda kontrol ve deney grupları için çevrim sayısı kadar cDNA karışımı hazırlanarak, PCR tüplerine eşit olarak dağıtılmıştır (Tablo 3.1). RNA konsantrasyonları ilişkili örneklerle 500 ng/μl olacak şekilde eklenmiştir. Termal çevrim 37°C'de 60 dakika; 95°C'de 5 dakika olacak şekilde ayarlanmıştır (SimpliAmp, Thermo). Örnekler qRT-PCR analizinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

Tablo 3.1: cDNA sentez bileşenlerinin hazırlanması.

İçerik	1 Çevrim (20 μl)
2X Tampon Karışımı	10 μl
20X RT Enzim Karışımı	1 μl
RNA Örneği	(500 ng olacak şekilde) x μl
Nükleaz içermeyen Su	20 μl'ye tamamlanır

3.8.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Kantitatif PCR (qPCR) nükleik asitleri saptamak, karakterize etmek ve ölçmek için kullanılan yöntemdir. qPCR'da floresan işaretleme, PCR ilerledikçe verilerin toplanmasını sağlar. Bu tekniğin, mevcut çeşitli yöntemler ve kimyasallar nedeniyle birçok faydası vardır. Tez çalışmamızda kullandığımız, boya temelli qPCR'da, çift zincirli DNA'ya bağlanan bir boya kullanılarak yapılan floresan işaretleme, amplifiye olan DNA moleküllerinin miktarının ölçülmesine izin vermektedir. Her söngüde, floresans ölçülmektedir. During each cycle, the fluorescence is measured. Floresans sinyali, çoğaltılan DNA miktarı ile orantılı olarak artar ve bu nedenle DNA, “gerçek zamanlı” olarak ölçülmektedir.

A549 ve BEAS-2B hücrelerine ait cDNA örneklerinden hücre siklusu ile ilişkili genlerin seviyeleri (Siklin A1, Siklin A2, Siklin B, Siklin D1, Siklin E, CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, p14, p16, p19, p21, p27, p57, XPA, XPC, ATR, TOP1, XIAP, PARP1, Bcl-2, Mcl-1) (Tablo 3.2) Real Time PCR yöntemi ile belirlenmiştir. Bu bağlamda hazırlanan PCR karışımı; her gen için total reaksiyon hacmi 20 μl olacak şekilde, PCR suyu, ilgili genlerin primerleri ve master mix (Power SYBR™ Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, USA) kullanılarak bir fazla

kuyucuk olacak şekilde hazırlanmıştır (Tablo 3.3). Hazırlanan PCR karışımından 18,5 µl PCR platelerinin örnek kuyucuklarına dağıtılarak, üzerlerine cDNA örneklerinden 1,5 µl eklenmiştir. Plate, StepOne Plus cihazı kullanılarak PCR tamamlanmıştır (Tablo 3.4). Elde edilen sonuçlar $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir (Ozturk ve diğ., 2017). Bunun için, öncelikle, deney ve kontrol gruplarına ait değerlerden, referans genler olan GAPDH ve Act- β 'nın deney ve kontrol grubuna ait değerleri çıkartılarak, ΔCT değerleri hesaplanmıştır. Sonrasında, deney gruplarına ait değerlerden, kontrol gruplarına ait değerler çıkartılarak, $\Delta\Delta CT$ değerleri elde edilmiştir. Elde edilen değer, $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülüyle hesaplanarak, katlı değişim oranı saptanmıştır. Gen anlatımlarındaki katlı değişim ($FC \geq 1.5$) oranı, hedef genin anlatım değeri temel alınarak hesaplanmıştır (Frerichs ve diğ., 2016).

Tablo 3.2: qRT-PCR için kullanılan primer dizilimleri.

Primer	Tm	Nükleotid Dizilimi
Siklin A1	57 °C	Forward: 5' ACTTGAGGCGACAAGGAGTG 3'
	58 °C	Reverse: 5'TGAAGCTCACTCAGGCAAGG 3'
Siklin A2	57 °C	Forward: 5' TCAGAAGAAGCCAGCTGAATC 3'
	54 °C	Reverse: 5' CCTCATGGTAGTCTGGTACTTC 3'
Siklin B1	56 °C	Forward: 5' TTTGCACTTCCTTCGGAGAG 3'
	55 °C	Reverse: 5' AGGTGCTGCATAACTGGAAG 3'
Siklin D1	54 °C	Forward: 5' CTGGTGAACAAGCTCAAGTG 3'
	54 °C	Reverse: 5' AGGGCGGATTGGAAATGAAC 3'
Siklin E1	49 °C	Forward: 5' GCAGGATCCAGATGAAG 3'
	53 °C	Reverse: 5' GCCCAGCTCAGTACAGG 3'
CDK1	57 °C	Forward: 5' TGGCTCTTGGAATTGAGCG 3'
	54 °C	Reverse: 5' CCCTTCCTCTTCACTTTCTAG 3'
CDK2	56 °C	Forward: 5' ACCGAGCTCCTGAAATCCTC 3'
	55 °C	Reverse: 5' GTCCGAAAGATCCGGAAGAG 3'
CDK4	54 °C	Forward: 5' CTGGTGACAAGTGGTGGAAAC 3'
	56 °C	Reverse: 5' TGGTCGGCTTCAGAGTTTCC 3'
CDK6	56 °C	Forward: 5' GGTACAGAGCACCCGAAGTC 3'
	57 °C	Reverse: 5' CTCCTGGGAGTCCAATCACG 3'
p15	55 °C	Forward: 5' CGTTAAGTTTACGGCCAACG 3'
	54 °C	Reverse: 5' CATCATCATGACCTGGATCG 3'

Tablo 3.2 (devam): qRT-PCR için kullanılan primer dizilimleri.

Primer	Tm	Nükleotid Dizilimi
p16	56 °C	Forward: 5' ACCAGAGGCAGTAACCATGC 3'
	57 °C	Reverse: 5' AAACCTACGAAAGCGGGGTGG 3'
p19	54 °C	Forward: 5' AACCGCTTCGGCAAGAC 3'
	49 °C	Reverse: 5' CCACTAGGACCTTCAGG 3'
p21	57 °C	Forward: 5' CTGCCGAAGTCAGTTCCTTG 3'
	56 °C	Reverse: 5' GTCGAAGTTCCATCGCTCAC 3'
p27	57 °C	Forward: 5' AAATGCCGGTTCTGTGGAGC 3'
	55 °C	Reverse: 5' TGTCCATTCCATGAAGTCAGC 3'
p57	56 °C	Forward: 5' AGAAGAGTCCACCACCGGAC 3'
	57 °C	Reverse: 5' GCGCACTAGTACTGGGAAGG 3'
Bcl-2	56 °C	Forward: 5' GCCTTCTTTGAGTTCGGTGG 3'
	55 °C	Reverse: 5' GCCGTACAGTTCCACAAAGG 3'
Mcl-1	56 °C	Forward: 5' CGACGGCGTAACAAACTGG 3'
	56 °C	Reverse: 5' CAGCACATTCCTGATGCCAC 3'
XIAP	52 °C	Forward: 5' GAGTTGGCATTTCAGATTG 3'
	52 °C	Reverse: 5' ATTGATGTCTGCAGGTACAC 3'
XPA	57 °C	Forward: 5' CTAAGGAGGCATGGCTAATG 3'
	56 °C	Reverse: 5' TCTGCAGTTATCACAAGTTGGC 3'
XPC	57 °C	Forward: 5' TCTTCGGAGGGCGATGAAAC 3'
	57 °C	Reverse: 5' TAAAGCGGGCTGGGATGATG 3'
ATR	57 °C	Forward: 5' ACTCGCTGAACTGTACGTGG 3'
	56 °C	Reverse: 5' CCCACTAGTAGCATAGCTCG 3'
PARP1	57 °C	Forward: 5' TAGGCATGATTGACCGCTGG 3'
	56 °C	Reverse: 5' TTCGCCACTTCATCCACTCC 3'
TOP1	57 °C	Forward: 5' GCCTCTTCCAGAGAATGTCAAG 3'
	57 °C	Reverse: 5' CGTCTGGGCTTTGAAATACTGG 3'
GAPDH	57 °C	Forward: 5' GGTGAAGGTCGGAGTCAACG 3'
	56 °C	Reverse: 5' GTTCTCAGCCTTGACGGTGC 3'
Act-β	58 °C	Forward: 5' GTCAGAAGGATTCTATGTGGGC 3'
	57 °C	Reverse: 5' GGATAGCAACGTACATGGCTGG 3'

Tablo 3.3: PCR karışımı tablosu.

İçerik	20 µl'lik karışım (1 kuyu)	180 µl (9 kuyu)
SYBR Green Master Mix	10 µl	90 µl
Forward Primer	0,4 µl	3,6 µl
Reverse Primer	0,4 µl	3,6 µl
PCR Suyu	7,7 µl	69,3 µl
Toplam Karışım	18,5 µl	92,5 µl

Tablo 3.4: PCR cihazı programı tablosu.

Basamak	AmpliTag Gold Polimeraz Aktivasyonu	PCR	
	Bekleme	40 Döngü	
		Denatürasyon	Bağlanma/Uzatma
Süre	10 dakika	15 saniye	1 dakika
Sıcaklık (°C)	95	95	60

3.8. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Deney gruplarının anlamlılıkları kontrol gruplarına göre değerlendirilmiştir. Deneylerinden elde edilen değerlere tek yönlü ANOVA testi ile Tukey çoklu karşılaştırma (post-hoc) testi uygulanmıştır. Deney grupların kontrol gruplarına göre anlamlı olup olmadığı Dunnett's testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ seviyesi anlamlılık değeri olarak temel alınmıştır. (Graphpad Prism version 7.00, Graphpad Software, San Diego California USA).

4. BULGULAR

4.1. SİTOTOKSİK ETKİLERİN BELİRLENMESİ

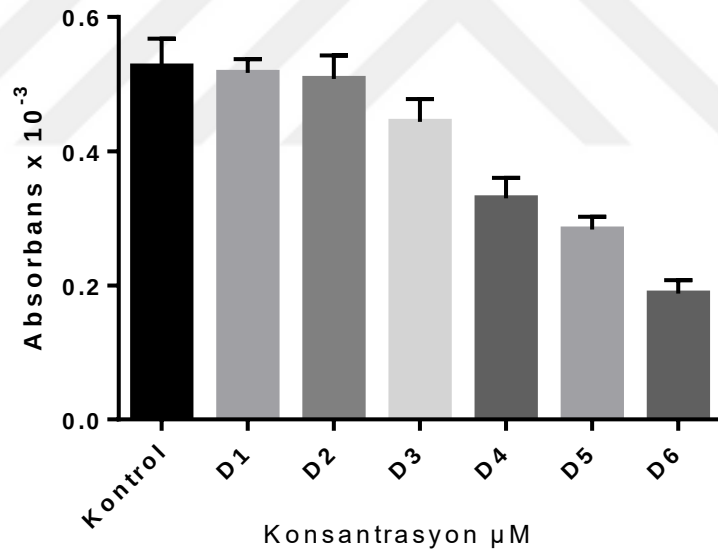
A549 ve BEAS-2B hücrelerine uygulanan Cisplatin ve Pemetrex ajanlarının tek başlarına ve 24 saat aralıkla uygulanan bu ajanların 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri sonunda hücrelerde meydana getirdikleri sitotoksik etki, MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kontrol grupları ve deney gruplarının absorbans değerleri ölçülerek, absorbans ve % inhibisyon grafikleri çizilmiştir. Deney grupları, kontrol grupları ve birbirleri ile karşılaştırılarak, istatistiksel analizler ile anlamlılıklarına bakılmıştır.

Cisplatin konsantrasyonları (D1: 5 μ M, D2: 10 μ M, D3: 20 μ M, D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) uygulanan A549 hücrelerinin absorbans değerleri 24, 48 ve 72 saat için Tablo 4.1’de verilmiştir. Absorbans değerlerine ait grafikler 24 saat için Şekil 4.1, 48 saat için Şekil 4.2 ve 72 saat için Şekil 4.3’te verilmiştir. Cisplatin uygulanan A549 hücrelerinin 24 saat sonunda absorbans değerlerinin konsantrasyona bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda D3, D4, D5 ve D6 konsantrasyonlarının uygulandığı grupların kontrole göre anlamlı olduğu ($p<0,01$), D1 ve D2 konsantrasyonlarının uygulandığı deney gruplarının kontrole arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Birbirleri ile karşılaştırılan deney gruplarında, D1 ile D2 arasında anlamlı bir fark olmadığı, diğer bütün deney grupları arasındaki farkın ise anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,01$). 48 saat süresince farklı Cisplatin konsantrasyonları uygulanan deney gruplarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ($p<0,01$). Birbirleriyle karşılaştırılan 48 saat deney gruplarının hepsinin arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p<0,01$). 72 saat deney gruplarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0,01$), birbirleri ile karşılaştırılan deney gruplarından D1 ile D2 ve D5 ile D6 arasındaki farkın anlamlı olmadığı, diğer deney grupları arasında ise anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p<0,01$). A549 hücreleri için IC_{50} konsantrasyonu 24 saat grubunda D5 olarak belirlenmiştir.

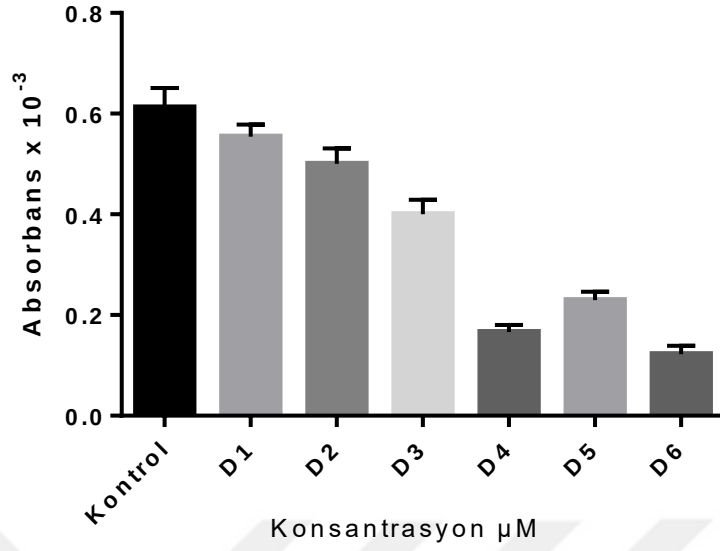
Tablo 4.1: A549 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat Cisplatin uygulaması sonunda ölçülen absorbans ortalamaları ve standart sapma ($\pm$ SD) değerleri (D1: 5 μ M, D2: 10 μ M, D3: 20 μ M, D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M).

Deney Grupları	Absorbans Değerleri (570-690 nm Dalga Boyu)		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol	526,45 $\times 10^{-3} \pm 0,04$	612,07 $\times 10^{-3} \pm 0,04$	666,14 $\times 10^{-3} \pm 0,04$
D1	508,9 $\times 10^{-3} \pm 0,03$	554,55 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	454 $\times 10^{-3} \pm 0,04^{**}$
D2	498,28 $\times 10^{-3} \pm 0,03$	500,57 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	444,9 $\times 10^{-3} \pm 0,04^{**}$
D3	431 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	400,12 $\times 10^{-3} \pm 0,04^{**}$	381,95 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$
D4	324,5 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	166,45 $\times 10^{-3} \pm 0,01^{**}$	240,95 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$
D5	261,32 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	229,92 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	81,15 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$
D6	102,76 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	122,22 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	101,28 $\times 10^{-3} \pm 0,01^{**}$

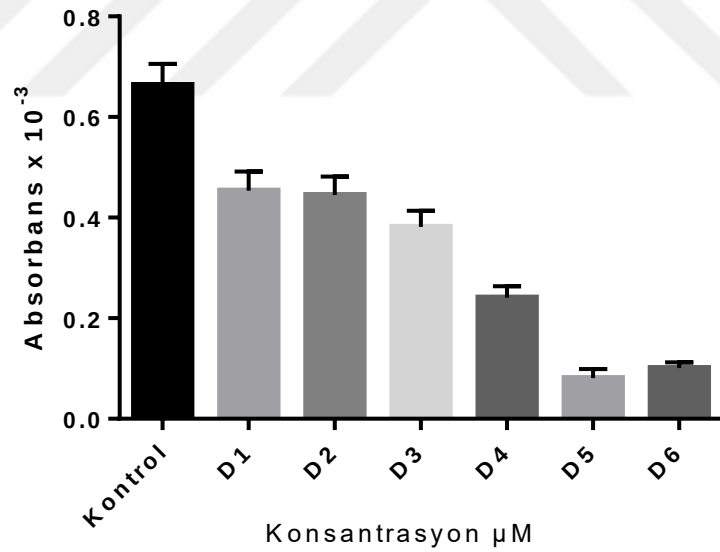
p<0,05: * (kontrole göre anlamlılık); p<0,01: ** (kontrole göre anlamlılık)



Şekil 4.1: 24 saat süresince A549 hücrelerine uygulanan Cisplatin konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm$ SD).

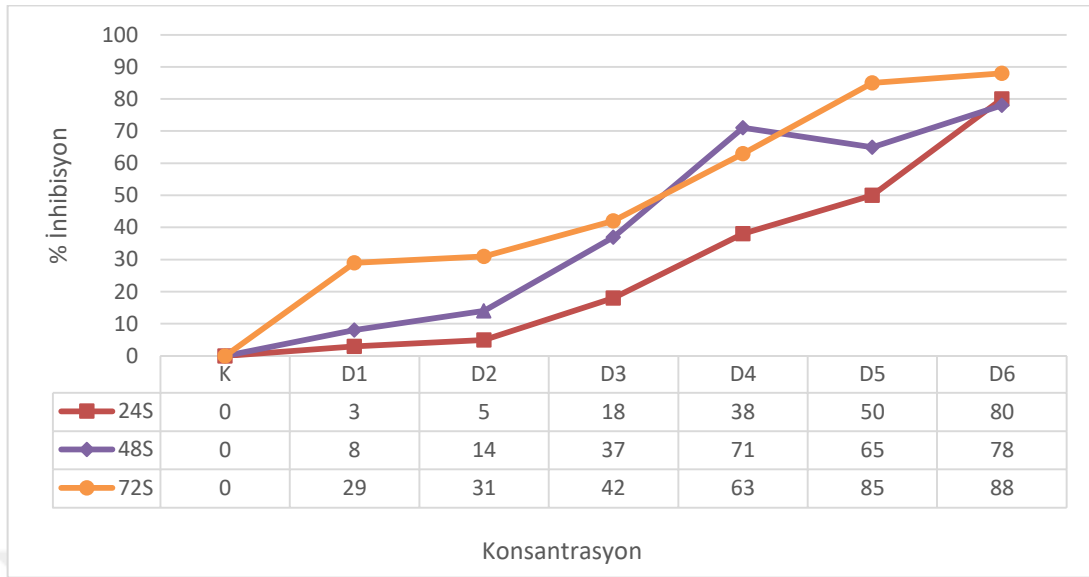


Şekil 4.2: 48 saat süresince A549 hücrelerine uygulanan Cisplatin konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm\text{SD}$).



Şekil 4.3: 72 saat süresince A549 hücrelerine uygulanan Cisplatin konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm\text{SD}$).

A549 hücrelerine Cisplatin'in 24, 48 ve 72 saat uygulanması sonucunda meydana gelen sitotoksik aktivite değerlerinin kontrol grubu %100 kabul edilerek hesaplanan % inhibisyon grafiği Şekil 4.4'te verilmiştir.



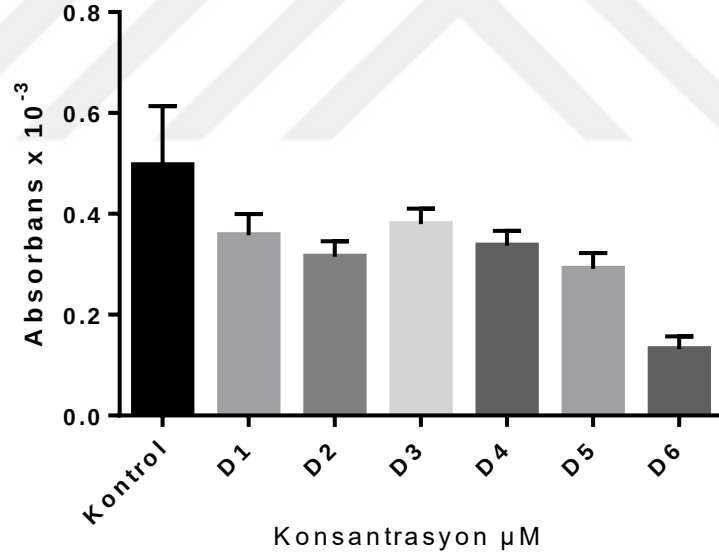
Şekil 4.4: Farklı Cisplatin konsantrasyonları uygulanan A549 hücrelerinde % inhibisyon değerleri.

BEAS-2B hücrelerine uygulanan farklı Cisplatin konsantrasyonlarının (D1: 5 μ M, D2: 10 μ M, D3: 20 μ M, D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) absorbans değerleri 24, 48 ve 72 saat için Tablo 4.2’de verilmiştir. Absorbans değerlerine ait grafikler, 24 saat için Şekil 4.5, 48 saat için Şekil 4.6 ve 72 saat için Şekil 4.7’de verilmiştir. Farklı Cisplatin konsantrasyonlarının BEAS-2B hücrelerine 24 saat süresince uygulanması sonucunda, absorbans değerlerinin konsantrasyona bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda tüm deney gruplarının kontrole göre anlamlı olduğu ($p < 0,01$) bulunmuştur. Birbirleri ile karşılaştırılan deney gruplarında, D1 ile D2, D3 ve D4 arasındaki farkın, D2 ile D4 ve D5 arasındaki farkın, D3 ile D4 ve D4 ile D5 arasında farkın anlamlı olmadığı ($p > 0,05$), diğer bütün deney grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$). Cisplatin konsantrasyonlarının 48 saat süresince uygulanması sonucunda, deney gruplarına ait absorbans değerlerinin konsantrasyona bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda deney gruplarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ($p < 0,01$). Birbirleriyle karşılaştırılan 48 saat deney gruplarının D2 ile D3 arasındaki fark anlamlı bulunmazken, diğer deney grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$). 72 saat deney gruplarına ait absorbans değerlerinin kontrole göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0,01$), birbirleri ile karşılaştırılan deney gruplarından D3 ile D4, D5 ve D6 arasında, D4 ile D5 ve D6 arasında, D5 ile D6 grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p > 0,05$), diğer deney grupları arasındaki farkın anlamlı olduğu bulunmuştur ($p < 0,01$).

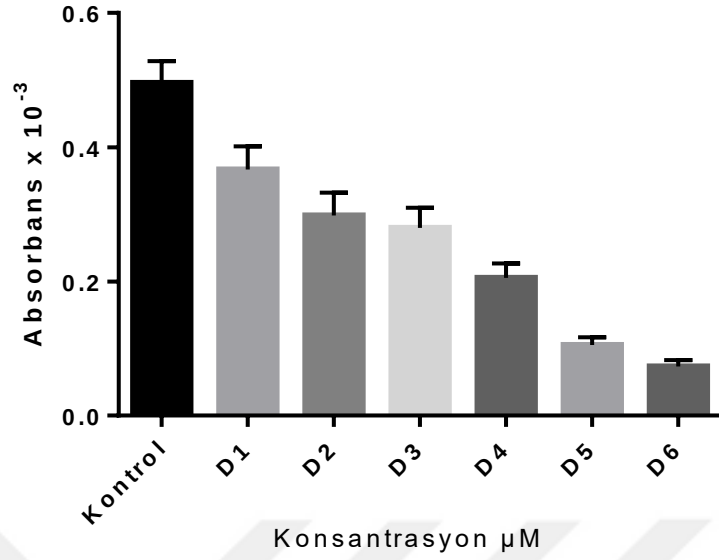
Tablo 4.2: BEAS-2B hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat Cisplatin uygulaması sonunda ölçülen absorbans ortalamaları ve standart sapma ($\pm$ SD) değerleri (D1: 5 μ M, D2: 10 μ M, D3: 20 μ M, D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M).

Deney Grupları	Absorbans Değerleri (570-690 nm Dalga Boyu)		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol	217,15 $\times 10^{-3} \pm 0,01$	495,7 $\times 10^{-3} \pm 0,03$	680,73 $\times 10^{-3} \pm 0,05$
D1	172,7 $\times 10^{-3} \pm 0,04^{**}$	366,73 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	371,93 $\times 10^{-3} \pm 0,05^{**}$
D2	159,32 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	298,26 $\times 10^{-3} \pm 0,04^{**}$	208,26 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$
D3	153,44 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	279,93 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	163,1 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$
D4	116,83 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	205,33 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	147,87 $\times 10^{-3} \pm 0,04^{**}$
D5	6,21 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	105,46 $\times 10^{-3} \pm 0,01^{**}$	136,87 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$
D6	5,13 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	73,46 $\times 10^{-3} \pm 0,009^{**}$	151,57 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$

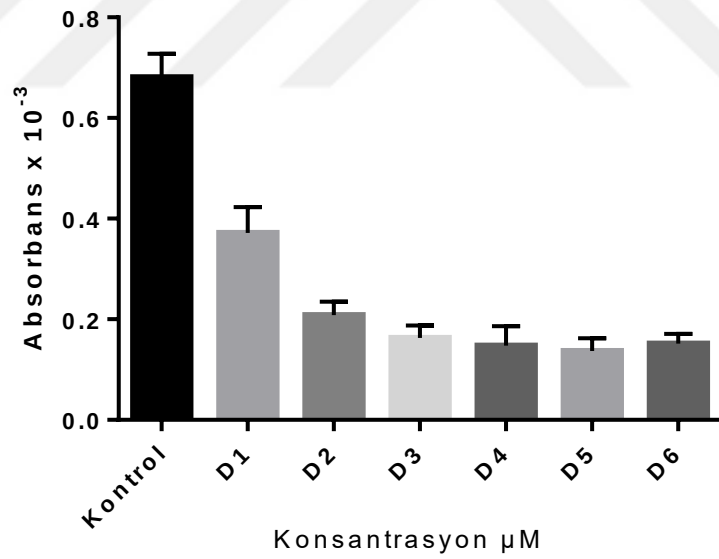
p<0,05: * (kontrole göre anlamlılık); p<0,01: ** (kontrole göre anlamlılık)



Şekil 4.5: 24 saat süresince BEAS-2B hücrelerine uygulanan Cisplatin konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm$ SD).

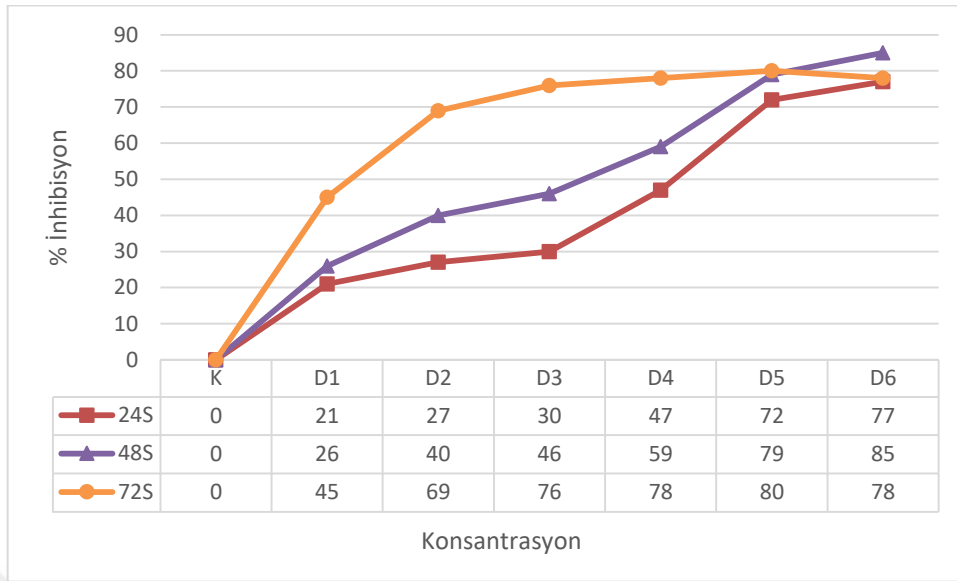


Şekil 4.6: 48 saat süresince BEAS-2B hücrelerine uygulanan Cisplatin konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm\text{SD}$).



Şekil 4.7: 72 saat süresince BEAS-2B hücrelerine uygulanan Cisplatin konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm\text{SD}$).

BEAS-2B hücrelerine uygulanan farklı Cisplatin konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72 saat süreleri sonunda meydana getirdiği sitotoksik etkiye ait % inhibisyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.8). Kontrol grubunun canlılık oranı %100 kabul edilmiştir.



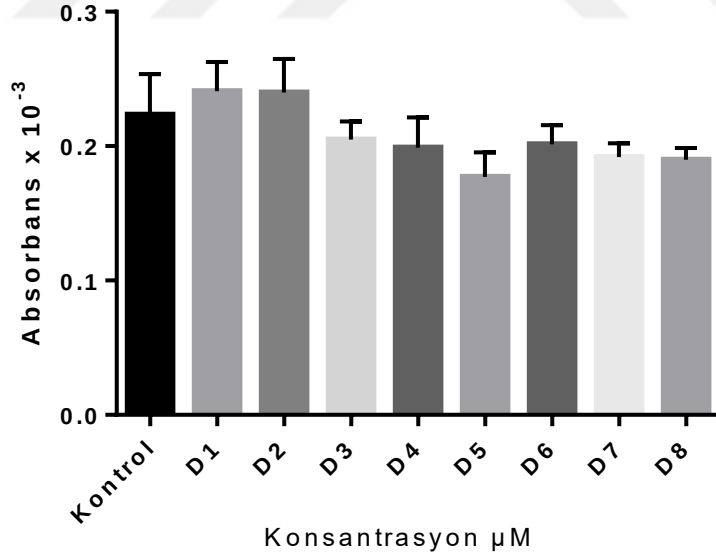
Şekil 4.8: Farklı Cisplatin konsantrasyonları uygulanan BEAS-2B hücrelerinde % inhibisyon değerleri.

Deneylerimizde kullanılan diğer kimyasal ajan olan Pemetrex'in A549 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanması sonucunda ölçülen absorbans değerleri Tablo 4.3'de verilmiştir (D1: 0,125 μ M, D2: 0,25 μ M, D3: 0,5 μ M, D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M, D7: 8 μ M, D8: 16 μ M). Absorbans değerlerine ait grafikler, 24 saat için Şekil 4.9, 48 saat için Şekil 4.10, 72 saat için Şekil 4.11'de verilmiştir. 24 saat deney gruplarından D5 ($p<0,01$), D7 ve D8'in ($p<0,05$) kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir. 24 saatte en yüksek sitotoksik etkinin D5 konsantrasyonunda olduğu belirlenmiştir. 48 saat sonunda absorbans değerleri ölçülen kontrol ve deney gruplarından D3, D4, D5, D6, D7 ve D8 gruplarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0,01$), D1 ve D2 gruplarına ait absorbans değerleri ile kontrol arasındaki farkın anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Pemetrex ilacının A549 hücrelerine 72 saat uygulanması sonucunda kontrol ve D3 grubu arasındaki farkın anlamlı olmadığı, diğer grupların kontrolle arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p<0,01$) tespit edilmiştir.

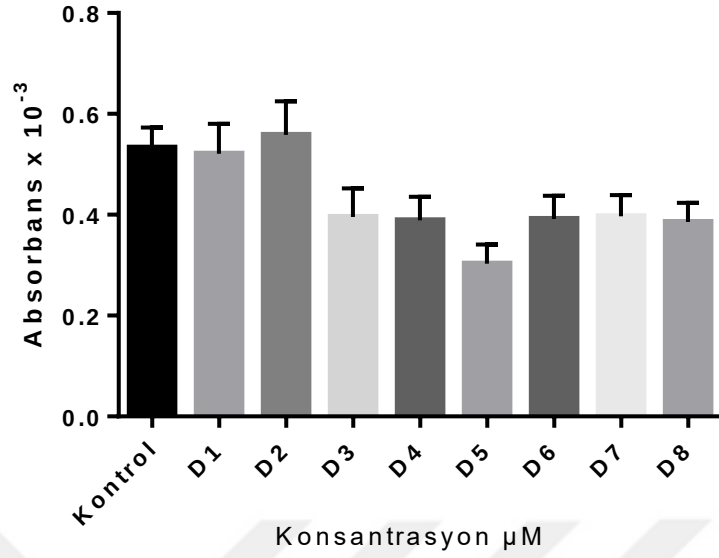
Tablo 4.3: A549 hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat Pentrex ilacının uygulanması sonunda ölçülen absorbens ortalamaları ve standart sapma ($\pm$ SD) değerleri (D1: 0,125 μ M, D2: 0,25 μ M, D3: 0,5 μ M, D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M, D7: 8 μ M, D8: 16 μ M).

Deney Grupları	Absorbans Değerleri (570-690 nm Dalga Boyu)		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol	223,33x10 ⁻³ $\pm$ 0,03	532,66x10 ⁻³ $\pm$ 0,04	668,53x10 ⁻³ $\pm$ 0,03
D1	240,8x10 ⁻³ $\pm$ 0,02	521,13x10 ⁻³ $\pm$ 0,03	888,14x10 ⁻³ $\pm$ 0,03**
D2	239,93x10 ⁻³ $\pm$ 0,03	558,33x10 ⁻³ $\pm$ 0,04	875,26x10 ⁻³ $\pm$ 0,04**
D3	204,86x10 ⁻³ $\pm$ 0,01	395,8x10 ⁻³ $\pm$ 0,04**	601,46x10 ⁻³ $\pm$ 0,04
D4	198,93x10 ⁻³ $\pm$ 0,02	389x10 ⁻³ $\pm$ 0,04**	521,8x10 ⁻³ $\pm$ 0,04**
D5	177,06x10 ⁻³ $\pm$ 0,02**	291,8x10 ⁻³ $\pm$ 0,03**	474,8x10 ⁻³ $\pm$ 0,04**
D6	200,4x10 ⁻³ $\pm$ 0,01	372,8x10 ⁻³ $\pm$ 0,04**	514,33x10 ⁻³ $\pm$ 0,02**
D7	190,8x10 ⁻³ $\pm$ 0,01*	388,13x10 ⁻³ $\pm$ 0,04**	441,46x10 ⁻³ $\pm$ 0,03**
D8	187,6x10 ⁻³ $\pm$ 0,008*	367,8x10 ⁻³ $\pm$ 0,03**	374,8x10 ⁻³ $\pm$ 0,02**

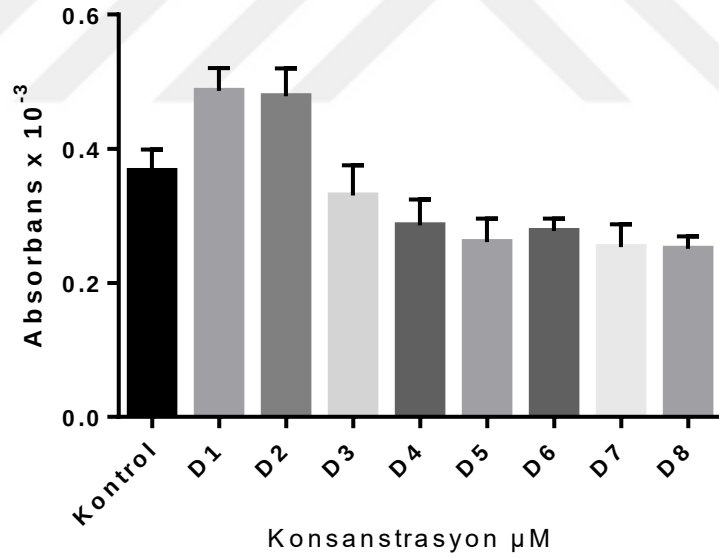
p<0,05: * (kontrole göre anlamlılık); p<0,01: ** (kontrole göre anlamlılık)



Şekil 4.9: 24 saat süresince A549 hücrelerine uygulanan Pentrex konsantrasyonlarında tespit edilen absorbens değerleri ($\pm$ SD).

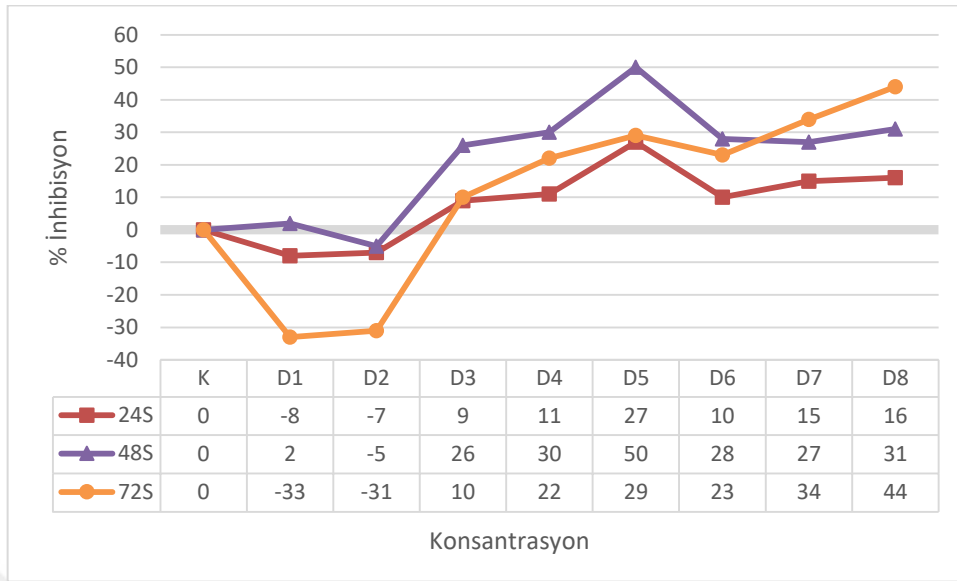


Şekil 4.10: 48 saat süresince A549 hücrelerine uygulanan Pentrex konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm$ SD).



Şekil 4.11: 72 saat süresince A549 hücrelerine uygulanan Pentrex konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm$ SD).

A549 hücrelerine uygulanan Pentrex ilacına ait farklı konsantrasyonların 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süresi sonunda meydana gelen sitotoksik aktiviteleri saptanarak, deney gruplarının % inhibisyon grafikleri, kontrol grubu %100 kabul edilerek grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.12).



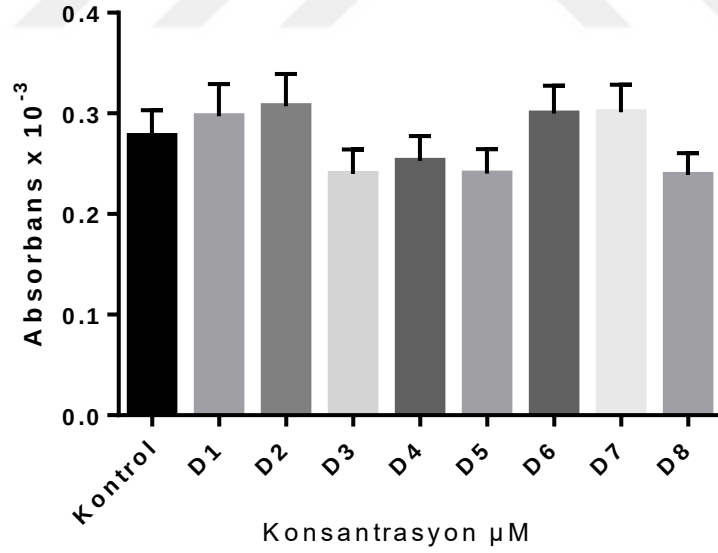
Şekil 4.12: Farklı Pentrex konsantrasyonları uygulanan A549 hücrelerine ait % inhibisyon grafiği.

Pentrex ilacının (D1: 0,125 μ M, D2: 0,25 μ M, D3: 0,5 μ M, D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M, D7: 8 μ M, D8: 16 μ M) BEAS-2B hücrelerine 24, 48 ve 72 saat uygulanması sonucunda ölçülen absorbans değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir. Absorbans grafikleri 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla Şekil 4.13, Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te verilmiştir. 24 saat deney gruplarının istatistiksel analizleri sonucunda D3, D5 ve D8 gruplarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur ($p < 0,01$). Pentrex'in 48 saat süresince uygulandığı deney gruplarının kontrole göre anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir ($p < 0,01$). Deney grupları arasında yapılan analizler sonucunda D1 ile D6 ($p < 0,01$), D7 ($p < 0,05$) ve D8 ($p < 0,01$) ile D8 ile D2, D4 ve D5 ($p < 0,05$) grupları arasında anlamlı bir farkın olduğu tespit edilmiştir. Pentrex ilacının 72 saat deney gruplarına uygulanması sonucunda absorbans değerlerinin kontrole göre anlamlı olarak azaldığı ($p < 0,01$) belirlenmiştir. D1 ile D2, D2 ile D3, D4 ile D6 ve D7, D5 ile D6, D7 ve D8, D6 ile D ve D8, D7 ile D8 arasındaki farkın anlamlı olmadığı, diğer gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p < 0,01$) saptanmıştır.

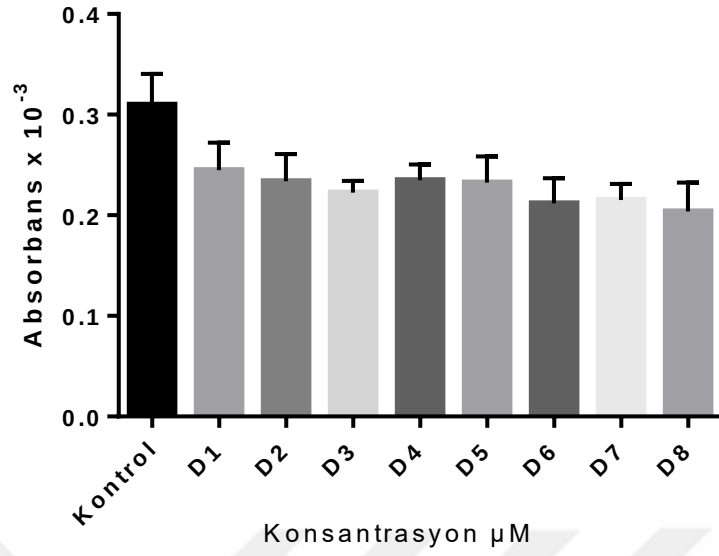
Tablo 4.4: BEAS-2B hücrelerinin 24, 48 ve 72 saat Pemetrex ilacının uygulanması sonunda ölçülen absorbans ortalamaları ve standart sapma ($\pm$ SD) değerleri (D1: 0,125 μ M, D2: 0,25 μ M, D3: 0,5 μ M, D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M, D7: 8 μ M, D8: 16 μ M).

Deney Grupları	Absorbans Değerleri (570-690 nm Dalga Boyu)		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Kontrol	$277,46 \times 10^{-3} \pm 0,03$	$353 \times 10^{-3} \pm 0,04$	$431,26 \times 10^{-3} \pm 0,03$
D1	$297 \times 10^{-3} \pm 0,03$	$276,13 \times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	$314,53 \times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$
D2	$307,26 \times 10^{-3} \pm 0,03$	$224,96 \times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	$292,66 \times 10^{-3} \pm 0,04^{**}$
D3	$239,53 \times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	$219,33 \times 10^{-3} \pm 0,01^{**}$	$262,4 \times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$
D4	$252,66 \times 10^{-3} \pm 0,02$	$217,33 \times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	$208,2 \times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$
D5	$240,3 \times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	$207,93 \times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	$190,33 \times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$
D6	$274,73 \times 10^{-3} \pm 0,03$	$187,33 \times 10^{-3} \pm 0,04^{**}$	$180,33 \times 10^{-3} \pm 0,04^{**}$
D7	$293 \times 10^{-3} \pm 0,03$	$201,4 \times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	$191,93 \times 10^{-3} \pm 0,04^{**}$
D8	$237,1 \times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	$197,86 \times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	$153,53 \times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$

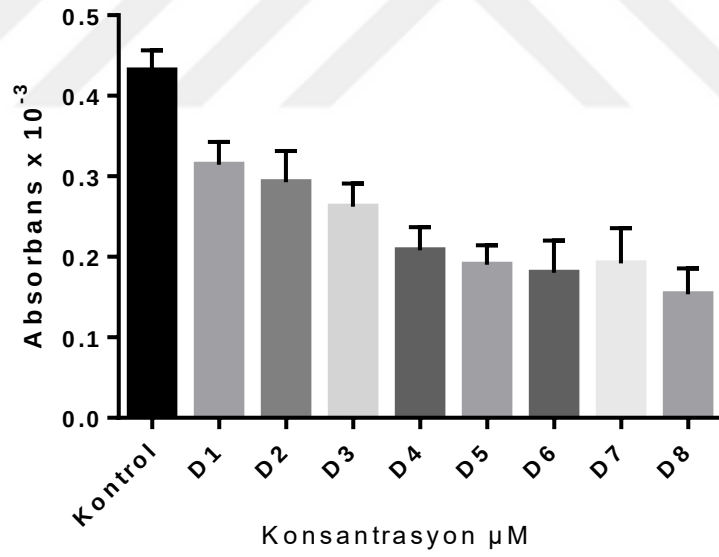
p<0,05: * (kontrole göre anlamlılık); p<0,01: ** (kontrole göre anlamlılık)



Şekil 4.13: 24 saat süresince BEAS-2B hücrelerine uygulanan Pemetrex konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm$ SD).

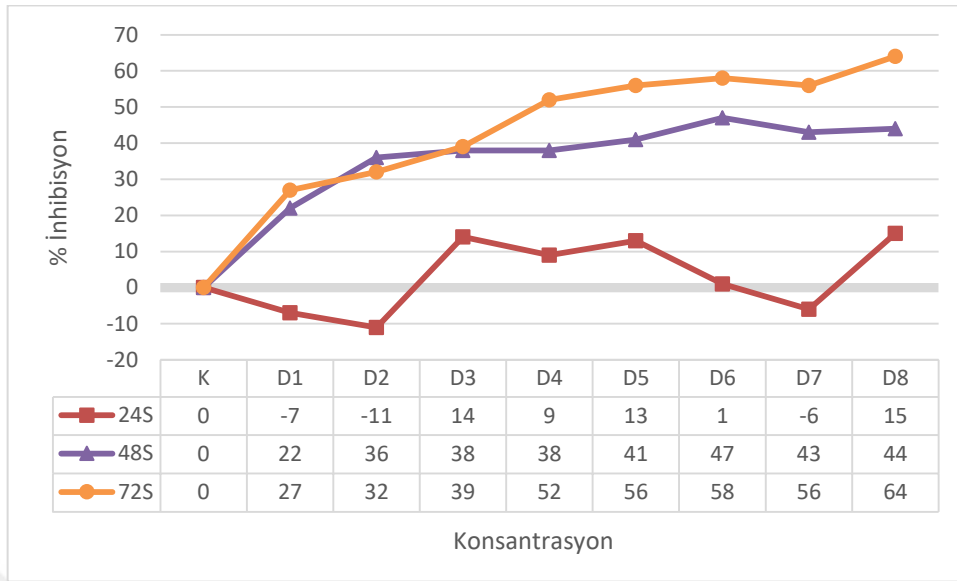


Şekil 4.14: 48 saat süresince BEAS-2B hücrelerine uygulanan Pentrex konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm\text{SD}$).



Şekil 4.15: 72 saat süresince BEAS-2B hücrelerine uygulanan Pentrex konsantrasyonlarında tespit edilen absorbans değerleri ($\pm\text{SD}$).

Farklı Pentrex konsantrasyonlarının (D1: 0,125 μM , D2: 0,25 μM , D3: 0,5 μM , D4: 1 μM , D5: 2 μM , D6: 4 μM , D7: 8 μM , D8: 16 μM) BEAS-2B hücrelerine 24, 48 ve 72 saat uygulanması sonucunda meydana gelen sitotoksik etkiye ait % inhibisyon grafiği Şekil 4.16'da verilmiştir.



Şekil 4.16: Farklı Pemetrex konsantrasyonları uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait % inhibisyon grafiği.

A549 ve BEAS-2B hücrelerine 24, 48 ve 72 saat boyunca ayrı ayrı uygulanan Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücreleri üzerinde 24 saat gruplarında meydana getirdikleri sitotoksik etki göz önünde bulundurularak, Cisplatin ve Pemetrex ilaçları 24 saat ara ile denenmiştir.

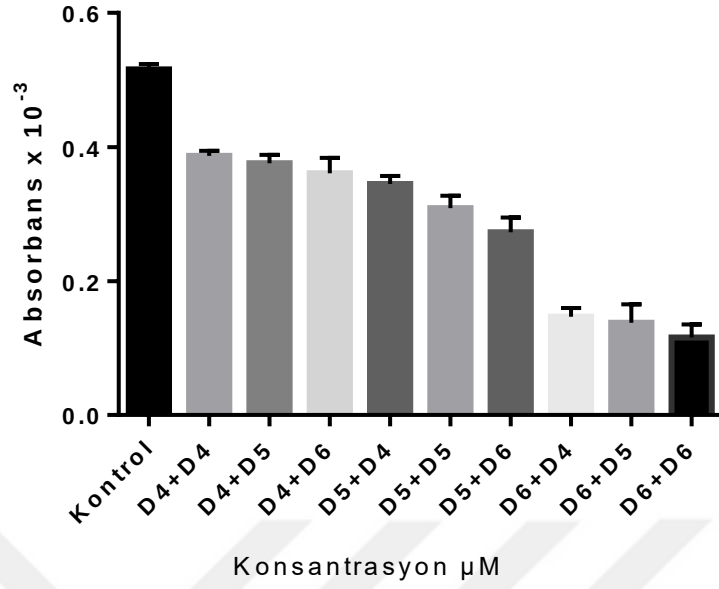
A549 ve BEAS-2B hücrelerine önce Cisplatin ilacı uygulanarak (D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M), 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda Cisplatin ilacı uzaklaştırılarak, Pemetrex ilacı konsantrasyonları (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) uygulanarak 24 saat tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda MTT metodu kullanılarak sitotoksik aktivitesi ölçülerek, absorbans değerleri belirlenmiştir (Tablo 4.5). A549 hücreleri için absorbans grafiği Şekil 4.17, BEAS-2B hücreleri için absorbans grafiği Şekil 4.18’de verilmiştir. Hücrelerde meydana gelen inhibisyona ait grafikler, A549 hücreleri için Şekil 4.19-21, BEAS-2B hücreleri için Şekil 4.22-24’te verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda, A549 ve BEAS-2B hücrelerine ait kontrol grupları ile deney grupları arasındaki farkın anlamlı ($p < 0,01$) olduğu belirlenmiştir. A549 hücrelerine ait deney grupları arasında yapılan analizler sonucunda D6+D4 ile D6+D5 arasındaki farkın anlamlı olmadığı, diğer gruplar arasındaki farkın ise anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,01$). BEAS-2B hücreleri deney gruplarından D4+D4 ile D4+D5, D4+D6, D6+D4, D6+D5 ve D6+D6 grupları arasında, D4+D5 ile D6+D5 ve D6+D6 grupları

arasında, D4+D6 ile D6+D5 ve D6+D6 grupları arasında, D4+D6 ile D6+D5 ve D6+D6 grupları arasında, D5+D4 ile D5+D5, D5+D6 ve D6+D4 grupları arasında, D5+D5 ile D5+D6 ve D6+D4 grupları arasında, D5+D6 ile D6+D4 grupları arasında, D6+D4 ile D6+D6 grupları arasında, D6+D5 ve D6+D6 grupları arasındaki farkın anlamlı olmadığı ($p>0,05$), diğer gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p<0,01$) tespit edilmiştir.

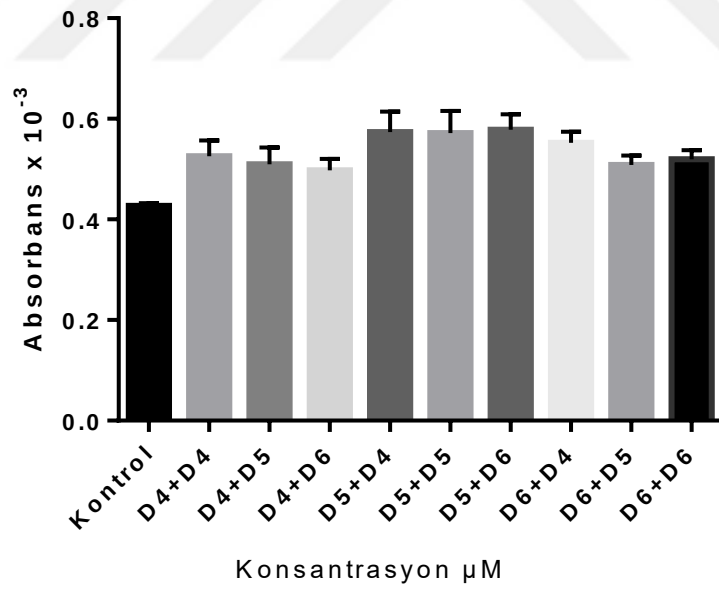
Tablo 4.5: A549 ve BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile Cisplatin (D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) ve Pentrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) ilaçlarının uygulanması sonunda ölçülen absorbens değerleri ($\pm$ SD).

Deney Grupları	Absorbans Değerleri (570-690 nm Dalga Boyu)	
	A549	BEAS-2B
Kontrol	516 $\times 10^{-3} \pm 0,007$	460,62 $\times 10^{-3} \pm 0,005$
D4+D4	387,13 $\times 10^{-3} \pm 0,007^{**}$	513,12 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$
D4+D5	376,33 $\times 10^{-3} \pm 0,01^{**}$	455,5 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$
D4+D6	361,21 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	439,5 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$
D5+D4	345,14 $\times 10^{-3} \pm 0,01^{**}$	573,5 $\times 10^{-3} \pm 0,04^{**}$
D5+D5	309,15 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	571,75 $\times 10^{-3} \pm 0,04^{**}$
D5+D6	273,33 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	578,62 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$
D6+D4	147,47 $\times 10^{-3} \pm 0,01^{**}$	423 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$
D6+D5	139,16 $\times 10^{-3} \pm 0,03^{**}$	366,75 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$
D6+D6	115,3 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$	385,87 $\times 10^{-3} \pm 0,02^{**}$

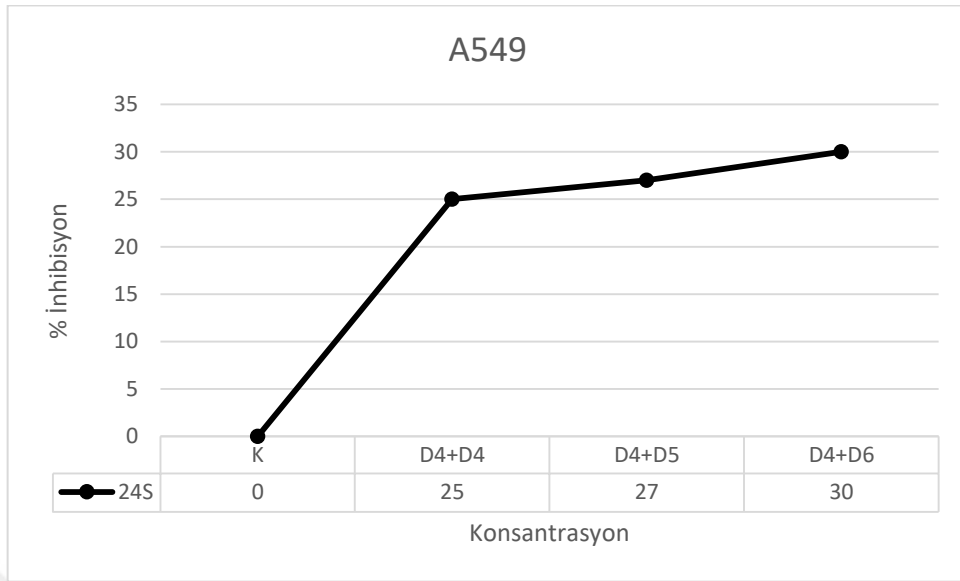
$p<0,05$: * (kontrole göre anlamlılık); $p<0,01$: ** (kontrole göre anlamlılık)



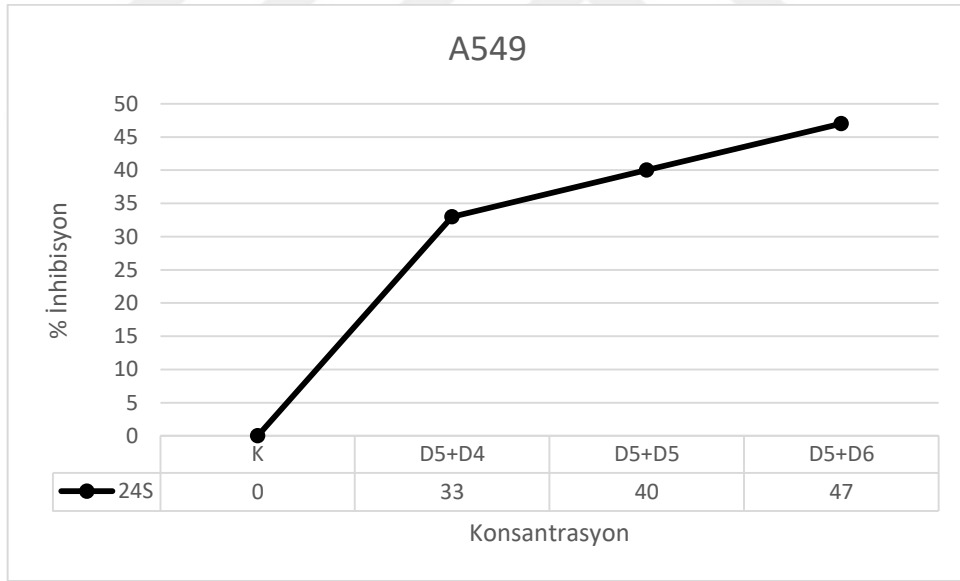
Şekil 4.17: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin ve Pentrex ilaçlarının tespit edilen absorbans değerleri ($\pm\text{SD}$).



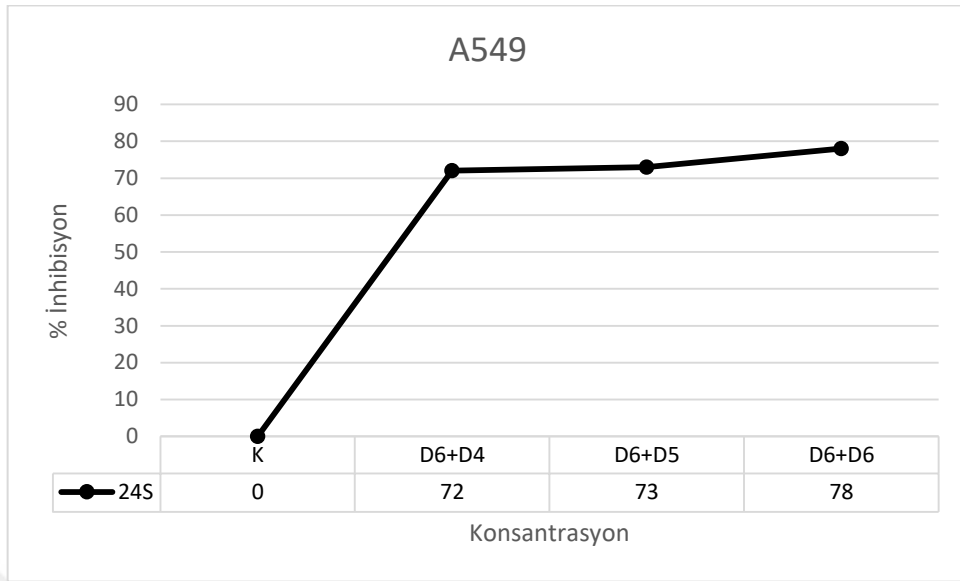
Şekil 4.18: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin ve Pentrex ilaçlarının tespit edilen absorbans değerleri ($\pm\text{SD}$).



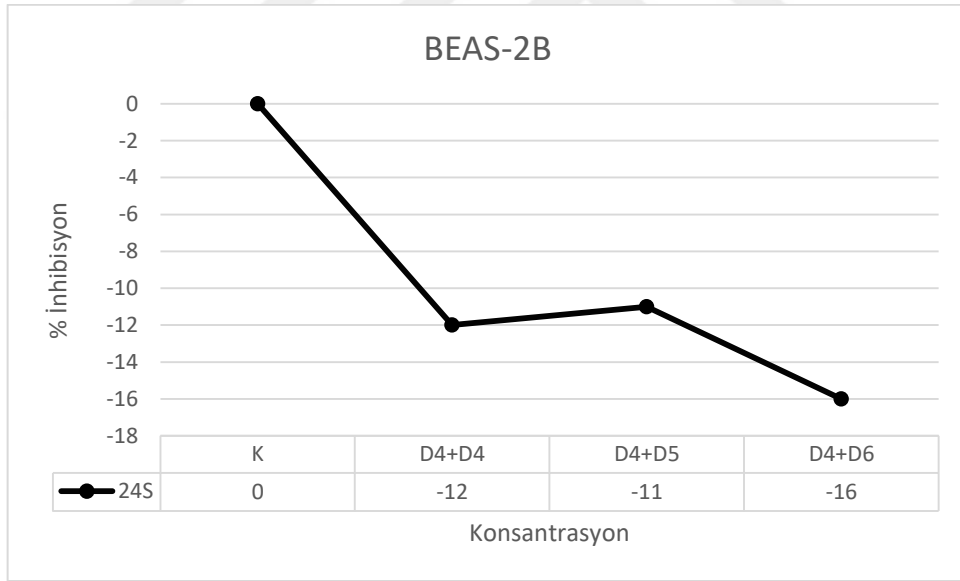
Şekil 4.19: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin (D4: 40 μ M) ve Pemetrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.



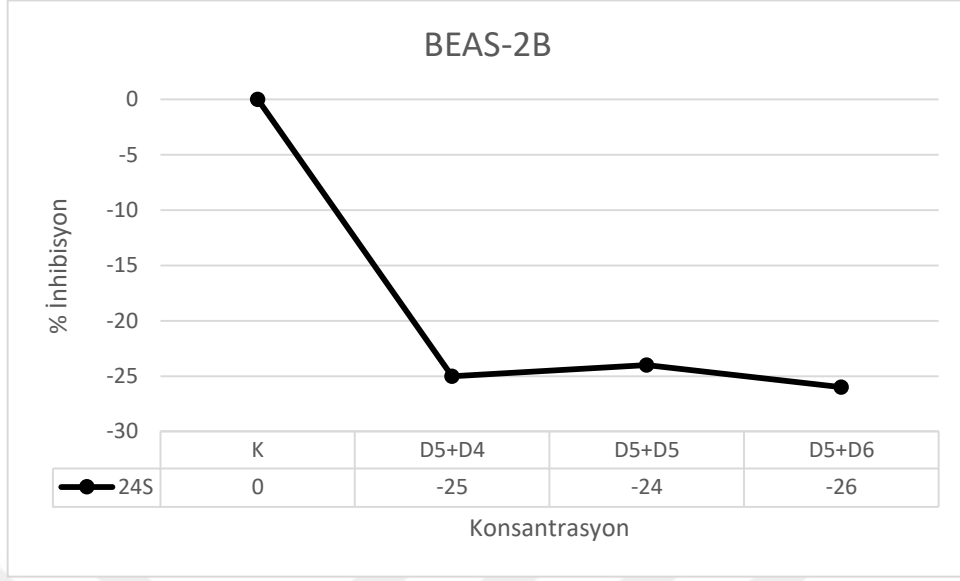
Şekil 4.20: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin (D5:80 μ M) ve Pemetrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.



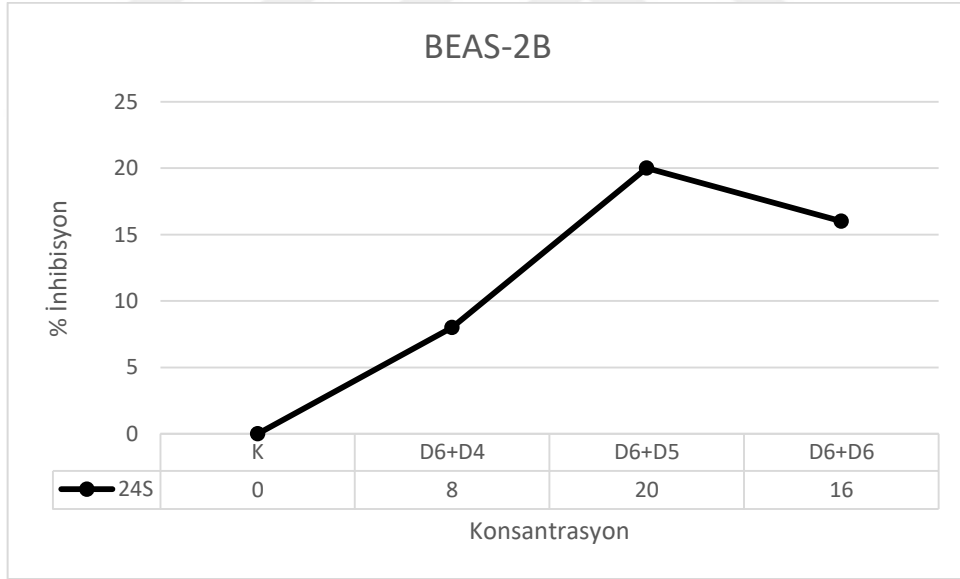
Şekil 4.21: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin (D6:160 μ M) ve Pentrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.22: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin (D4: 40 μ M) ve Pentrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.23: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin (D5: 80 μ M) ve Pentrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.24: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin (D6: 160 μ M) ve Pentrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.

A549 ve BEAS-2B hücrelerine önce Pentrex ilacı (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) uygulanarak, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda Pentrex ilacı uzaklaştırılarak, Cisplatin ilacı konsantrasyonları (D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) uygulanarak 24 saat tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda ölçülen absorbans değerleri Tablo 4.6'da ve

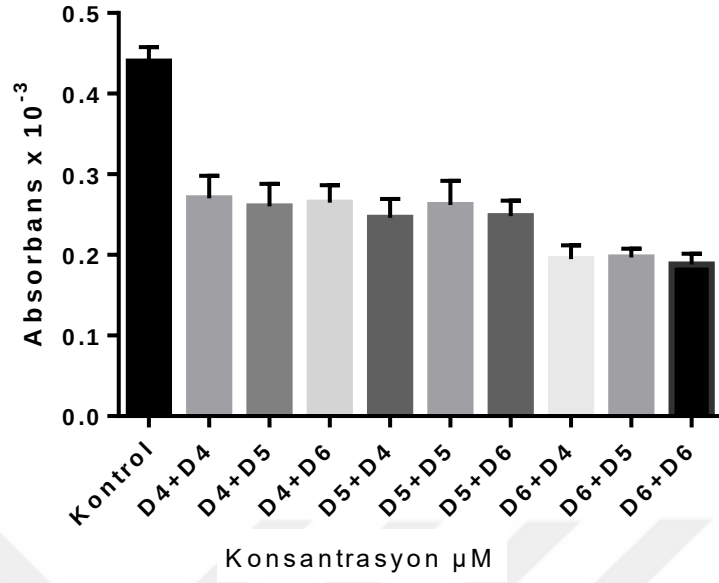
A549 hücreleri için Şekil 4.25, BEAS-2B hücreleri için Şekil 4.26'da verilmiştir. A549 hücrelerine ait inhibisyon grafikleri D4 grubu için Şekil 4.27, D5 grubu için Şekil 4.28 ve D6 grubu için Şekil 4.29'da, BEAS-2B hücrelerine ait inhibisyon grafikleri D4 grubu için Şekil 4.30, D5 grubu için 4.31, D6 grubu için ise Şekil 4.32'de verilmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda A549 hücrelerine ait kontrol grubu ile deney gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0,01$) saptanmıştır. D4+D4 ve D4+D6 grubu arasındaki farkın, D5+D4 ile D5+D6 grubu arasındaki farkın, D6+D4 grubu ile D6+D5 ve D6+D6 grupları arasındaki farkın, D4+D5 ile D4+D6 grubu arasındaki farkın, D5+D5 ile D4+D6 grupları arasındaki farkın anlamlı olmadığı ($p>0,05$), diğer gruplar arasındaki farkın ise anlamlı olduğu ($p<0,01$) belirlenmiştir.

BEAS-2B hücrelerine ait deney grupları arasında yapılan istatistiksel analizler sonucunda, kontrol grubu ile D5+D4 arasındaki farkın anlamlı olmadığı ($p>0,05$), diğer grupların kontrol ile arasındaki farkın anlamlı olduğu ($p<0,01$) saptanmıştır. Deney grupları arasında yapılan analizler sonunda, D4+D4 ile D4+D5, D4+D6 ve D6+D4 grupları arasında, D4+D5 ile D4+D6, D6+D4 ve D6+D5 grupları arasında, D5+D5 ve D5+D6 grupları arasında, D6+D4 ile D6+D5 ve D6+D6 grupları arasında farkın anlamlı olmadığı, diğer gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir.

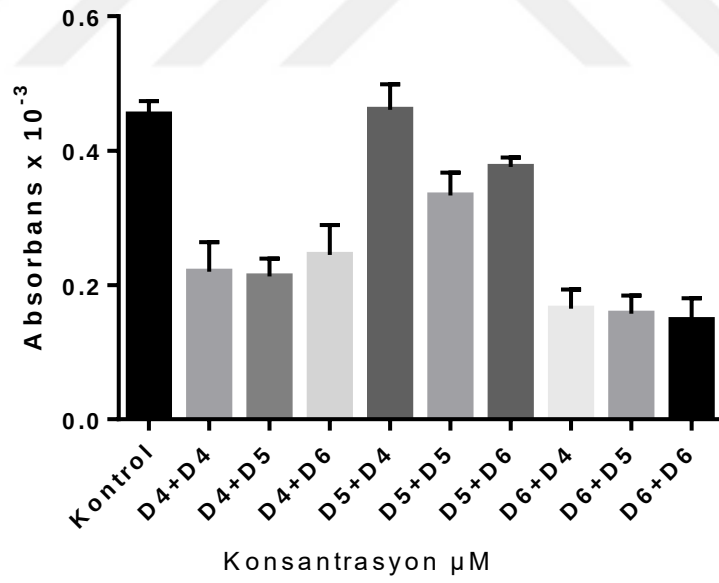
Tablo 4.6: A549 ve BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile Pemptrex (D4: 1 µM, D5: 2 µM, D6: 4 µM) ve Cisplatin (D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) ilaçlarının uygulanması sonunda ölçülen absorbans değerleri ($\pm$ SD).

Deney Grupları	Absorbans Değerleri (570-690 nm Dalga Boyu)	
	A549	BEAS-2B
Kontrol	440,4x10 ⁻³ $\pm$ 0,02	454x10 ⁻³ $\pm$ 0,02
D4+D4	270,66x10 ⁻³ $\pm$ 0,03**	219,87x10 ⁻³ $\pm$ 0,04**
D4+D5	259,1x10 ⁻³ $\pm$ 0,03**	213x10 ⁻³ $\pm$ 0,03**
D4+D6	265,08 x10 ⁻³ $\pm$ 0,02**	244,75x10 ⁻³ $\pm$ 0,04**
D5+D4	245,1x10 ⁻³ $\pm$ 0,03**	461x10 ⁻³ $\pm$ 0,04
D5+D5	262,08x10 ⁻³ $\pm$ 0,04**	333,5x10 ⁻³ $\pm$ 0,03**
D5+D6	248,06 x10 ⁻³ $\pm$ 0,03**	375,62x10 ⁻³ $\pm$ 0,01**
D6+D4	195,13x10 ⁻³ $\pm$ 0,02**	164,87x10 ⁻³ $\pm$ 0,03**
D6+D5	197,02 x10 ⁻³ $\pm$ 0,01**	157,37x10 ⁻³ $\pm$ 0,03**
D6+D6	188,33 x10 ⁻³ $\pm$ 0,02**	147,5x10 ⁻³ $\pm$ 0,03**

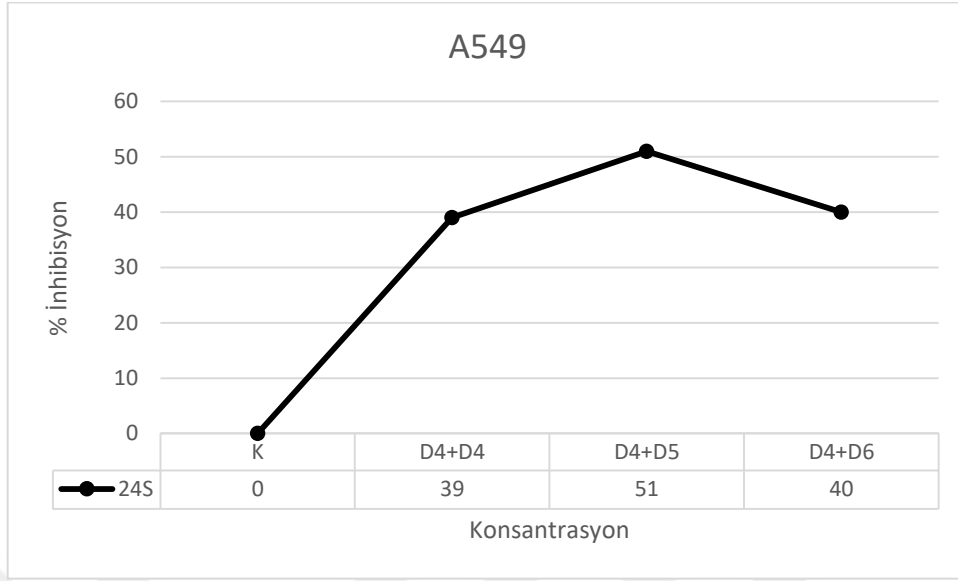
p<0,05: * (kontrole göre anlamlılık); p<0,01: ** (kontrole göre anlamlılık)



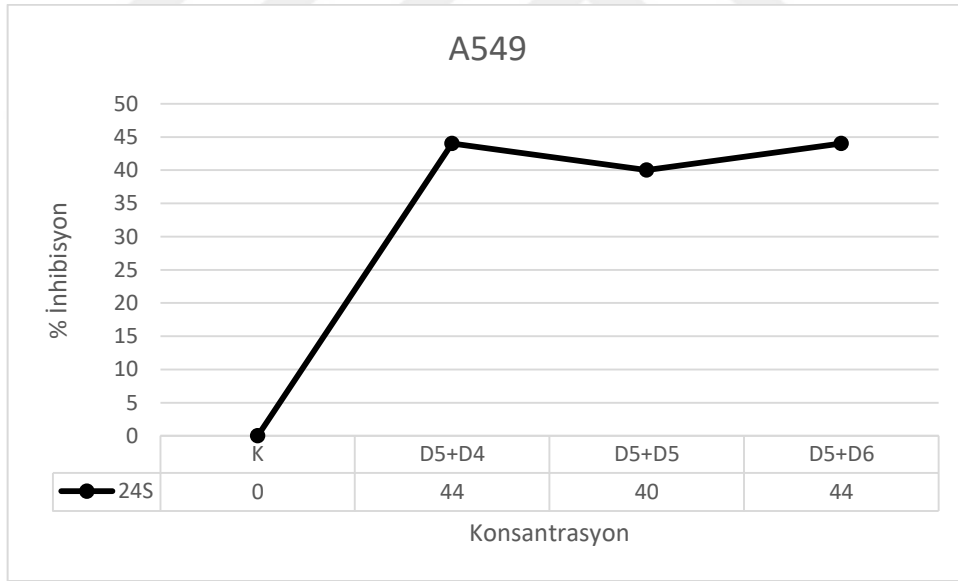
Şekil 4.25: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pemetrex ve Cisplatin ilaçlarının tespit edilen absorbans değerleri ($\pm\text{SD}$).



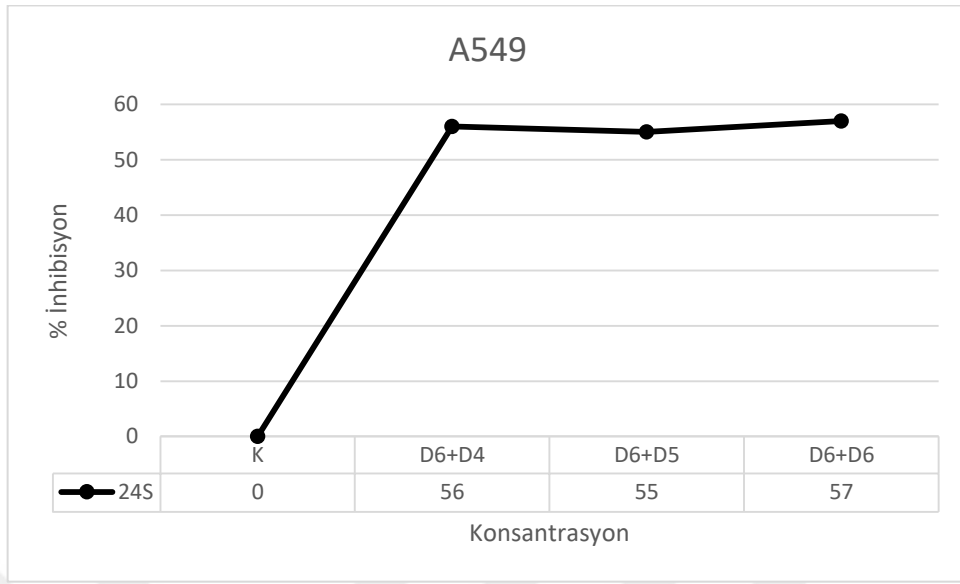
Şekil 4.26: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pemetrex ve Cisplatin ilaçlarının tespit edilen absorbans değerleri ($\pm\text{SD}$).



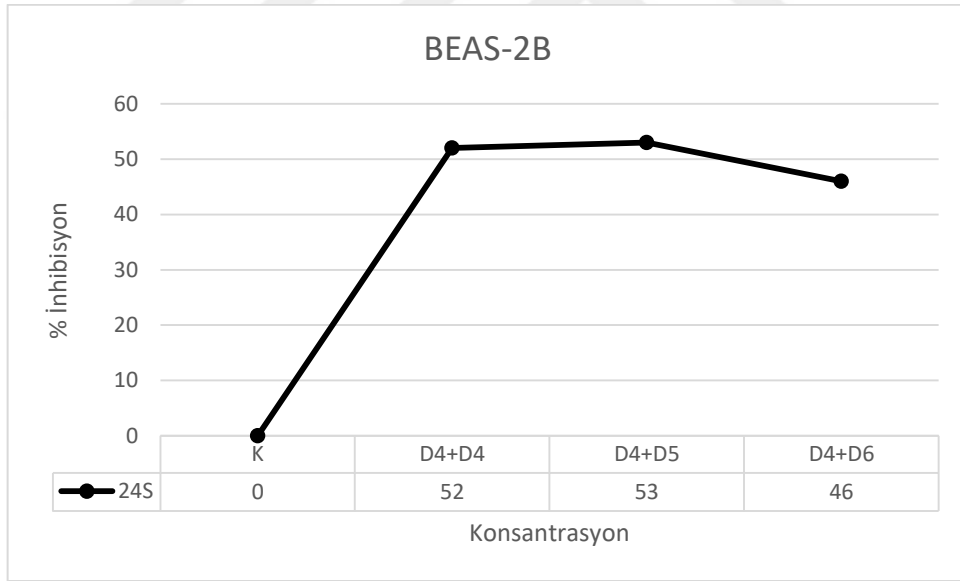
Şekil 4.27: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pemtrex (D4: 1 μ M) ve Cisplatin (D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.



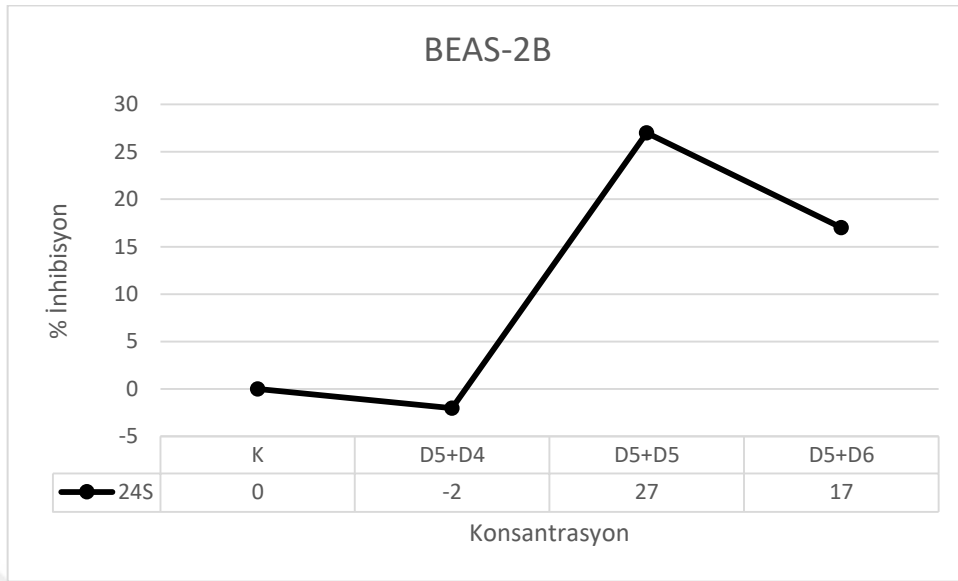
Şekil 4.28: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pemtrex (D5: 2 μ M) ve Cisplatin (D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.



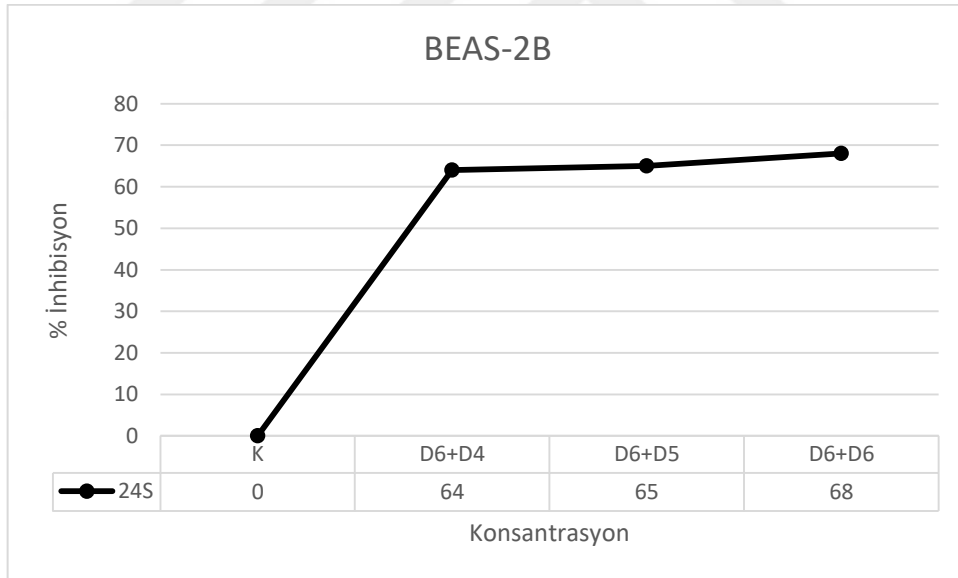
Şekil 4.29: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pemtrex (D6: 4 μ M) ve Cisplatin (D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.30: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pemtrex (D4: 1 μ M) ve Cisplatin (D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.31: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pemtrex (D5: 2µM) ve Cisplatin (D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.32: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pemtrex (D6: 4µM) ve Cisplatin (D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) ilaçlarının % inhibisyon grafiği.

İlaçların ayrı ayrı uygulandığı gruplara ait absorbans değerleri ve inhibisyon grafikleri sonucunda, Cisplatin ilacının BEAS-2B hücrelerinde meydana getirdiği sitotoksik etkinin A549 hücreleriyle karşılaştırıldığında daha fazla olduğu bulunmuştur. Pemtrex ilacı uygulanması sonucunda 24 saat sonunda, A549 hücrelerinde neden olduğu inhibisyonun BEAS-2B

hücreleriyle karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu görülmüştür. 48 ve 72 saat süreleri sonunda ise A549 hücreleri üzerine yarattığı etkinin BEAS-2B hücrelerine oranla daha az olduğu saptanmıştır.

A549 ve BEAS hücrelerine Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının 24 saat ara ile uygulanan deneyde, Cisplatin ilacının önce uygulandığı grupta A549 hücrelerinde inhibisyon görülürken, BEAS-2B hücrelerinde proliferasyon görülmüştür. Aynı konsantrasyonların uygulandığı hücrelerin canlılık yüzdeleri birbirlerine oranlandığında (BEAS-2B % Canlılık/A549 % Canlılık), D5 Cisplatin konsantrasyonunun 24 saat ara ile D5 ve D6 Pemetrex konsantrasyonları uygulanan gruplardaki oranların sırası ile 2,06 ve 2,37 olduğu, D6 Cisplatin konsantrasyonunun 24 saat ara ile D4, D5 ve D6 Pemetrex konsantrasyonları uygulanan gruplardaki oranın sırası ile 3,85, 4,44 ve 5,27 olarak saptanmıştır.

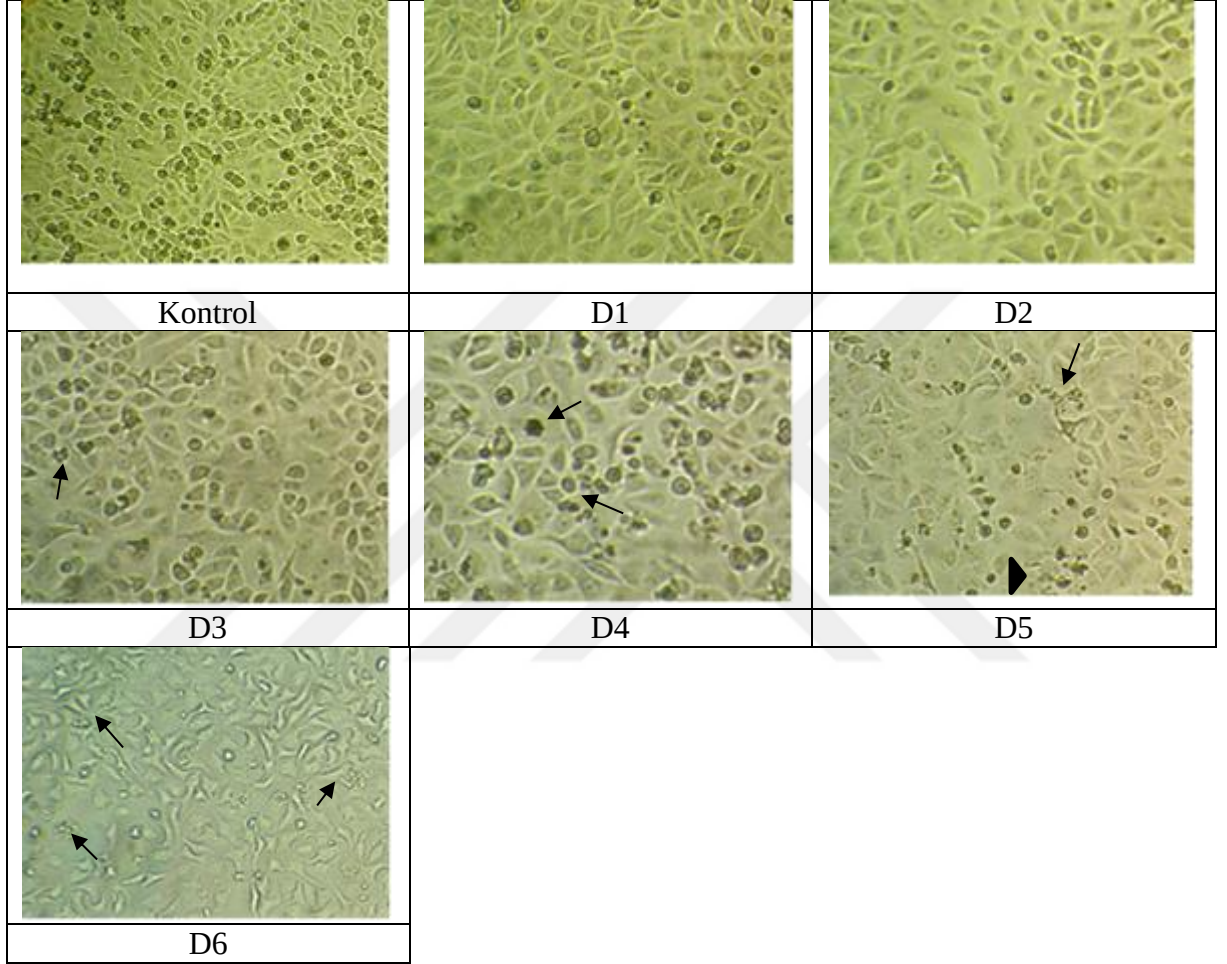
Pemetrex ilacının önce uygulandığı grupta A549 ve BEAS-2B hücrelerinde inhibisyon görülmüştür. Hücrelerin yüzde canlılıkları birbirlerine oranlandıklarında, aralarındaki farkların önce Cisplatin 24 saat ara ile Pemetrex konsantrasyonlarının uygulandığı gruplar arasındaki fark kadar yüksek olmadıkları görülmüştür.

Elde edilen sitotoksik bulgularına göre, Cisplatin ve Pemetrex ilaçları tek başlarına uygulandıklarında hem kanserli hücre soyu hem de normal hücre soyu üzerinde sitotoksik aktiviteye neden olurken, önce Cisplatin 24 saat sonra Pemetrex uygulanan deney gruplarında kanserli hücre soyu üzerine sitotoksik etki gösterirken, normal hücre soyu üzerinde sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Bu bağlamda, normal hücre soyu ile kanserli hücre soyu arasındaki oranlar ve ilaç konsantrasyonlarının molariteleri göz önünde bulundurularak, moleküler analizlerin normal hücrelere en az toksik olan, önce Cisplatin 24 saat sonra Pemetrex uygulanan D6+D4 grubuyla yapılmasına karar verilmiştir.

4.2. MORFOLOJİK DEĞERLENDİRME

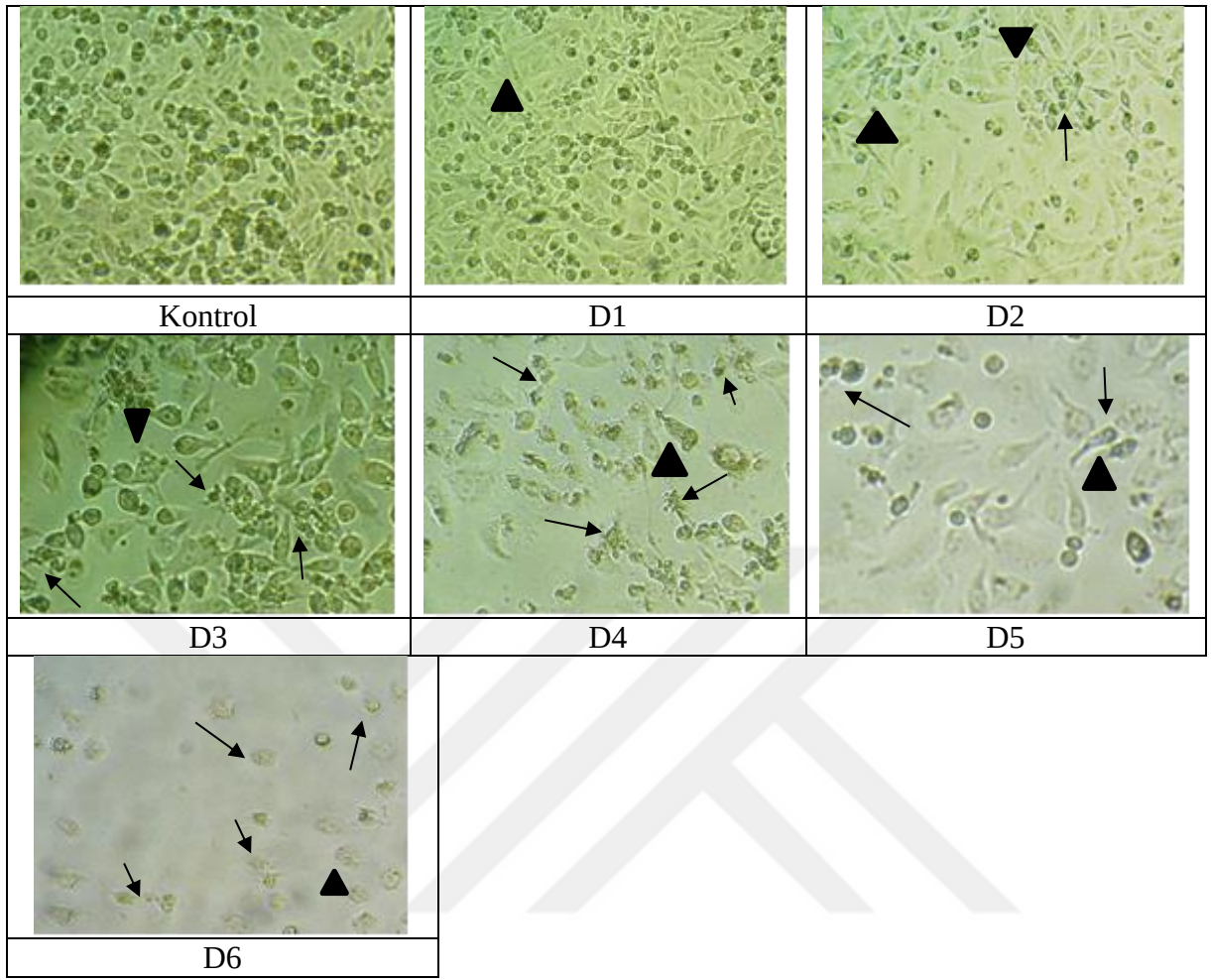
A549 ve BEAS-2B hücrelerine uygulanan Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının ayrı ayrı ve birbiri ardına uygulanan deney gruplarında meydana gelen morfolojik değişiklikler 24, 48 ve 72 saat sonunda faz kontrast mikroskobu aracılığıyla x25 büyütmede incelenerek, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak incelenmiştir.

Çeşitli Cisplatin konsantrasyonları uygulanan (D1: 5 μ M, D2: 10 μ M, D3: 20 μ M, D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) A549 hücrelerinde (Şekil 4.33-35), konsantrasyon ve zamana bağlı olarak, hücre morfolojilerinin değiştiği, hücrelerde granülleme meydana geldiği ve hücrelerin parçalanmaya başladığı tespit edilmiştir.



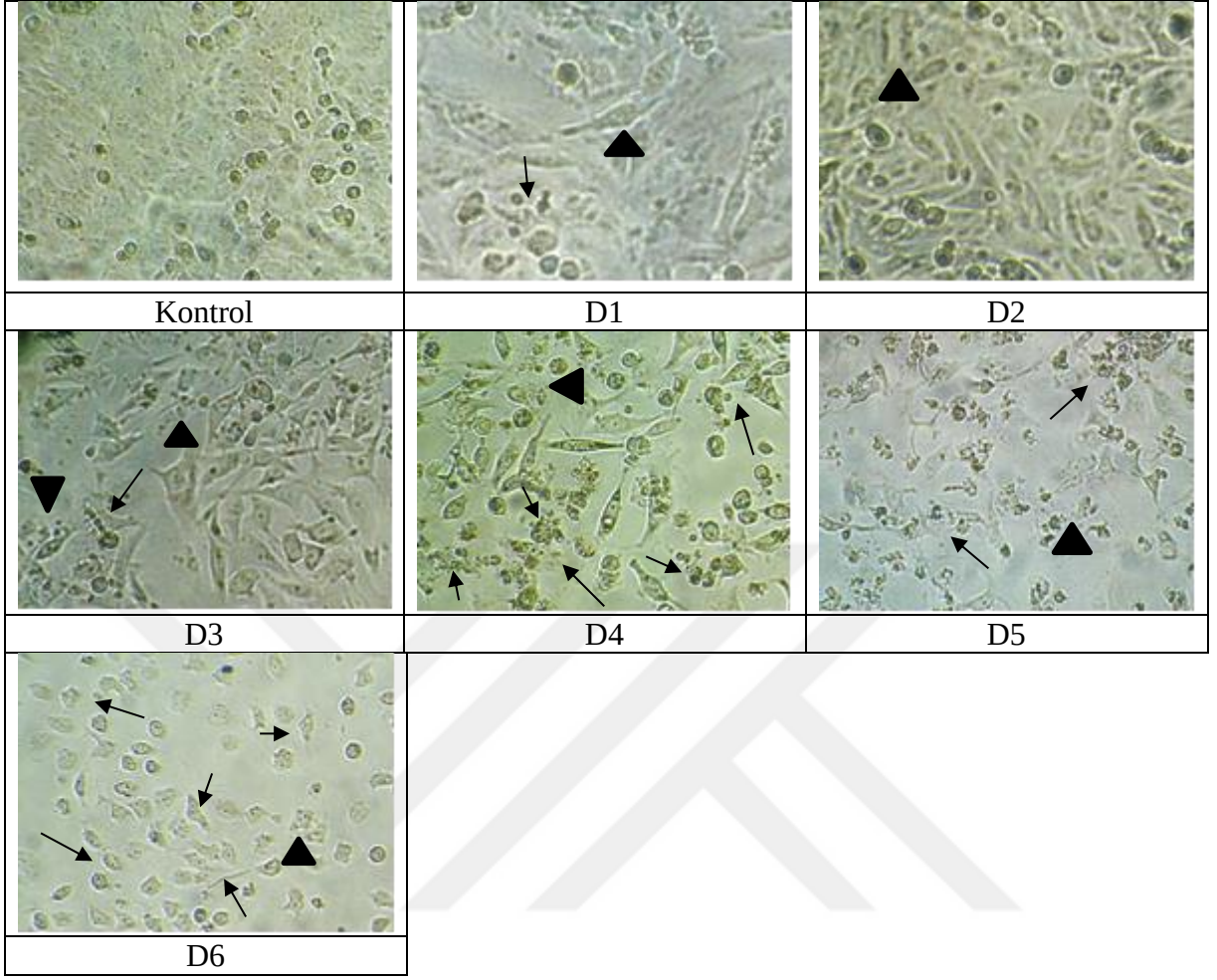
Şekil 4.33: A549 hücrelerinde Cisplatin'in çeşitli konsantrasyonlarının (D1: 5 μ M, D2: 10 μ M, D3: 20 μ M, D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) 24 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

($\rightarrow$: Hücre şeklinde bozulma; $\blacktriangleright$: Granül)



Şekil 4.34: A549 hücrelerinde Cisplatin'in çeşitli konsantrasyonlarının (D1: 5 μ M, D2: 10 μ M, D3: 20 μ M, D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) 48 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

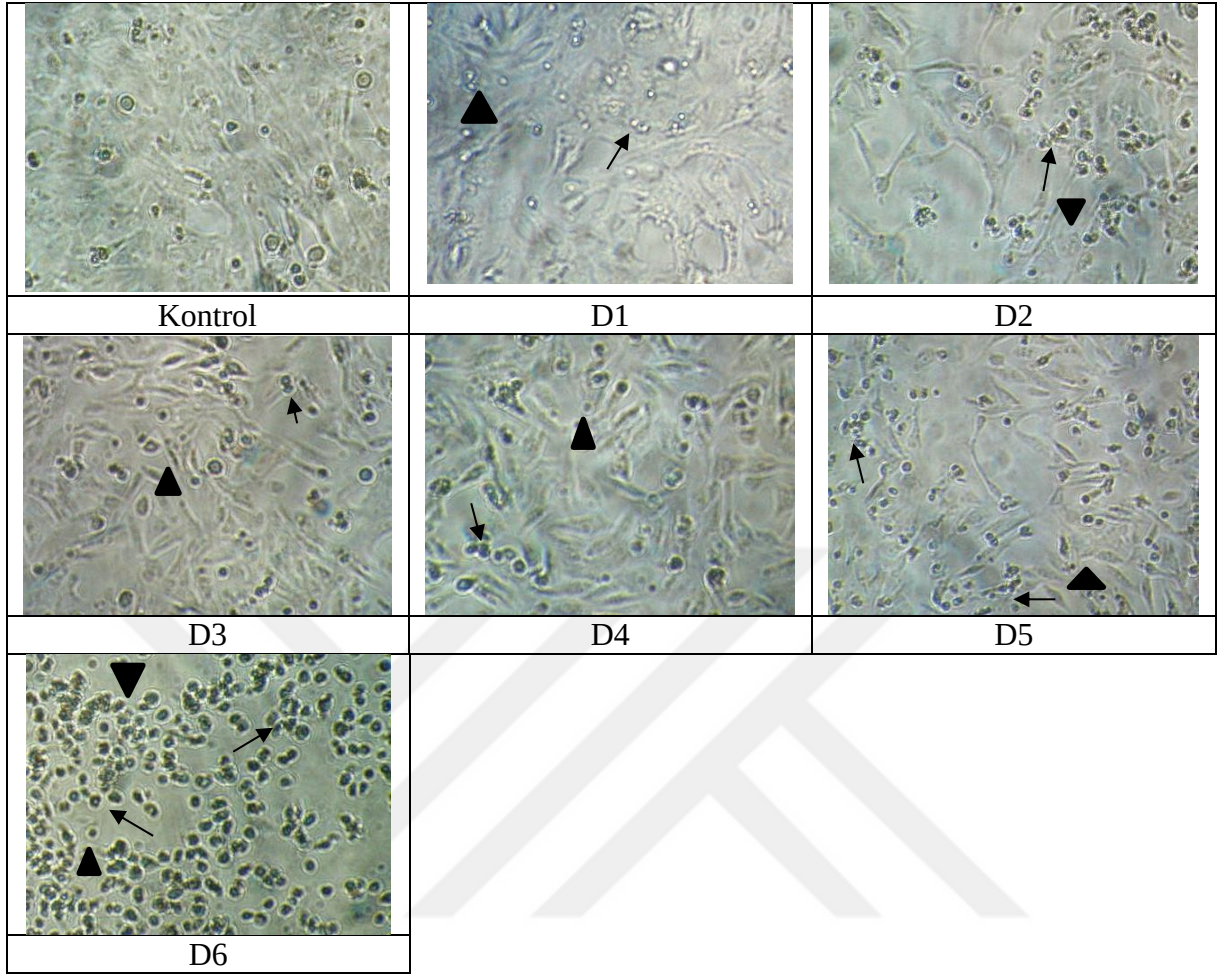
($\rightarrow$: Hücre şeklinde bozulma; $\blacktriangle$: Granül)



Şekil 4.35: A549 hücrelerinde Cisplatin'in çeşitli konsantrasyonlarının (D1: 5 μ M, D2: 10 μ M, D3: 20 μ M, D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) 72 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

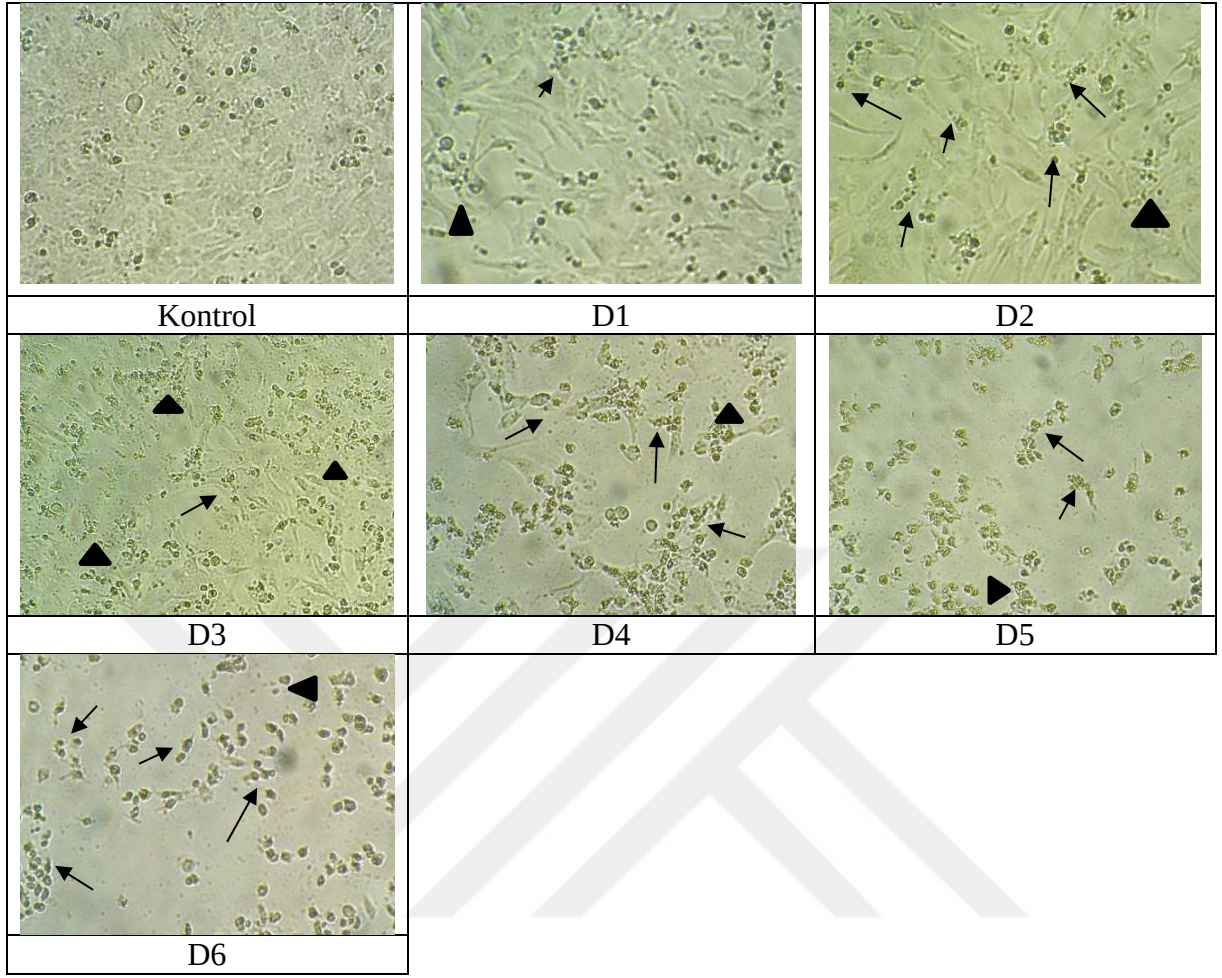
($\rightarrow$: Hücre şeklinde bozulma; $\blacktriangle$: Granül)

Çeşitli Cisplatin konsantrasyonları uygulanan (D1: 5 μ M, D2: 10 μ M, D3: 20 μ M, D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) BEAS-2B hücrelerinde (Şekil 4.36-38), uygulanan cisplatin konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine olarak, hücrelerde granüllenme meydana geldiği ve hücrelerin yuvarlaklaşarak tutunma yeteneklerinin azalmaya başladığı tespit edilmiştir.



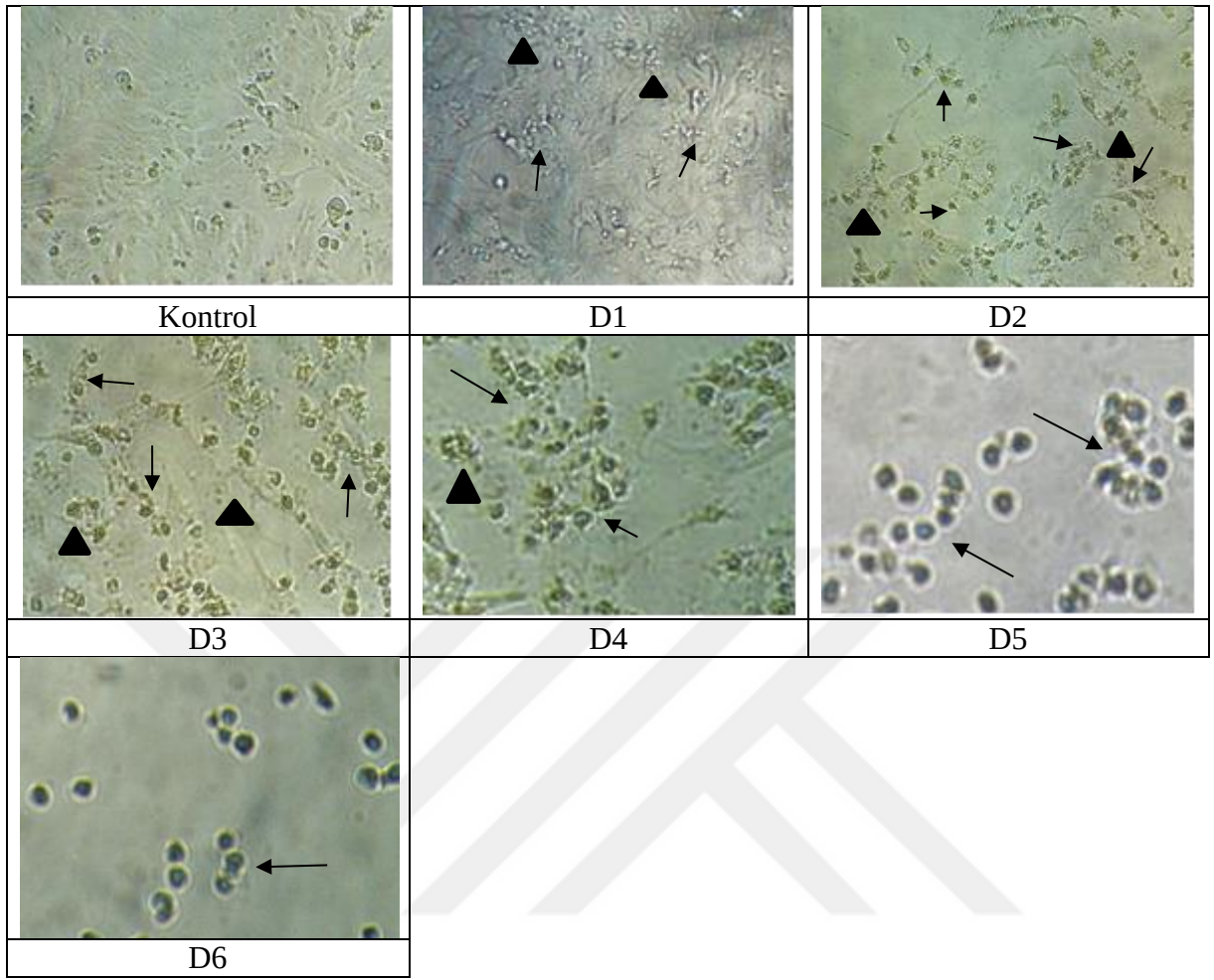
Şekil 4.36: BEAS-2B hücrelerinde Cisplatin'in çeşitli konsantrasyonlarının (D1: 5 µM, D2: 10 µM, D3: 20 µM, D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) 24 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

(→ : Hücre şeklinde bozulma; ► : Granül)



Şekil 4.37: BEAS-2B hücrelerinde Cisplatin'in çeşitli konsantrasyonlarının (D1: 5 µM, D2: 10 µM, D3: 20 µM, D4: 40 µM, D5: 80 µM, D6: 160 µM) 48 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

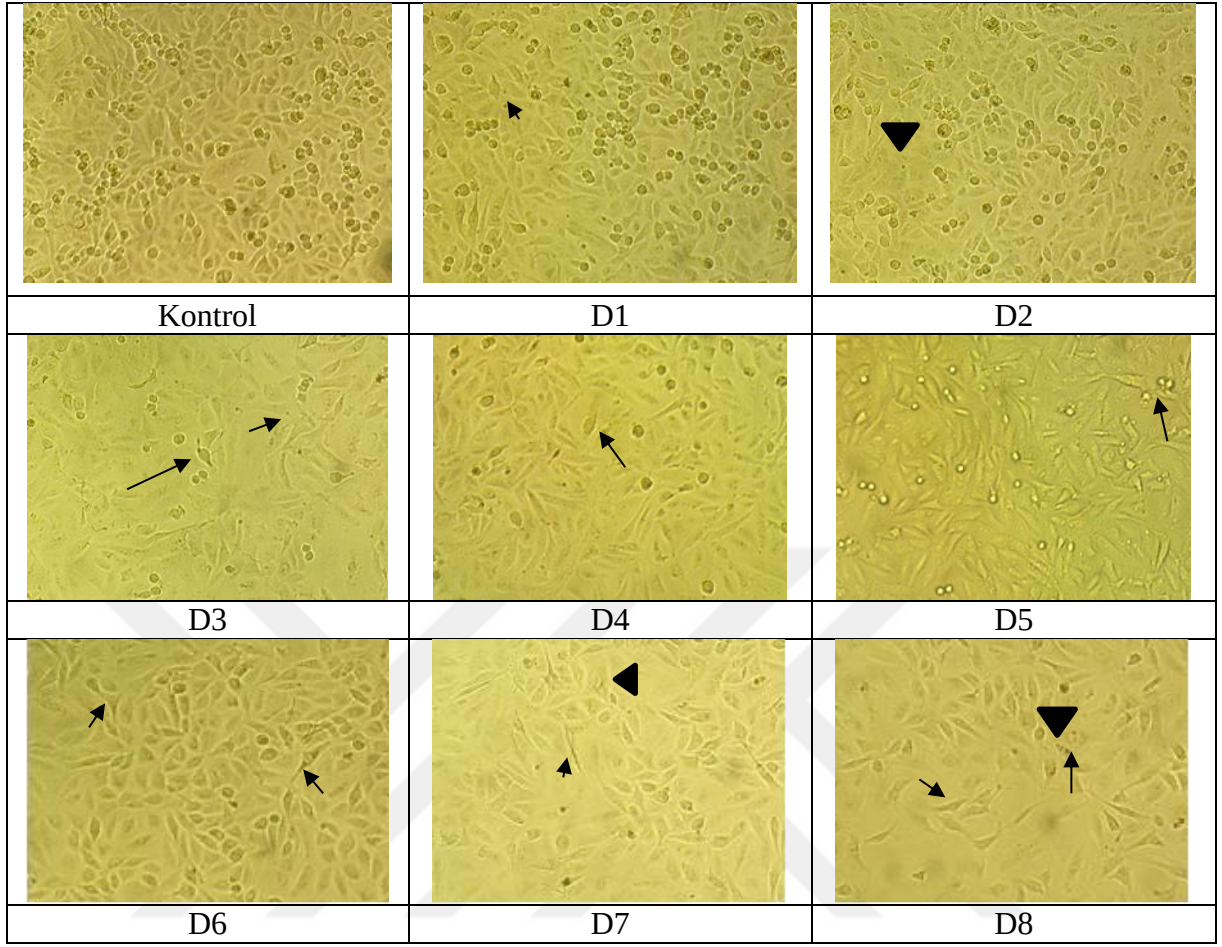
(→ : Hücre şeklinde bozulma; ► : Granül)



Şekil 4.38: BEAS-2B hücrelerinde Cisplatin'in çeşitli konsantrasyonlarının (D1: 5 μ M, D2: 10 μ M, D3: 20 μ M, D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) 72 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

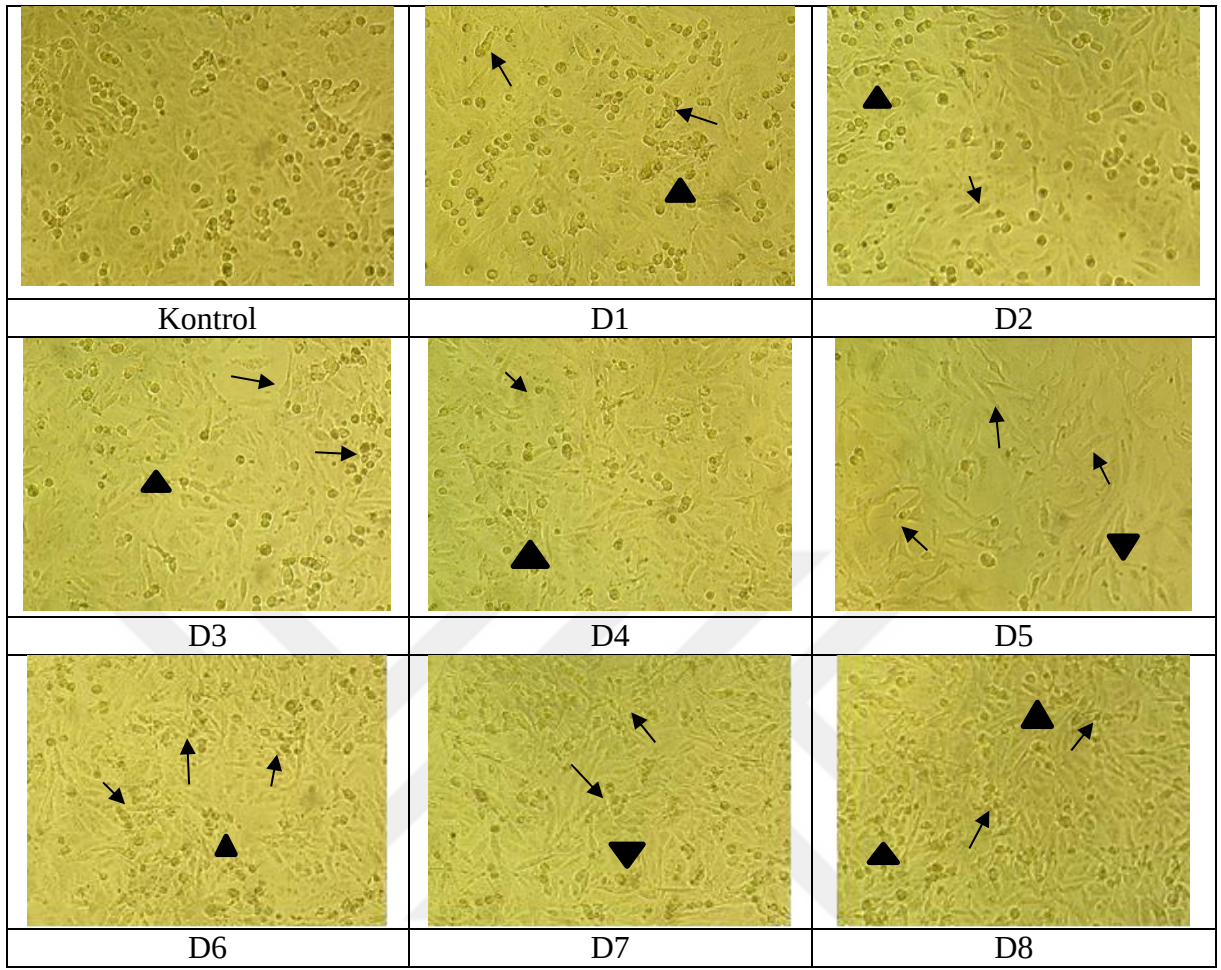
($\rightarrow$: Hücre şeklinde bozulma; $\blacktriangle$: Granül)

Farklı Pemetrex konsantrasyonları uygulanan (D1: 0,125 μ M, D2: 0,25 μ M, D3: 0,5 μ M, D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M, D7: 8 μ M, D8: 16 μ M) A549 hücrelerinde (Şekil 4.39-41), 24 ve 48 saat inkübasyona bırakılan deney gruplarının hücre morfolojilerinin kontrol grubuna göre fazla değişmediği gözlenirken, 72 saat süresince inkübasyona bırakılan deney grubunda, hücre morfolojilerinin değiştiği gözlemlenmiştir.



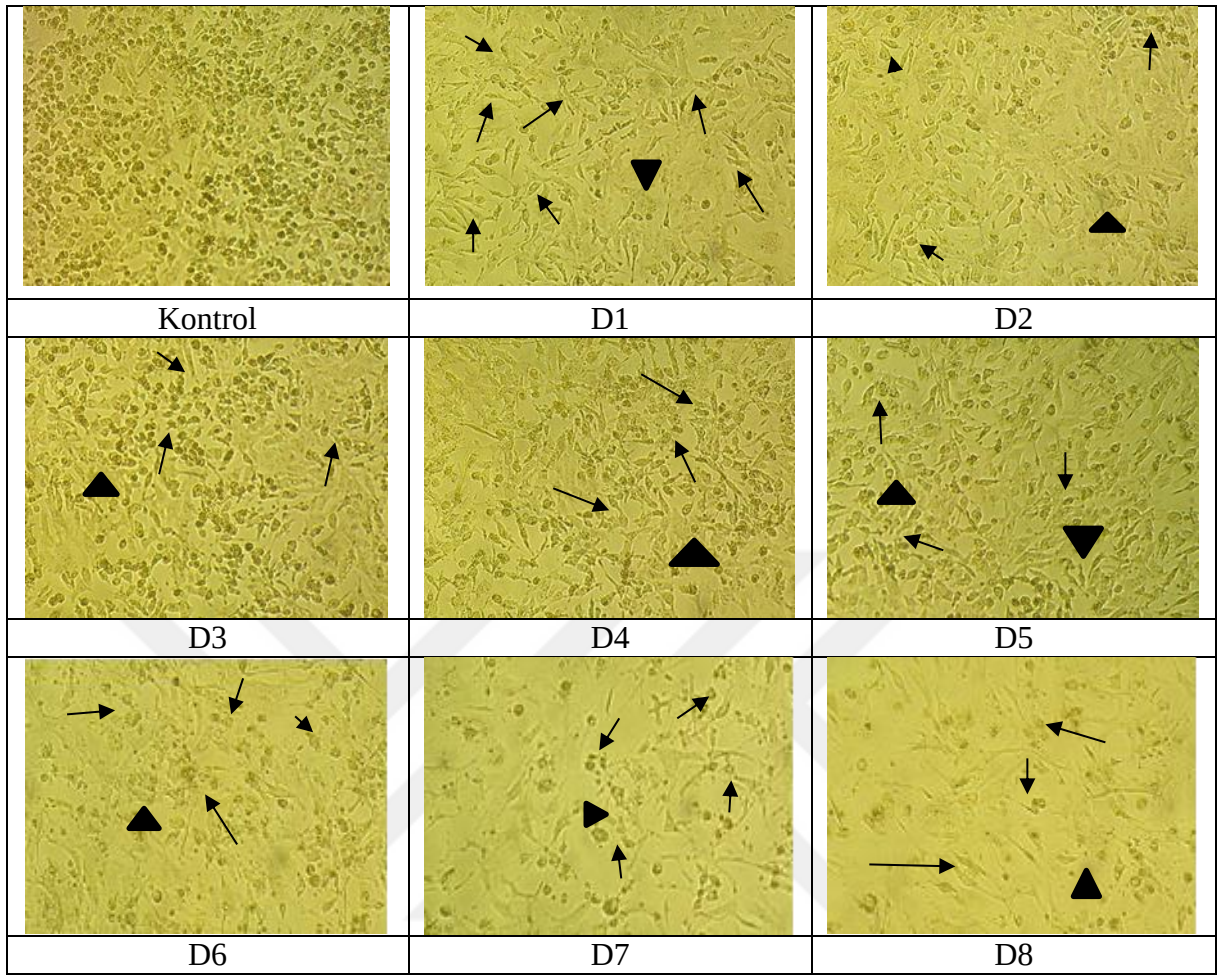
Şekil 4.39: A549 hücrelerinde Pentrex konsantrasyonlarının (D1: 0,125 μ M, D2: 0,25 μ M, D3: 0,5 μ M, D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M, D7: 8 μ M, D8: 16 μ M) 24 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

($\rightarrow$: Hücre şeklinde bozulma; $\blacktriangledown$: Granül)



Şekil 4.40: A549 hücrelerinde Pentrex konsantrasyonlarının (D1: 0,125 μ M, D2: 0,25 μ M, D3: 0,5 μ M, D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M, D7: 8 μ M, D8: 16 μ M) 48 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

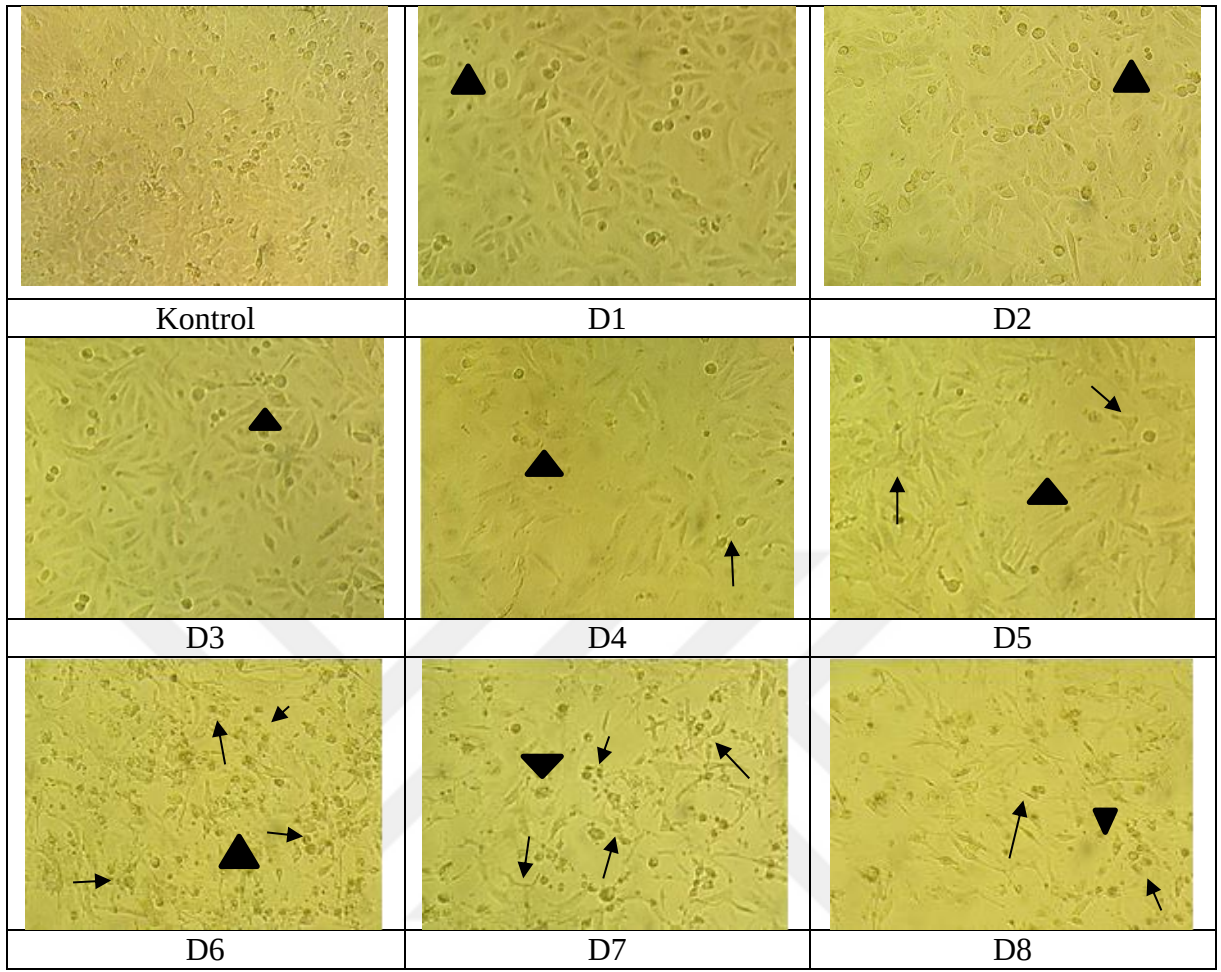
($\rightarrow$: Hücre şeklinde bozulma; $\blacktriangle$: Granül)



Şekil 4.41: A549 hücrelerinde Pentrex konsantrasyonlarının (D1: 0,125 μ M, D2: 0,25 μ M, D3: 0,5 μ M, D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M, D7: 8 μ M, D8: 16 μ M) 72 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

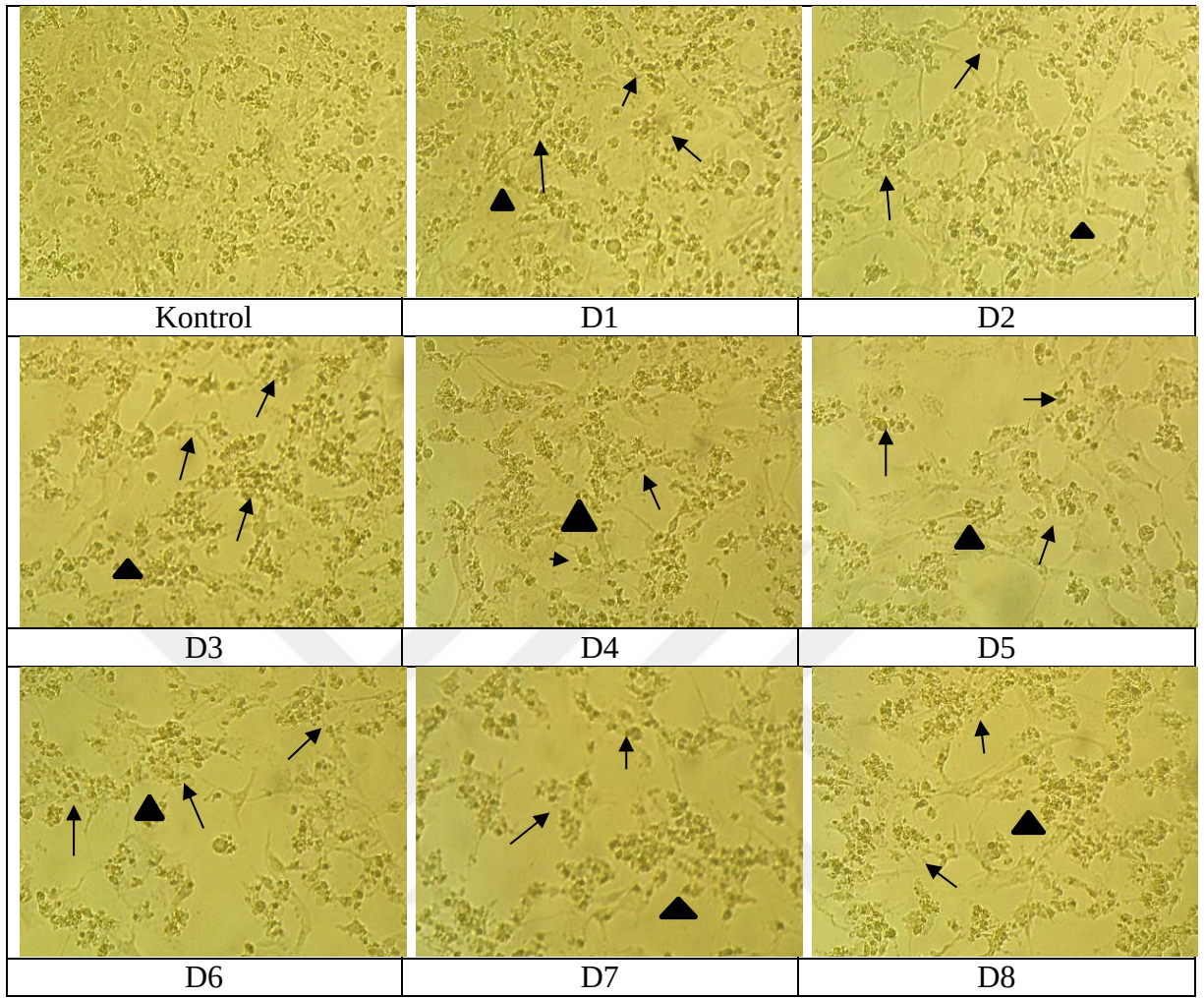
($\rightarrow$: Hücre şeklinde bozulma; $\blacktriangle$: Granül)

Farklı Pentrex konsantrasyonları (D1: 0,125 μ M, D2: 0,25 μ M, D3: 0,5 μ M, D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M, D7: 8 μ M, D8: 16 μ M) uygulanan BEAS-2B hücrelerinde (Şekil 4.42-44), konsantrasyon ve zamana bağlı olarak, hücre morfolojilerinin bozulduğu, hücrelerin büzüldüğü belirlenmiştir.



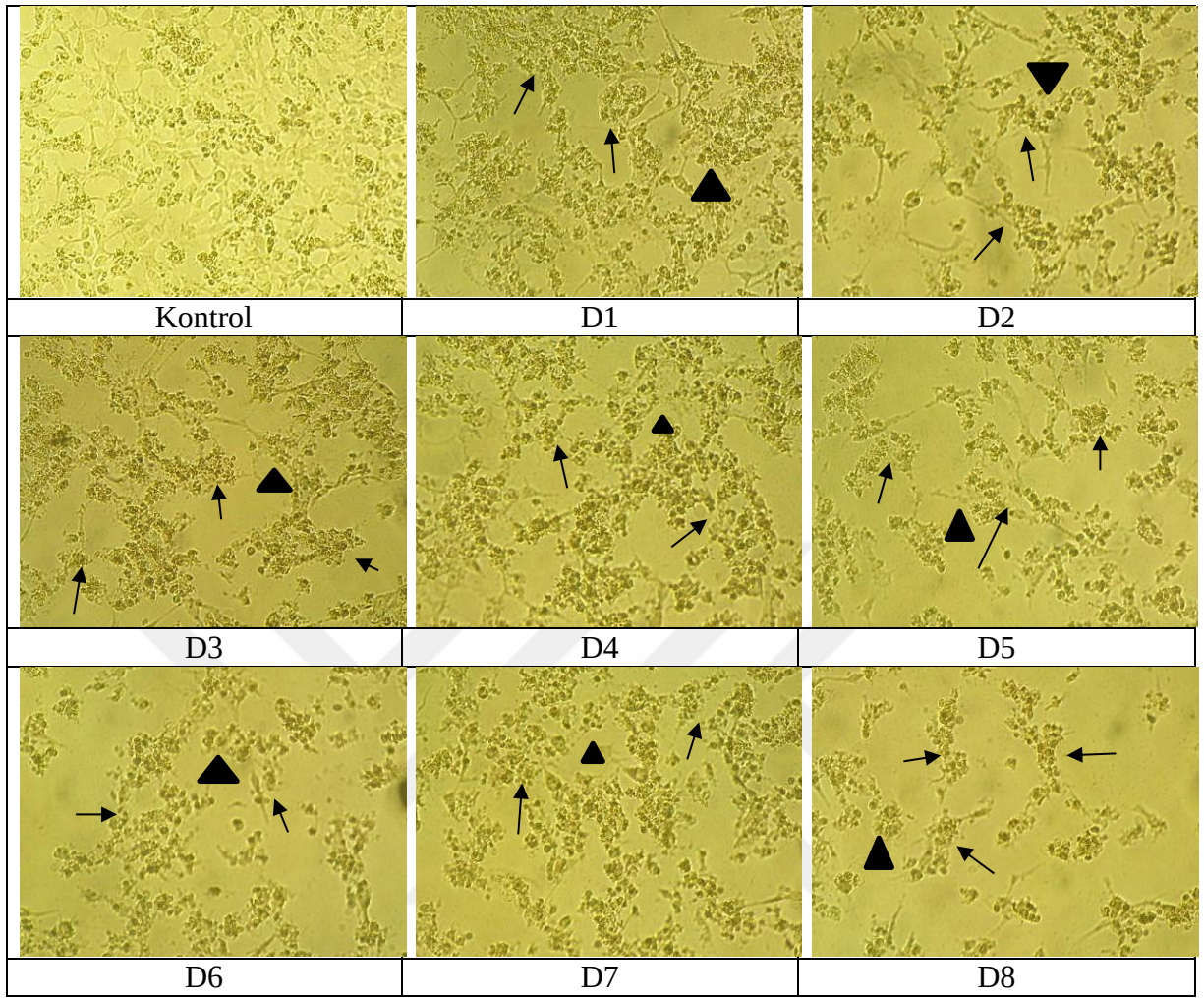
Şekil 4.42: BEAS-2B hücrelerinde Pentrex konsantrasyonlarının (D1: 0,125 μ M, D2: 0,25 μ M, D3: 0,5 μ M, D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M, D7: 8 μ M, D8: 16 μ M) 24 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

($\rightarrow$: Hücre şeklinde bozulma; $\blacktriangle$: Granül)



Şekil 4.43: BEAS-2B hücrelerinde Pentrex konsantrasyonlarının (D1: 0,125 μ M, D2: 0,25 μ M, D3: 0,5 μ M, D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M, D7: 8 μ M, D8: 16 μ M) 48 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

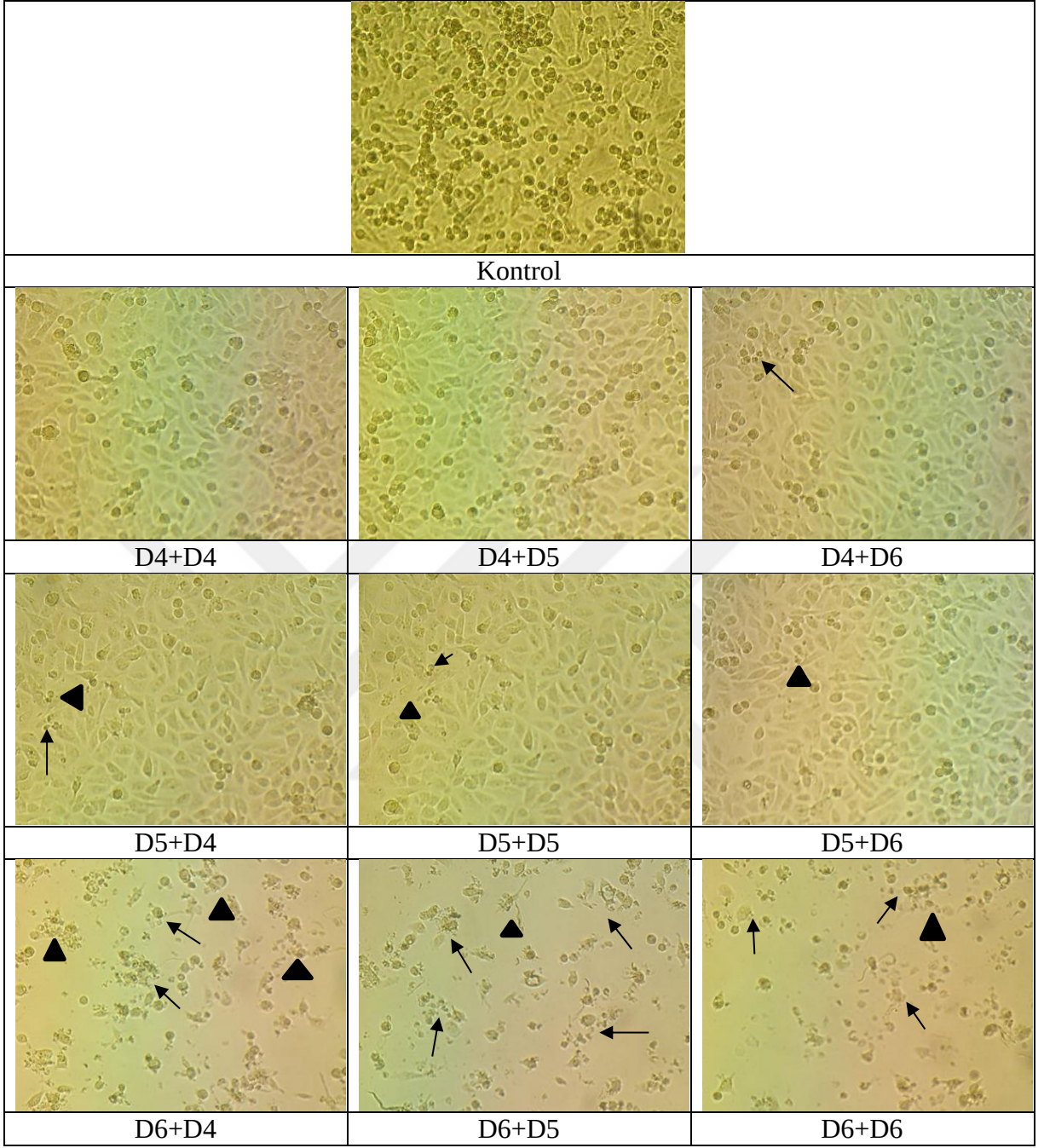
($\rightarrow$: Hücre şeklinde bozulma; $\blacktriangle$: Granül)



Şekil 4.44: BEAS-2B hücrelerinde Pemetrex konsantrasyonlarının (D1: 0,125 μ M, D2: 0,25 μ M, D3: 0,5 μ M, D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M, D7: 8 μ M, D8: 16 μ M) 72 saat sonunda faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

($\rightarrow$: Hücre şeklinde bozulma; $\blacktriangle$: Granül)

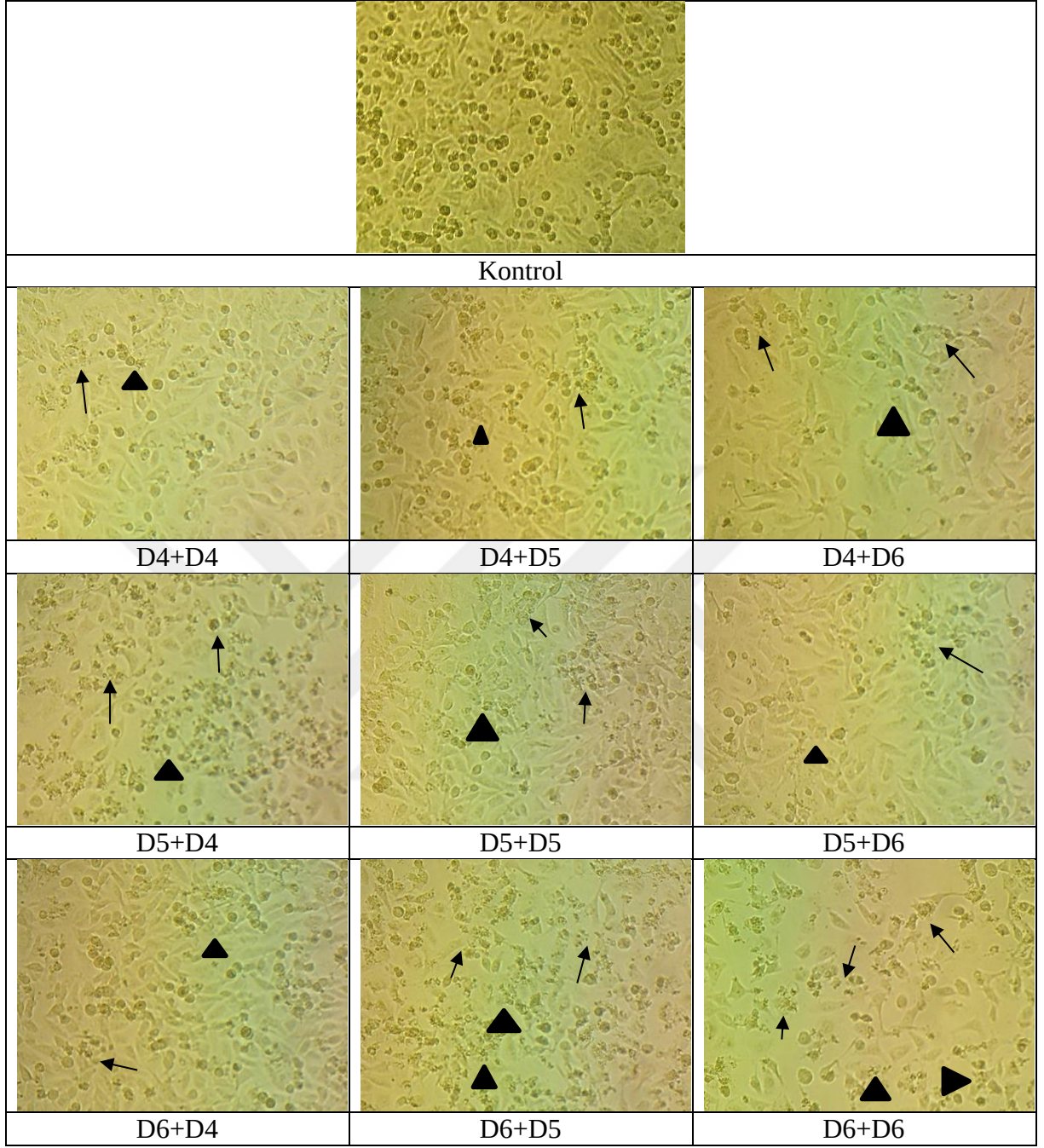
Önce Cisplatin (D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M), 24 saat sonra Pemetrex ilacının (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) uygulandığı A549 hücrelerinde (Şekil 4.45), D6 Cisplatin ilacının uygulandığı deney gruplarındaki hücre morfolojilerinin büzülerek bozulduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 4.45: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonlarının (Cisplatin D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M; Pemetrex D4:1 μ M, D5:2 μ M, D6:4 μ M) faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

($\rightarrow$: Hücre şeklinde bozulma; $\blacktriangle$: Granül)

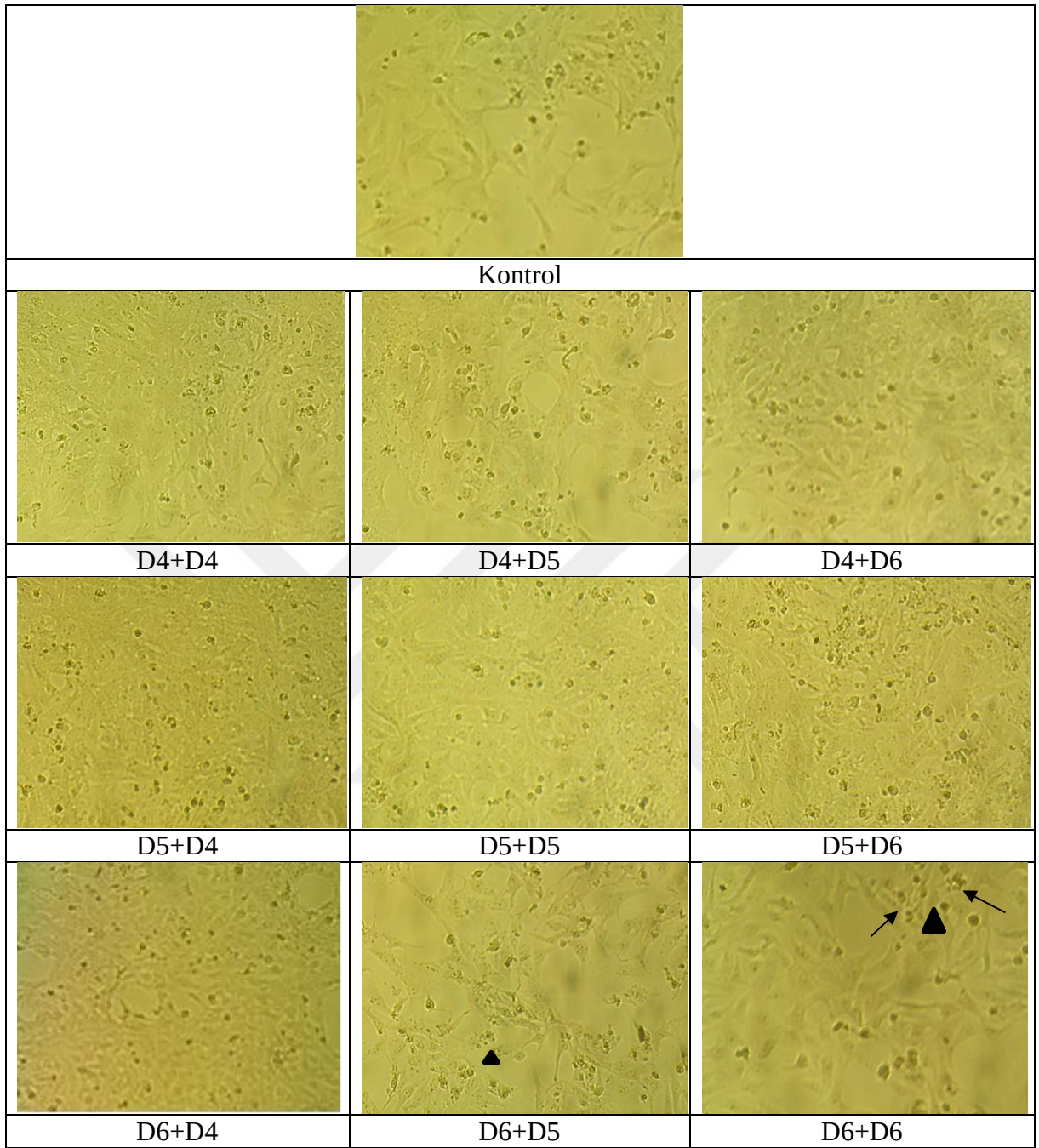
Önce Pemetrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M), 24 saat sonra Cisplatin ilacının (D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) uygulandığı A549 hücrelerinde (Şekil 4.46), konsantrasyona bağlı olarak hücre sitoplazmasında granüllenme belirlenmiştir. Hücre morfolojilerinin kontrol grubuna kıyasla bozulduğu görülmüştür.



Şekil 4.46: A549 hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pemetrex ve Cisplatin konsantrasyonlarının (Pemetrex D4:1 μ M, D5:2 μ M, D6:4 μ M; Cisplatin D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

($\rightarrow$: Hücre şeklinde bozulma; $\blacktriangle$: Granül)

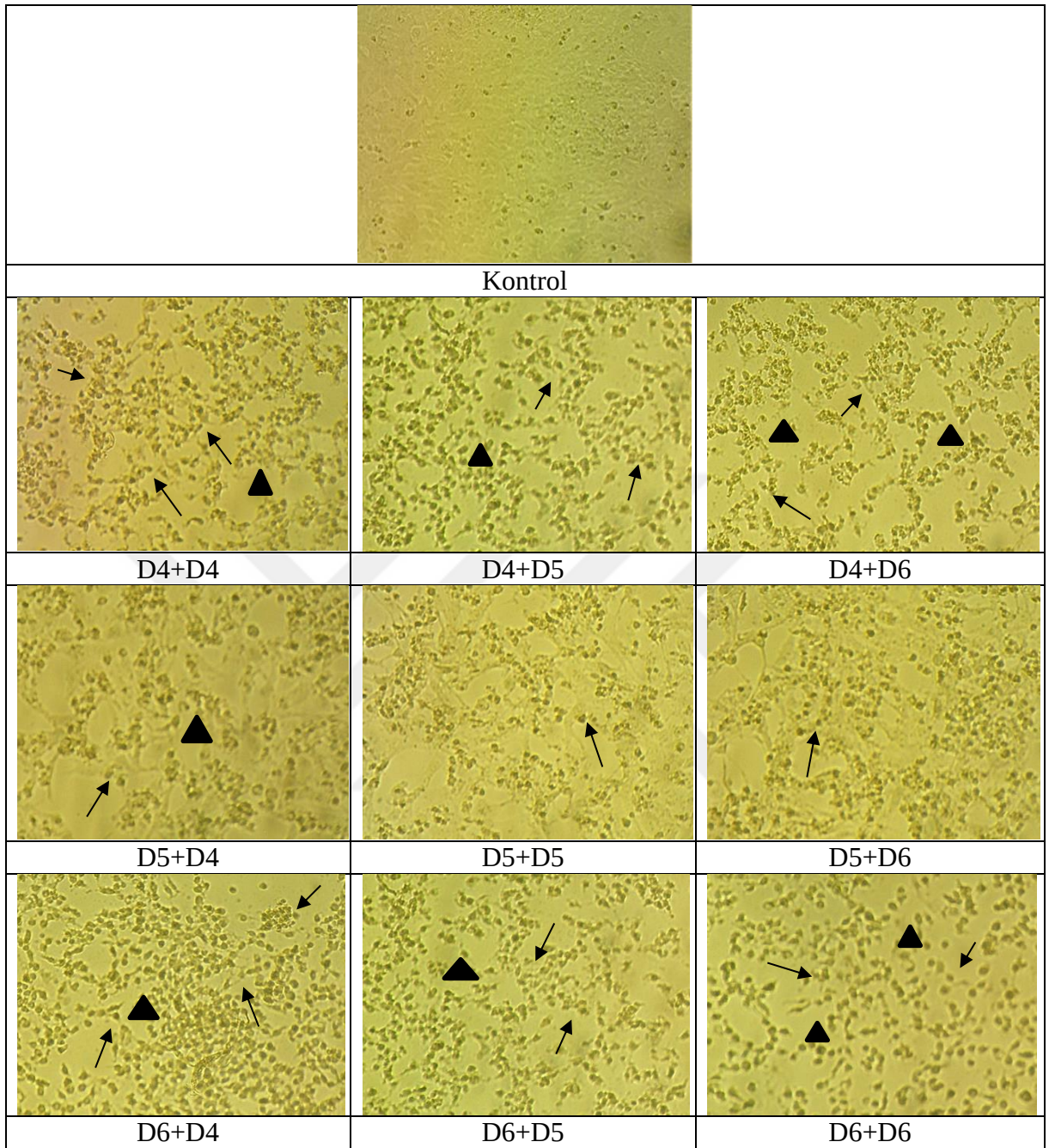
Önce Cisplatin(D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M), 24 saat sonra Pemetrex ilacının (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M) uygulandığı BEAS-2B hücrelerinde (Şekil 4.47), sadece D6 Cisplatin ilacının uygulandığı deney gruplarına ait hücrelerin sitoplazmalarının granüllendiği belirlenmiştir.



Şekil 4.47: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonlarının (Cisplatin D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M; Pemetrex D4:1 μ M, D5:2 μ M, D6:4 μ M) faz kontrast mikroskobu görüntüleri (10x25).

($\rightarrow$: Hücre şeklinde bozulma; $\blacktriangle$: Granül)

Önce Pemetrex (D4: 1 μ M, D5: 2 μ M, D6: 4 μ M), 24 saat sonra Cisplatin ilaçlarının (D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) uygulandığı BEAS-2B hücrelerinde (Şekil 4.48), D4 ve D6 deney gruplarının hücre morfolojilerinde bozulma ve granüllerlenme belirlenmiştir.



Şekil 4.48: BEAS-2B hücrelerine 24 saat ara ile uygulanan Pemetrex ve Cisplatin konsantrasyonlarının (Pemetrex D4:1 μ M, D5:2 μ M, D6:4 μ M; Cisplatin D4: 40 μ M, D5: 80 μ M, D6: 160 μ M) faz kontrast mikroskopu görüntüleri (10x25).

($\rightarrow$: Hücre şeklinde bozulma; $\blacktriangle$: Granül)

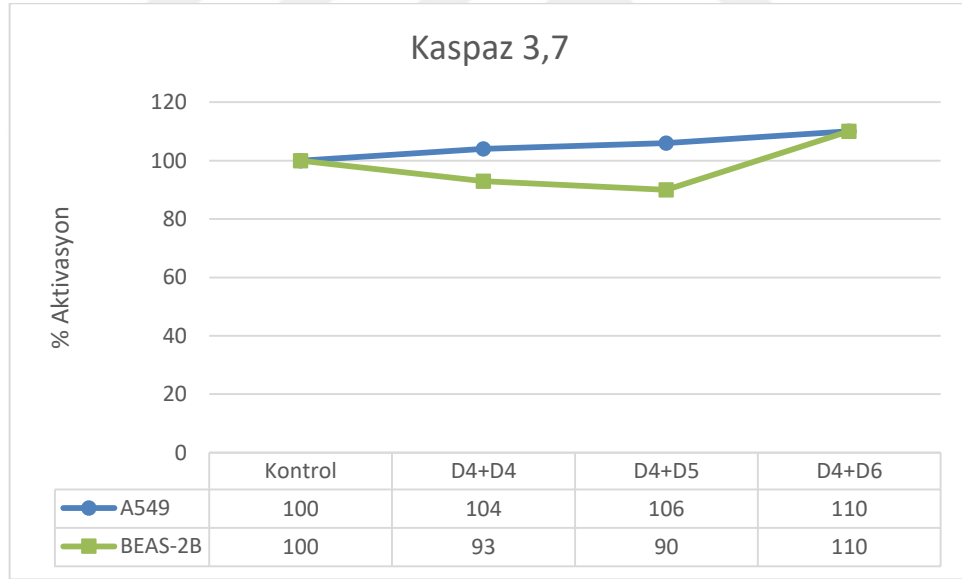
4.3. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

4.3.1. Kaspaz Aktivasyon Analizi

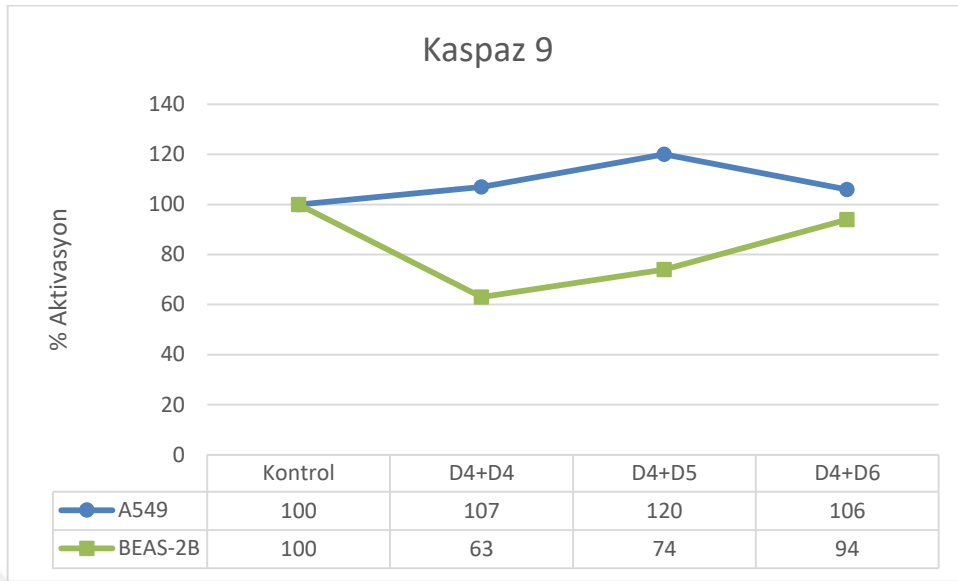
Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının farklı konsantrasyonlarının A549 ve BEAS-2B hücrelerine uygulanması sonucunda elde edilen sitotoksisite sonuçları göz önünde bulundurularak, kanserli

hücre soylarına en fazla sitotoksik aktiviteye neden olurken, normal hücre soyları üzerinde sitotoksik aktivite göstermeyen önce Cisplatin 24 saat sonra Pemetrex uygulanan deney gruplarının Kaspaz 3,7 ve 9 analizleri yapılmıştır. Kontrol grubu %100 kabul edilerek, deney gruplarının Kaspaz 3,7 ve 9 aktivasyon değerleri kontrol grubuna oranlanmıştır.

A549 ve BEAS-2B hücrelerine D4 (40 μ M) Cisplatin konsantrasyonu uygulandıktan 24 saat sonra D4 (1 μ M) D5 (2 μ M) ve D6 (4 μ M) Pemetrex konsantrasyonlarının uygulanması sonucunda Kaspaz 3,7 aktivasyonunda meydana gelen değişim Şekil 4.49'da, Kaspaz 9 aktivasyonunda meydana gelen değişim Şekil 4.50'de gösterilmiştir. A549 hücrelerinde konsantrasyonun artmasıyla doğru orantılı olarak Kaspaz 3,7 aktivasyonunun arttığı gözlemlenirken, BEAS-2B hücrelerinde D4+D4 ve D4+D5 konsantrasyonlarında kontrole göre azalış, D4+D6 konsantrasyonunda ise kontrole göre artış meydana geldiği saptanmıştır. A549 hücrelerinde Kaspaz 9 aktivitesinin kontrole göre arttığı belirlenirken, BEAS-2B hücrelerinde kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir.

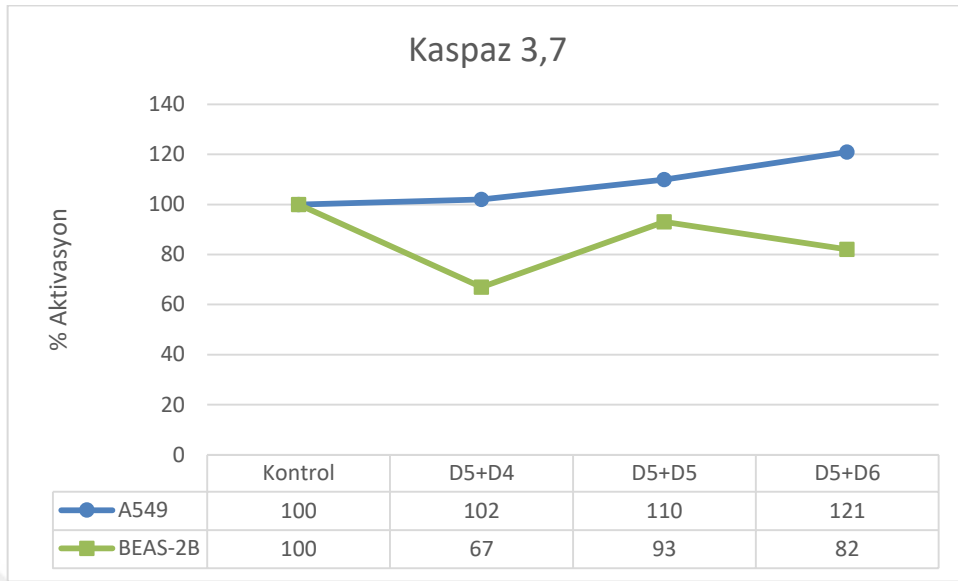


Şekil 4.49: 24 saat ara ile Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonları uygulanan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz 3,7 aktivasyonu (Cisplatin D4: 40 μ M; Pemetrex D4:1 μ M, D5:2 μ M, D6:4 μ M).

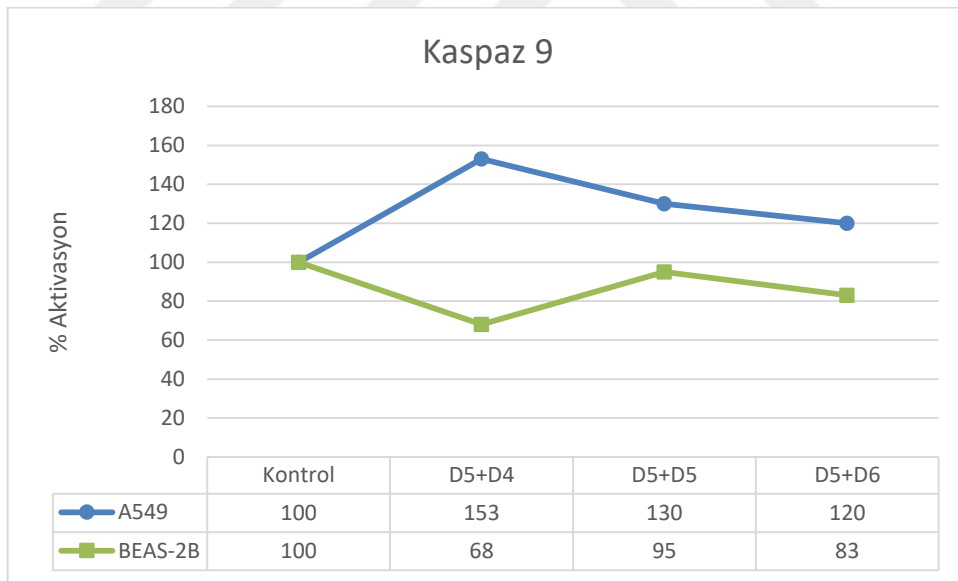


Şekil 4.50: 24 saat ara ile Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonları uygulanan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz 9 aktivasyonu (Cisplatin D4: 40 μ M; Pemetrex D4:1 μ M, D5:2 μ M, D6:4 μ M).

A549 ve BEAS-2B hücrelerine D5 Cisplatin konsantrasyonu uygulandıktan 24 saat sonra D4, D5 ve D6 Pemetrex konsantrasyonlarının uygulanması sonucunda Kaspaz 3,7 aktivasyonunda meydana gelen değişim Şekil 4.51’de, Kaspaz 9 aktivasyonunda meydana gelen değişim Şekil 4.52’de gösterilmiştir. A549 hücrelerinde Kaspaz 3,7 aktivitesinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlemlenirken, BEAS-2B hücrelerinde kontrole göre azaldığı saptanmıştır. A549 hücrelerinde Kaspaz 9 aktivitesinin kontrole göre artış gösterdiği saptanmıştır. BEAS-2B hücrelerinde ise Kaspaz 9 aktivitesinin kontrole göre azaldığı saptanmıştır.



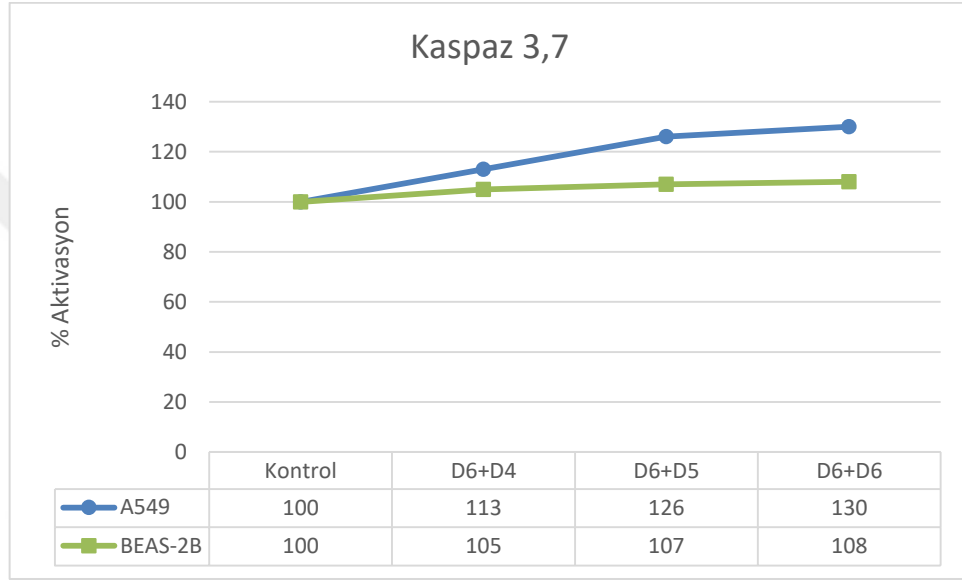
Şekil 4.51: 24 saat ara ile Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonları uygulanan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz 3,7 aktivasyonu (Cisplatin D5: 80 μ M; Pemetrex D4:1 μ M, D5:2 μ M, D6:4 μ M).



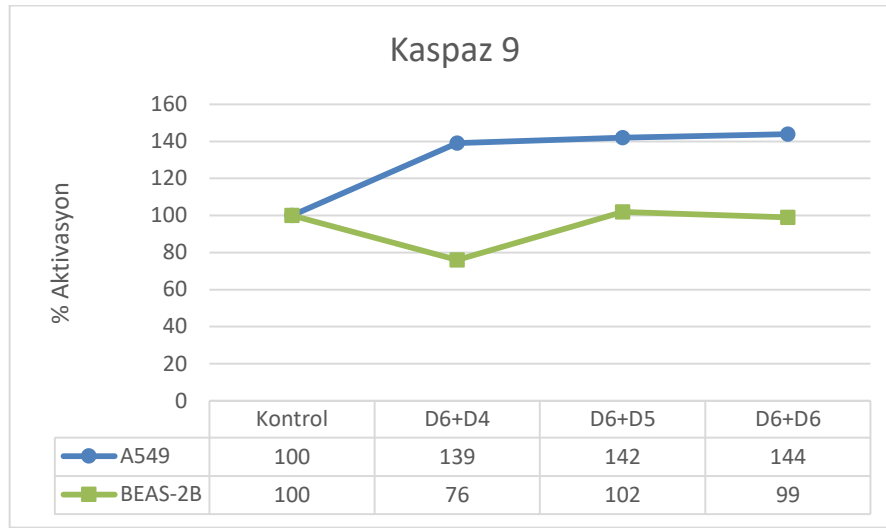
Şekil 4.52: 24 saat ara ile Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonları uygulanan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz 9 aktivasyonu (Cisplatin D5: 80 μ M; Pemetrex D4:1 μ M, D5:2 μ M, D6:4 μ M).

A549 ve BEAS-2B hücrelerine D6 Cisplatin konsantrasyonu uygulandıktan 24 saat sonra D4, D5 ve D6 Pemetrex konsantrasyonlarının uygulanması sonucunda Kaspaz 3,7 aktivasyonunda

meydana gelen değişim Şekil 4.53'te, Kaspaz 9 aktivasyonunda meydana gelen değişim Şekil 4.54'de gösterilmiştir. A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz 3,7 aktivitesinin konsantrasyona bağlı olarak arttığı bulunmuştur. Kaspaz 9 aktivitesinin A549 hücrelerinde konsantrasyona göre arttığı, BEAS-2B hücrelerinde D6+D4 ve D6+D6 gruplarında azaldığı, D6+D5 grubunda ise arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.53: 24 saat ara ile Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonları uygulanan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz 3,7 aktivasyonu (Cisplatin D6: 160 μ M; Pemetrex D4:1 μ M, D5:2 μ M, D6:4 μ M).



Şekil 4.54: 24 saat ara ile Cisplatin ve Pemetrex konsantrasyonları uygulanan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz 9 aktivasyonu (Cisplatin D6: 160 μ M; Pemetrex D4:1 μ M, D5:2 μ M, D6:4 μ M).

Kaspaz 3,7 ve Kaspaz 9 aktivasyon analizleri sonucunda, A549 hücrelerinde kaspaz 3,7 ve 9 aktivitesinin tüm deney gruplarında kontrole göre arttığı, BEAS-2B hücrelerinde D4 ve D5 Cisplatin konsantrasyonlarının sabit tutularak 24 saat ara ile D4, D5 ve D6 Pemetrex konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda kaspaz 3,7 ve 9 aktivitelerinin azaldığı, D6 Cisplatin konsantrasyonunu takiben D4, D5 ve D6 Pemetrex konsantrasyonunun uygulandığı deney gruplarında Kaspaz 3,7 artış gösterirken, Kaspaz 9 aktivitesinin D6+D4 ve D6+D6 deney gruplarında azaldığı belirlenmiştir.

4.4. MOLEKÜLER DEĞERLENDİRME

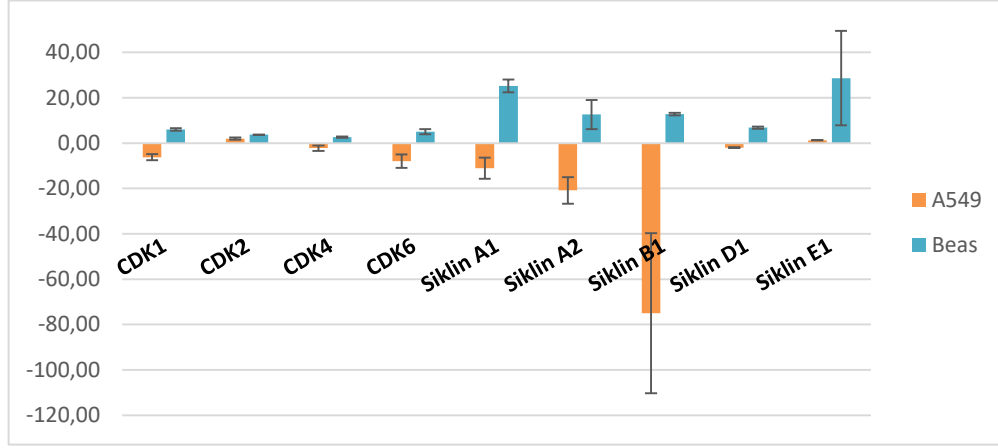
4.4.1. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Analizi

A549 hücreleri ve BEAS-2B hücrelerine ait kontrol ve önce D6 (160 μ M) Cisplatin 24 saat sonra D4 (1 μ M) Pemetrex konsantrasyonu uygulanan deney gruplarında hücre siklusunda görev yapan genlerin analizleri yapılmıştır. Bu bağlamda, hücre siklusu ile ilişkili 23 adet genin ekspresyon seviyelerine bakılmıştır. Anlatım seviyelerindeki değişimler FC analizi yapılarak, anlatım seviyelerindeki değişimler Tablo 4.7’de verilmiştir. FC’deki ≥ 1.5 kat değişimler, ilgili genler için yukarı regüle ve aşağı regüle olarak değerlendirilmiştir.

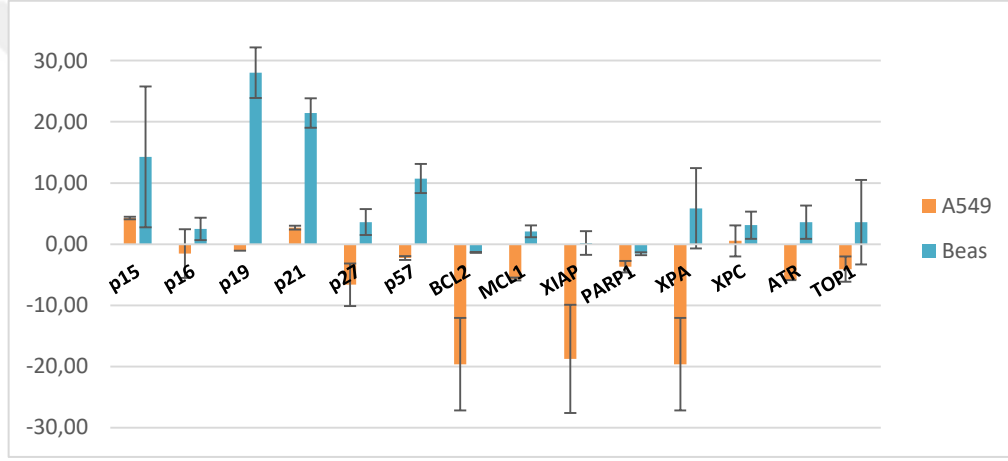
Tablo 4.7: A549 ve BEAS-2B hücreleri gen anlatımında katlı değişim.

Genler	A549 hücrelerine ait deney grubunun gen anlatımındaki katlı değişim	BEAS-2B hücrelerine ait deney grubunun gen anlatımındaki katlı değişim
CDK 1	-6.2	6.1
CDK 2	1.99	3.7
CDK 4	-2.2	2.7
CDK 6	-7.94	5.1
Siklin A1	-10.99	25.2
Siklin A2	-20.83	12.6
Siklin B1	-75	12.8
Siklin D1	-1.98	6.9
Siklin E1	1.26	28.7
p15	4.27	14.3
p16	-1.53	2.5
p19	-1.07	28
p21	2.7	21.4
p27	-6.63	3.6
p57	-2.27	10.7
Bcl-2	-19.64	-1.4
Mcl-1	-5.72	2.1
XIAP	-18.75	0.2
PARP1	-3.69	-1.6
XPA	-19.64	5.9
XPC	0.54	3.1
ATR	-5.88	3.6
TOP1	-4.09	3.6

Tüm genlere ait katlı değişimler grafiği Şekil 4.55'te verilmiştir. FC analizleri sonucunda, A549 hücrelerinde, siklin bağımlı kinaz ve siklin bağımlı kinaz inhibitör genlerinden, 3 genin anlatımının kontrol grubuna göre yukarı regüle olduğu, siklin, siklin bağımlı kinaz, siklin bağımlı kinaz inhibitörü ve DNA hasar tanıma ve tamir genlerinden, 17 genin aşağı regüle olduğu belirlenmiştir. BEAS-2B hücrelerinde ise, siklin, siklin bağımlı kinaz, siklin bağımlı kinaz inhibitörü ve DNA hasar tanıma ve tamir genlerinden 20 genin yukarı regüle olduğu, DNA hasar tanıma ve tamir genlerinden 1 genin aşağı regüle olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.55: Siklin ve siklin bağımlı kinaz genlerinin ifadesinde meydana gelen değişimler.

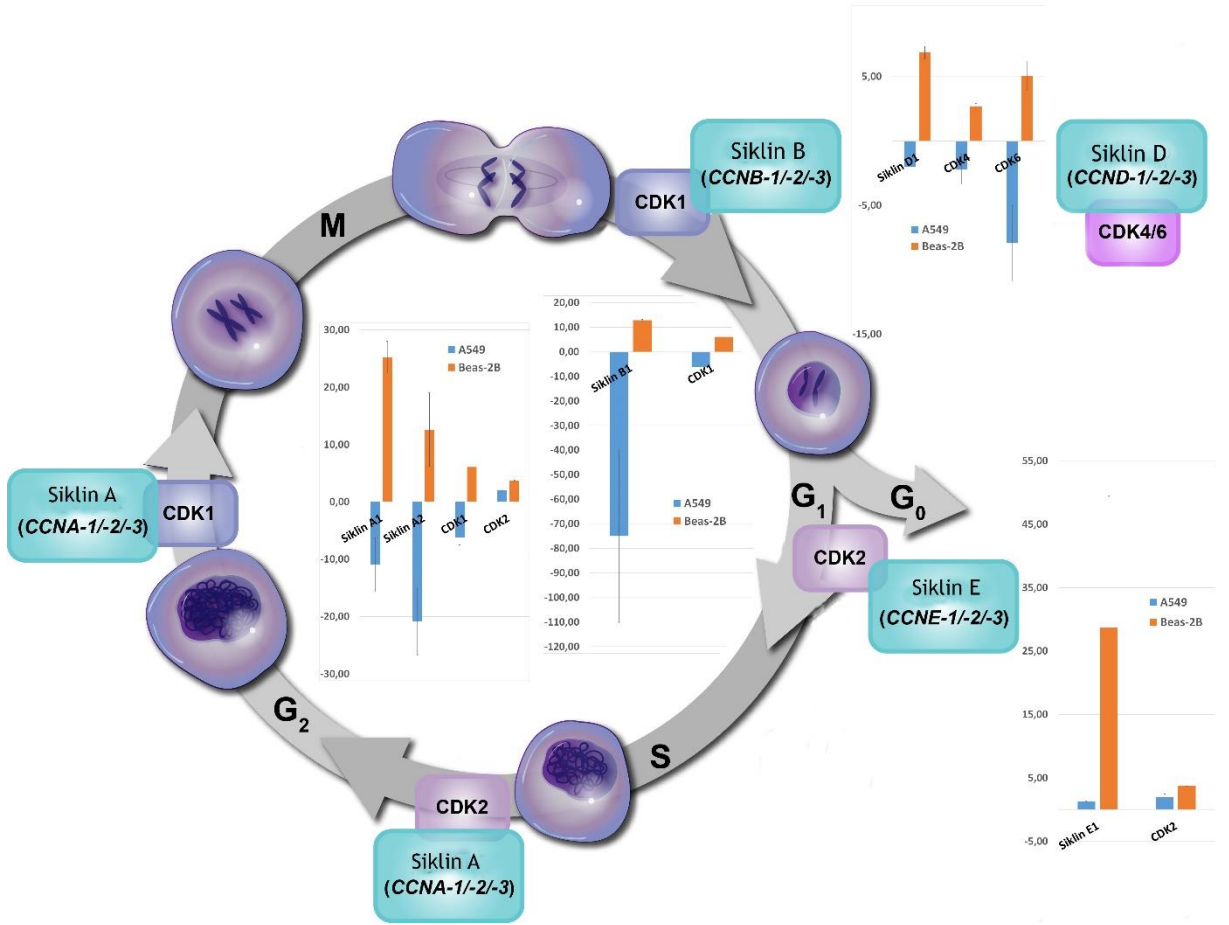


Şekil 4.56: CDKI, antiapoptotik ve DNA hasar tanıma ve tamir genlerinin ifadesinde meydana gelen değişimler.

Deney sonucuna göre, A549 hücrelerinde *Siklin A1*, *Siklin A2*, *Siklin B1*, *Siklin D1*, *CDK1*, *CDK4*, *CDK6*, *p16*, *p27*, *p57*, *Bcl-2*, *Mcl-1*, *XIAP*, *PARP 1*, *XPA*, *ATR*, *TOP1* genlerinin anlatım seviyelerinin kontrol grubuna göre aşağı regüle olduğu belirlenmiştir ($FC \geq |1.5|$). *CDK2*, *p15* ve *p21* genlerinde ise kontrol grubuna göre anlatım seviyesinin 1.5 kat arttığı saptanmıştır. *Siklin E2*, *p19* ve *XPC* genlerinin anlatım seviyelerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır ($FC \leq |1.5|$).

BEAS-2B hücrelerinde, *Siklin A1*, *Siklin A2*, *Siklin B1*, *Siklin D*, *Siklin E1*, *p15*, *p16*, *p19*, *p21*, *p27*, *p57*, *CDK1*, *CDK2*, *CDK4*, *CDK6*, *Mcl-1*, *XPA*, *XPC*, *ATR*, ve *TOP1* genlerinde anlamlı bir artış ($FC \geq |1.5|$) bulunmuştur. *PARP 1* geninin anlatım seviyesinde ise anlamlı bir azalış gözlemlenmiştir ($FC \geq |1.5|$). *Bcl-2* ve *XIAP* genlerinin anlatım seviyelerinde ise kontrol grubuna göre anlamlı bir fark bulunmamıştır ($FC \leq |1.5|$).

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde A549 hücrelerine ait deney gruplarında hücre siklusunda yer alan siklin ve siklin bağımlı kinaz genlerinin anlatımlarının aşağı regüle oldukları, BEAS-2B hücrelerinde ise yukarı regüle olduğu gösterilmiştir (Şekil 4.57). A549 grubunda DNA tamir genlerinin aşağı regüle olduğu belirlenirken, BEAS-2B grubunda DNA tamir genlerinin arttığı belirlenmiştir. A549 hücrelerinde antiapoptotik genlerden olan *Bcl-2* ve *Mcl-1* genlerinin anlatımını aşağı regüle, BEAS-2B hücrelerinde ise *Bcl-2* gen anlatımındaki katlı değişim kontrole göre anlamsızken ($FC \leq |1.5|$), *Mcl-1* geninin yukarı regüle olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.57: Siklin ve siklin bağımlı kinaz gen anlatımlarının hücre siklusundaki gösterimi.

Tez çalışmamız sonunda, Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının A549 ve BEAS-2B hücrelerine ayrı ayrı ve 24 saat ara ile uygulanması sonucunda, hücrelerde meydana gelen sitotoksikite belirlenmiştir. Önce Cisplatin, 24 saat sonra Pemetrex uygulamasının kanser hücre soyu olan A549 hücrelerine üzerinde, normal hücre soyu olan BEAS-2B hücre soyuna göre daha toksik

etkisinin olduğu belirlenmiştir. nce Cisplatin, 24 saat sonra Pemetrex uygulanan deney gruplarında yapılan Kaspaz 3,7 ve 9 aktivasyon analizi sonucunda, A549 hücrelerinin Kaspaz 3,7 ve 9 aktivasyonlarının BEAS-2B hücrelerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hücre siklusunda yer alan gen anlatımlarının incelenmesi sonucunda, A549 hücrelerinde hücre siklusunda yer alan genlerin, antiapoptotik genlerin ve DNA hasar tanıma ve tamir genlerinin aşağı regüle, BEAS-2B hücrelerinde ise yukarı regüle olduğu belirlenmiştir.



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, kanser kemoterapisinde oldukça sık olarak kullanılan Cisplatin ve akciğer kanserinde kullanılan antifolat türevi olan Pemetrex'in, hücre siklusunda yer alan genlerin anlatımlarına olan etkilerinin araştırılarak, kanser ve normal hücre soyları arasındaki farkın ortaya konması amaçlanmıştır. Bu bağlamda, ilk önce akciğer kanser hücre soyu A549 ve akciğer normal hücre soyu BEAS-2B hücrelerinde, Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının ayrı ayrı ve birbiri ardına uygulanarak, hücrelerde meydana gelen toksik etki MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hücrelerin morfolojilerinde meydana gelen değişiklikler faz kontrast mikroskobu ile gösterilmiştir. Hücrelerin Kaspaz 3,7 ve 9 aktivasyon analizleri florometrik yöntem kullanılarak tespit edilmiştir. Kanser ve normal hücrelerin, hücre siklusu genlerinin anlatım seviyelerindeki değişimler, qRT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

Hücre siklusu, bir takım makromoleküler olayları kapsayan hücre bölünmesini ve bunun sonucu olarak, birbirinin aynısı olan iki yeni hücrenin oluşması olarak tanımlanmaktadır (Canpolat, 2016). Hücre siklusu sırasında, hücrenin siklus fazlarında düzenli olarak ilerlemesini sağlayan, kontrol noktaları adı verilen ve hücrenin siklusa devam edip etmeyeceğine karar veren siklinler, siklin bağımlı kinazlar, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri gibi çeşitli düzenleyiciler bulunmaktadır (Vermeulen ve diğ., 2003). Bu düzenleyicilerde meydana gelen hasarlar kontrolsüz hücre bölünmesine yol açarak, kanser gelişimine neden olmaktadır.

Kemoterapi, kimyasal maddelerin kullanıldığı bir kanser tedavisi yöntemidir. Bu kimyasal maddeler; alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, antitümör antibiyotikleri, topoizomerez inhibitörleri, mitotik inhibitörler, kortikosteroidler ve proteozom inhibitörleri olabilmektedir (Temel, 2015).

Cisplatin, platin temelli, alkilleyici ajanlar sınıfına giren bir kemoterapi ilacıdır. World Health Organization (WHO) tarafından 2016-2018 "Gerekli İlaçlar Listesi"nde yer almaktadır. Cisplatin birçok kanserin tedavisinde tek başına ya da başka ilaçlarla birlikte kombine olarak kullanılabilir. Cisplatin hücrelerde asıl etkisini, DNA'ya bağlanarak zincir içi çapraz bağlara ve DNA eklentilerine neden olmakta, bunun sonucu olarak, DNA replikasyonunu ve transkripsiyonunu engelleyerek gerçekleştirmektedir (Yen ve diğ., 2005).

Pemtrex, antimetabolit olarak sınıflandırılan bir kemoterapi ilacıdır. Antimetabolitler, hücre içindeki normal içerikle benzerlik göstermektedir ve hücre siklusunda özelleşmiş bir evredeki hücrelere saldırmaktadırlar. Pemtrex, kimyasal olarak folik asit ile benzeşmektedir. Pemtrex hücre içindeki etkisini, timidilat sentaz, glisinamid ribonükleotid formiltransferaz ve dihidrofolat redüktaz gibi pürinlerin sentezinde rol oynayan enzimleri inhibe ederek göstermektedir (Adjei, 2004).

Akciğer kanseri, ülkemizde ve dünyada kanserden kaynaklanan ölümlerde üst sıralarda yer almaktadır. Bunun sonucu olarak, akciğer kanserinin tedavisi oldukça önem kazanmıştır. Akciğer kanseri dahil olmak üzere birçok kanserin tedavisinde kullanılan Cisplatin ve akciğer kanserinin türlerinde kullanılmakta olan Pemtrex ilaçlarının, kanser ve normal hücre soyları üzerinde hücre siklusuna etkisinin incelenmesi, yeni molekül hedeflerinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır.

Çalışmamızda, öncelikle tek başlarına Cisplatin ve Pemtrex'in farklı konsantrasyonları A549 ve BEAS-2B hücrelerine uygulanarak, hücrelerde meydana gelen toksik etki MTT yöntemi ile belirlenmiştir. İki ilacın da 24 saatte A549 hücreleri üzerindeki en etkili konsantrasyonu belirlenerek, 24 saat ara ile uygulandığında hücreler üzerinde meydana gelen etki tespit edilmiştir. Cisplatin uygulamasını takiben 24 saat sonra Pemtrex ilacı uygulandığında normal hücre soyunda oluşan toksisitenin, kanser hücre soyunda oluşan toksisiteden daha az olduğu belirlenmiştir.

Plaimee ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada, cisplatin ilacının 10, 25, 50, 100 ve 200 μM konsantrasyonlarını uyguladıkları SK-LU-1 hücrelerinde, konsantrasyona bağlı olarak hücrelerde meydana gelen sitotoksitenin arttığı bildirilmiştir.

Lee ve diğ. (2016) malignant mezoteliyom hücrelerine 150 μM , 300 μM , 450 μM ve 600 μM cisplatin uygulanması sonucunda, hücrelerin sağ kalım yüzdesinin düştüğünü göstermişlerdir. 40 μM cisplatin uygulanması sonucunda, MSTO-211H hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatte anlamlı olarak azaldığını ancak H2452 ve MeT-5A hücrelerindeki azalışın anlamlı olmadığını bildirmişlerdir.

Ko ve diğ. (2016) yaptıkları çalışmada, cisplatin uyguladıkları A549 ve H1703 hücrelerindeki sağ kalım oranının, konsantrasyona bağlı olarak her iki hücre soyunda da azaldığını rapor etmişlerdir.

Cong ve diğ. (2016) cisplatin ile yaptığı bir çalışmada HeLa hücrelerinde 24, 48 ve 72 saat sonunda IC₅₀ konsantrasyonunda azalma tespit ederek, A549 hücrelerinde 24 ve 48 saat aralarında ciddi bir fark belirlemiş ve 72. saatte bunlara oranla daha az bir azalma olduğunu bildirmiştir.

Clémence ve diğ. (2017) yaptıkları bir çalışmada, SUM1315 ve MDA-MB-231 hücrelerinin 2D ve 3D kültürlerinde Cisplatin konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak, hücre sağkalımı oranlarında düşüş saptanmıştır. Sferoid diametrelerinin konsantrasyona bağlı olarak küçüldüğü gözlemlenmiştir.

Sawant ve diğ. (2017) tarafından yapılan çalışmada, Cisplatin uyguladıkları MDA-MB-231 hücrelerinde, 24 saatte konsantrasyon artışına bağlı olarak sağ kalım ve koloni oluşturma yüzdesinin düştüğü tespit edilmiştir.

Xu ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada, cisplatin uyguladıkları A27880 ve SKOV3 hücrelerinde, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre canlılığının azaldığını bulmuşlardır.

Hou ve diğ. (2018) yaptıkları bir çalışmada, cisplatin uyguladıkları 143B osteosarkoma hücrelerinde, konsantrasyon ve zamana bağlı olarak hücre canlılığında azalma tespit etmişlerdir.

Pan ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada, cisplatinin farklı konsantrasyonlarını uyguladıkları OVCAR3 hücrelerinin canlılığında azalma rapor etmişlerdir.

Buqué ve diğ. (2012) A375, HT144, Hs294T, MeWo, Calu-3 ve H1299 hücre soyları üzerine yaptıkları çalışmada, 0,168, 0,84, 1,68, 8,4 ve 16,8 µM pemetrekset konsantrasyonlarını uygulamışlardır. A375, HT144, Hs294T, MeWo hücrelerinin sağ kalım oranlarının konsantrasyon ve zamana bağlı olarak düştüğünü bildirmişlerdir.

Tong ve diğ. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, HepG2 hücrelerinde 0,1, 1, 10 ve 100 µM pemetrekset uygulaması sonucunda, 0,1 µM ve 1 µM konsantrasyonları uygulanan hücrelerde proliferasyon görülürken, 10 µM ve 100 µM konsantrasyonlarının uygulanması sonucunda anlamlı bir azalış meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca 10 ve 100 µM konsantrasyonları uygulanan HepG2 hücrelerinin koloni oluşturma kapasitelerinin düştüğü belirlenmiştir.

Ge ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada, H1650 ve A549 tümör xenograflarına sahip farelere Pemetrekset uygulandıktan sonra, tümör boyutlarının küçüldüğünü göstermişlerdir. H1650, A549, H2228 ve H292 hücrelerine Pemetrekset uygulandıktan sonra oluşan kolonilerin, kontrol grubuna göre azaldığı belirlenmiştir. H1650, A549, H2228 ve H292 hücrelerinin sağ kalım grafiklerinde ilaç uygulanan gruplarda azalma meydana gelmiştir. Ancak H226 ve BEAS-2B hücrelerinin sağ kalım grafiklerinde artış olduğunu göstermişlerdir.

Giovannetti ve diğ. (2005) yaptıkları çalışmada, pemetrekset ve gemsitabin uyguladıkları A549 hücrelerinde, ilaçlar kombine olarak uygulandığı zaman, tek başlarına uygulanmalarına göre daha yüksek toksisiteye neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Hussain ve diğ. (2015) cisplatin ve aleo vera ekstrelerini birlikte uyguladıkları çalışmada, HeLa ve MCF-7 hücrelerine iki ajan birlikte uygulandığında, tek olarak uygulanmalarından daha etkili olduğu belirlenmiştir.

Ko ve diğ. (2016) yaptıkları çalışmada, A549 ve H1703 hücrelerine cisplatin ve salinomycinin kombine uygulandığında, konsantrasyona bağlı olarak her iki hücre hattında da hücre sağ kalımını azalttığı bildirilmiştir. Buna ek olarak, 1-3 gün süren sitotoksikite deneylerinde, salinomycin ve cisplatinin birlikte uygulandıklarında, tek başına uygulanmalarına kıyasla daha yüksek hücre inhibisyonuna neden olduğunu saptamışlardır.

Ueki ve diğ. (2017) VX2 tümör hücre modeli tavşanlarda yaptığı çalışmada cisplatin ve pemetrekset kullanılan tavşanlarda yaşam süresinin uzadığı görülmüştür.

Hou ve diğ. (2018) yaptıkları bir çalışmada, 143B osteosarkoma hücrelerinde, cisplatinin SAHA ile kombine olarak kullanıldığında hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azaldığı görülmüştür.

Çalışmamızda Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının 24 saat ara ile uygulanması sonucunda, tek başlarına uygulanmalarına göre daha yüksek sitotoksisiteye neden oldukları belirlenmiştir. Ayrıca önce Cisplatin uygulanan deney gruplarında kanser hücre soyunda neden oldukları toksisitenin, normal hücre soyuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tez çalışmamızda Cisplatin'in uygulanması sonucunda, A549 ve BEAS-2B hücre soylarında, uygulanan konsantrasyon ve süreye bağlı olarak inhibisyonun arttığı tespit edilmiştir (Tablo 4.1

ve 4.2; Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8). Pemetrex ilacının düşük konsantrasyonlarının hücre soyları üzerinde proliferasyonu artırıcı, yüksek konsantrasyonlarının ise inhibe edici olduğu saptanmıştır (Tablo 4.3 ve 4.4; Şekil 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16). Pemetrex ilacının meydana getirdiği inhibisyonun Cisplatin kadar yüksek olmadığı belirlenmiştir. Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının birlikte uygulanması sonucunda, önce Cisplatin ilacının uygulandığı grupta, A549 hücrelerinde inhibisyona neden olurken, BEAS-2B hücrelerinde D4 (40 μ M) ve D5 (80 μ M) konsantrasyonlarının proliferasyonu gösterdiği, D6 (160 μ M) konsantrasyonunun neden olduğu inhibisyonun A549 hücreleri kadar fazla olmadığı belirlenmiştir (Tablo 4.5; Şekil 4.17, 4.18, 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24). Önce Pemetrex ilacının uygulandığı grupta ise her iki hücre soyunda da inhibisyon tespit edilmiştir (Tablo 4.6; Şekil 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31, 4.32, 4.33, 4.34). Sonuç olarak, A549 ve BEAS-2B hücreleriyle elde ettiğimiz sonuçların, meydana getirdiği sitotoksosite bakımından, taranan literatürler ile paralel olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda, A549 ve BEAS-2B hücrelerinin morfolojilerinde meydana gelen etkiler değerlendirilmiştir. A549 ve BEAS-2B hücrelerinde, Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının tek başlarına uygulandıkları gruplarda konsantrasyon ve süreye bağlı olarak, sitoplazmalarında granüllerin ve hücre morfolojilerinin kontrol grubuna göre bozulduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.35, 4.36, 4.37, 4.38, 4.39, 4.40, 4.41, 4.42, 4.43, 4.44, 4.45, 4.46). Önce Cisplatin, 24 saat sonra Pemetrex ilaçlarının uygulandığı A549 hücrelerinin morfolojilerinin bozulduğu ancak BEAS-2B hücrelerinin morfolojilerinde kontrol grubuna göre değişiklik olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.47 ve 4.49). Bu durum, normal hücre soyunun morfolojik olarak toksisiteden etkilenmediğini göstermektedir. Önce Pemetrex, 24 saat sonra Cisplatin ilaçlarının uygulandığı A549 ve BEAS-2B hücrelerinde konsantrasyona bağlı olarak sitoplazmalarında granüllerin ve hücre morfolojilerinin kontrol grubuna göre bozulduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.48 ve 4.50).

Zhang ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada, Cisplatin uyguladıkları HepG2 hücrelerinde apoptotik hücrelerin ve sitoplazmik vakuollerin oluştuğu, sitoplazmik büzülmelerin görüldüğü belirlenmiştir.

Giovannetti ve diğ. (2005) pemetrekset ve gemcitabine ilaçlarının ayrı ayrı ve birlikte uygulandığı A549 ve Calu hücrelerinde tipik apoptotik morfolojilerin görüldüğü, hücrelerin büzüldüğünü rapor etmişlerdir.

Yang ve diğ., (2011) pemektrekset ile yaptıkları çalışmada, A549 hücrelerine 1 μ M uygulayarak 48 ve 72 saat inkübasyona bıraktıkları deney gruplarının, kontrol grubuna göre morfolojilerinin değiştiği belirlenmiştir.

Buqué ve diğ. (2012) yılında yaptıkları çalışmada, pemetrekset uyguladıkları A375 hücrelerinde, koloni oluşturan hücrelerin sayılarının azaldığını ve morfolojilerinin değiştiğini tespit etmişlerdir. Literatürler ile karşılaştırıldığında hücrelerde gözlemlediğimiz morfolojik bulgularımızın paralel olduğu görülmektedir. Bu bulgular, uygulanan ilaçların, toksik etki yarattığını ve bu etkinin hücre morfolojilerinde değişime neden olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, A549 ve BEAS-2B hücre kültürlerine, önce Cisplatin, 24 saat sonra Pentrex ilaçlarının uygulanması sonucunda Kaspaz 3,7 ve 9 aktivasyonlarında meydana gelen değişiklikler, kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak tespit edilmiştir. A549 hücrelerinin kaspaz aktivitelerinde artış gözlemlenirken, BEAS-2B hücrelerinde 24 saat ara ile D4 (40 μ M) ve D5 (80 μ M) Cisplatin konsantrasyonları üzerine, D4 (1 μ M), D5 (2 μ M) ve D6 (4 μ M) Pentrex konsantrasyonlarının uygulandığı gruplarda kaspaz 3,7 ve 9 aktivitelerinin azaldığı, D6 (160 μ M) Cisplatin konsantrasyonunu takiben D4 (1 μ M), D5 (2 μ M) ve D6 (4 μ M) Pentrex konsantrasyonunun uygulandığı deney gruplarında Kaspaz 3,7 artış gösterirken, Kaspaz 9 aktivitesinin D6+D4 ve D6+D6 deney gruplarında azaldığı belirlenmiştir.

Giovannetti ve diğ. (2005) cisplatin ve gempitabin ile yaptıkları çalışmada, ilaçların kombine olarak kullanımının, tek başlarına kullanılmalarına göre daha yüksek apoptotik indekse neden olduğunu göstermişlerdir.

Tong ve diğ. (2015) yaptıkları çalışmada, 10 μ M ve 100 μ M pemetrekset konsantrasyonlarının hücrelerde apoptoza neden olduğunu bildirmişlerdir.

Velma ve diğ. (2016) tarafından HL-60 hücrelerinde yapılan bir çalışmada, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, zaman ve konsantrasyon artışına bağlı olarak apoptoz/nekrozu arttırdığı görülmüştür. 96 saatlik cisplatin uygulamasının sonunda, apoptotik/nekrotik hücrelerin oranının kontrol ile karşılaştırıldığında anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir.

Cong ve diğ. (2016) cisplatin ile yaptığı bir çalışmada 24 saat sonra gerçekleştirilen apoptotik indeks deneyi sonucunda ise A549 hücrelerinde %22 geç apoptotik hücre ve yaklaşık olarak

%14.9 oranında erken apoptotik hücreye rastlanırken, HeLa hücrelerinde %54 geç apoptotik hücre ve %4.8 oranında erken apoptotik hücre görülmüştür.

İçsel ve diğ. (2018) yaptıkları çalışmada, Cisplatin uygulanan HCT116 hücrelerinde Kaspaz-3/7 aktivitesine bakıldığında ise, cisplatin uygulanan HCT116 hücrelerinde apoptotik/ölü hücreler %77.16 iken, kontrol hücrelerinde apoptotik/ölü hücre yüzdesini %6.14 olarak bildirmişlerdir.

Hou ve diğ., (2018) 143 osteosarkom hücrelerinde yaptıkları çalışmada, apoptotik hücrelerde, kontrole göre artış rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda kanser hücrelerinde meydana gelen Kaspaz 3, 7 ve 9 aktivasyonunun artması, literatürler ile paralellik göstermektedir. BEAS-2B hücrelerinde Kaspaz 3, 7 ve 9 aktivasyonunun A549 hücrelerindeki kadar yüksek olmaması, hücrelerde apoptoz sürecinin A549 hücreleri kadar fazla olmadığını göstermektedir.

Tez çalışmamızda, hücre siklusunda yer alan genlerin anlatım seviyeleri tespit edilerek, akciğer kanseri hücre soyu A549 ve akciğer normal hücre soyu BEAS-2B arasındaki farkın belirlenmesi çalışmamızın özgün yönünü oluşturmaktadır. Bu bağlamda hücre siklusunda yer alan genlerin anlatım seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

Lee ve diğ. (2016) yaptıkları çalışmada, 40 μ M cisplatin uyguladıkları MSTO-211H hücresinde, Siklin B1 ve Siklin D1 ifadesinin azaldığını, p21 ifadesinde herhangi bir değişiklik olmadığını, Bcl-2 genin aşağı regüle olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda A549 hücre soyunda, *Siklin B1*, *Siklin D1* ve *Bcl-2* ifadesinin aşağı regüle olduğu, BEAS-2B hücre soyunda ise *Siklin B1* ve *Siklin D1* ifadesinin yukarı regüle olduğu, *Bcl-2* geninin anlatım seviyesinde anlamlı bir fark saptanmamıştır ($FC \leq |1.5|$).

Qin ve diğ. (2018) SKOV3 hücreleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada, cisplatin uygulanan hücrelerde, hücre siklusuyla ilgili genlerden olan CDK 2 ve Siklin B anlatım seviyelerinde, kontrole göre azalma tespit ederken, p53 anlatım seviyelerinde kontrole göre artış gözlemlenmiştir. Apoptoz ile ilgili olan Bcl-2 anlatım seviyesinde kontrol hücrelerine göre azalma gözlenirken, Apaf-1 ve sitokrom c düzeylerinde artış meydana geldiği western blot yöntemi ile gösterilmiştir. Çalışmamızda, *CDK2* geninin her iki hücre soyunda da yukarı regüle olduğu belirlenmiştir.

Hou ve diğ. (2018) yaptıkları bir çalışmada, cisplatin uyguladıkları 143B osteosarkoma hücrelerinde, *Bax* geninde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış, *Bcl-2* geninin anlatım seviyesinde ise azalma görüldüğü bildirilmiştir.

Li ve diğ., 2015 yılında SiHa ve cisplatin dirençli SiHa-DPP hücreleri üzerine cisplatin ile yaptıkları çalışmada, SiHa-DPP hücre soyunda, p16 proteininin anlatım seviyesinde SiHa hücre soyuna göre yukarı regülasyon olduğu bildirilmiştir. Bu durum, cisplatin dirençli hücrelerde p16 seviyesinin yukarı regüle olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda, A549 hücre soyunda p16 geninin aşağı regüle olduğu, BEAS-2B hücrelerinde ise yukarı regüle olduğu belirlenmiştir.

Chen ve diğ., 2015 yılında yaptıkları çalışmada, OVCAR3 ve A2780 hücre soylarına 48 saat süresince 3 µM cisplatin uygulayarak gerçekleştirdikleri deneyde, XIAP proteininin anlatım seviyesinin azaldığını göstermişlerdir. Çalışmamızda, XIAP anlatım seviyesi A549 hücrelerinde aşağı regüle olurken, BEAS-2B hücrelerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır ($FC \leq 1.5$).

Nakajima ve diğ., (2016) yaptıkları çalışmada, HeLa hücre soyu üzerine uyguladıkları 30 µM cisplatin ilacının, süreye bağlı olarak, Mcl-1 anlatım seviyesini aşağı regüle ettiği, Bcl-2 anlatım seviyesinde anlamlı bir fark olmadığını tespit etmişlerdir. Tez çalışmamızda, *Mcl-1* geninin A549 hücrelerinde aşağı regüle olduğu, BEAS-2B hücrelerinde ise yukarı regüle olduğu belirlenmiştir.

Yang ve diğ., 2011 yılında A549 hücrelerine farklı pemetrekset konsantrasyonları uygulayarak 24 ve 48 saat inkübasyona bıraktıkları çalışmada, CDK1, CDK2, Siklin A ve Siklin B1 protein anlatım seviyelerinde kontrol grubuna göre konsantrasyona ve süreye bağımlı olarak artış gözlemlendiği bildirilmiştir. Çalışmamızda A549 hücrelerinde *CDK1*, *Siklin A1* ve *Siklin A2* genlerinin aşağı regüle olduğu, BEAS-2B hücrelerinde yukarı regüle olduğu saptanmıştır.

Satoh ve diğ. (2017) yaptıkları çalışmada, 20 µM pemetrekset uyguladıkları H28 hücrelerinde, Siklin A seviyesinin değişmediği, 40 µM cisplatin uyguladıkları deney grubunda ise Siklin A ve Siklin B1 seviyelerinde anlamlı bir azalma olduğunu göstermişlerdir.

Kim ve diğ., (2016) cisplatin duyarlı ve cisplatin dirençli hücreler üzerine yaptıkları deneyde, cisplatin dirençli olan T24R2 hücrelerinin Siklin B1, CDK6, Kaspaz 6 ve Bcl-2 anlatım seviyelerinin cisplatin duyarlı hücrelere göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir.

Çalışmamızda A549 hücrelerinde *CDK6* geninin aşağı regüle olduğu, BEAS-2B hücrelerinde ise yukarı regüle olduğu belirlenmiştir.

Dai ve diğ., 2017 yılında yaptıkları çalışmada, 143B hücrelerine cisplatin uyguladıkları deneyde, Siklin A2 ve *CDK2* protein seviyelerinde azalma tespit etmişlerdir.

Račkauskas ve diğ., (2017) yaptıkları çalışmada, tek başına cisplatin uyguladıkları TFK-1 ve HuCTT-1 hücrelerinde, *Bcl-2* proteininin anlatım seviyesinin her iki hücre hattında da arttığını, ancak cisplatin sülforafan ile kombine olarak uygulandığında, *Bcl-2* proteininin anlatım seviyesinin düştüğü göstermişlerdir. XIAP protein seviyesinde, cisplatinin tek başına ya da kombine olarak kullanılması TFK-1 hücrelerinde anlatım seviyesinde herhangi bir değişikliğe neden olmazken, HuCTT-1 hücrelerinde azaldığı tespit edilmiştir.

Yang ve diğ., 2016 yılında yaptıkları HepG2 hücreleri üzerine yaptıkları çalışmada, cisplatin uyguladıkları deney grubunda, kontrole göre Siklin A2 proteininin anlatım seviyesi değişmezken, Siklin B1 ve Siklin D1 anlatım seviyelerinde göreceli olarak artış olduğu belirlenmiştir. *Bcl-2* proteininin anlatım seviyesinin azaldığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda, hücre siklusu genlerinin anlatım seviyeleri incelenerek, A549 ve BEAS-2B hücrelerindeki farklılığın ortaya konması amaçlanmıştır. A549 hücrelerinde, hücre siklusu genlerinden *Siklin D*, *CDK1*, *CDK4*, *CDK6*, *Siklin B*, *Siklin A1* ve *Siklin A2* genlerinin anlatım seviyelerinin kontrol grubuna göre aşağı regüle olduğu, *CDK2* genini ise kontrol grubuna göre yukarı regüle olduğu saptanmıştır. *Siklin E* genin anlatım seviyesinde değişim gözlenmemiştir. BEAS-2B hücrelerinde *Siklin D*, *CDK1*, *CDK2*, *CDK4*, *CDK6*, *Siklin E*, *Siklin B*, *Siklin A1* ve *Siklin A2* genleri yukarı regüle olduğu belirlenmiştir (Tablo 4.7, Şekil 4.55, 4.57). *XIAP*, *Mcl-1*, *Bcl-2* gibi antiapoptotik genlerin anlatım seviyelerinin aşağı regüle olması, kullanılan ajanların A549 hücreleri üzerine apoptotik etkisinin olduğunu gösterirken, BEAS-2B hücrelerinde *Bcl-2*, *XIAP* anlatım seviyelerinin anlamsız, *Mcl-1* genin anlatım seviyesinin yukarı regüle olması, hücrelerde apoptozun tetiklenmediğini göstermektedir (Şekil 4.56). Siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin ve DNA hasar tanıma ve tamir genlerinin A549 hücrelerinde aşağı regüle olması, hücrelerde hücre siklusu tutuklanmasının ve DNA tamirinin gerçekleşmediğini göstermektedir. BEAS-2B hücrelerinde yukarı regüle olan siklin bağımlı kinaz inhibitörleri ve DNA hasar tanıma ve tamir genleri, hücrelerin kontrol noktalarında birikerek, DNA tamirinin gerçekleştiğini göstermektedir. qRT-PCR ile elde edilen bu sonuçlar

transkripsiyonel seviyede olup, translasyonel ve post-translasyonel seviyede de incelenmesi bulgularımıza katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının ayrı ayrı ve 24 saat ara ile kombine olarak A549 ve BEAS-2B hücreleri üzerine uygulandığında meydana getirdiği sitotoksik etki ve hücre siklusunda yer alan siklinler, siklin bağımlı kinazlar, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri, apoptoz sürecinde yer alan antiapoptotik genler ve DNA tamir mekanizmaları üzerindeki etkilerinin belirlenerek, moleküler mekanizmada rol oynayan genlerin anlatımlarının araştırılarak literatürde ilk kez ortaya konması açısından oldukça önem taşımaktadır. 24 saat ara ile Cisplatin ve Pemetrex ilaçları uygulanan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde, siklin, siklin bağımlı kinaz ve antiapoptotik genlerin A549 hücrelerinde aşağı regüle, BEAS-2B hücrelerinde ise yukarı regüle olduğunun gösterilerek aradaki farkın ortaya konmuş olması, bu amaçla yapılan çalışmalarda bir ilki temsil etmektedir.

Günümüzde kanser, hücre siklusunda yer alan bir ya da daha fazla molekülün mutasyona uğraması sonucunda, kontrolsüz hücre bölünmesine neden olan bir hastalık olarak oldukça sık karşımıza çıkmaktadır. Kanser tedavisinde, kanserli hücreleri yok ederken, normal hücrelere en az zararın verilmesi, hasta sağlığı ve tedavinin etkinliği açısından önem taşımaktadır. Bu yüzden, kemoterapide kullanılan ilaçların hücre siklusu mekanizmaları üzerine etkilerinin bilinmesi, tedavinin etkinliğinin artması açısından ve bu moleküllere karşı ilaç geliştirme olasılığı bakımından önem taşımaktadır.

Flow sitometri ve daha ileri moleküler teknikler ile protein seviyelerinin analizlerinin yapılarak bulgularımızın desteklenmesi ve hücre siklusu ile ilişkili yollaklarda farkın ortaya konması amacıyla planlanacak olan yeni *in vitro* ve *in vivo* projeler bu alana katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmada, kemoterapide oldukça sık olarak kullanılan küçük hücreli dışı akciğer kanserinin tedavisinde tercih edilen Cisplatin ve Pemetrex ilaçlarının kombine kullanımı ile daha etkili bir sitotoksik aktivitenin oluştuğu ve böylece kanser ve normal hücreler üzerindeki farklarının ortaya konmasının, kanser tedavisinin etkinliğinin artmasına ve bu bağlamda yeni moleküllerin araştırılıp, geliştirilmesine temel olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aarts, M., Linardopoulos, S., Turner, N.C., 2013, Tumour selective targeting of cell cyclekinases for cancer treatment, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 13, 529–535.
- Adjei, A.A., 2004, Pharmacology and Mechanism of Action of Pemetrexed, *Clinical Lung Cancer*, 5 (2), 51-55.
- Anonim A, 2018, Cell Cycle And Checkpoint Controls, <https://www.ptglab.com/products/featured-products/cell-cycle-and-checkpoint-controls/> [Ziyaret tarihi: 30 Mayıs 2019].
- Anonim B, 2016, Cell Cycle Control, <https://www.mycancergenome.org/content/molecular-medicine/pathways/cell-cycle-control-DNA-damage> [Ziyaret tarihi: 3 Haziran 2019].
- Anonim C, 2012, Cisplatin, <https://en.wikipedia.org/wiki/Cisplatin> [Ziyaret tarihi: 26 Mayıs 2019].
- Anonim D, 2019, Nucleic acid-drug interactions, <https://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions> [Ziyaret tarihi: 4 Haziran 2019].
- Anonim E, 2006, Pemetrexed, <https://en.wikipedia.org/wiki/Pemetrexed> [Ziyaret tarihi: 7 Haziran 2019].
- Baldwin, C.M., Perry, C.M, 2009, Pemetrexed: a review of its use in the management of advanced non-squamous non-small cell lung cancer, *Drugs*, 69 (16), 2279-302.
- Bartek, J., Lukas, C., Lukas, J., 2004, Checking on DNA damage in S phase, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 792–804.
- Bartek, J., Lukas, J., 2007, DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 19, 238–45.
- Bartek, J., Mistrik, M., Bartkova, J., 2012, Thresholds of replication stress signaling in cancer development and treatment, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19, 5–7.
- Bauer, N.C., Corbett, A.H., Doetsch, P.W., 2015, The current state of eukaryotic DNA base damage and repair, *Nucleic Acids Res.*, 43, 10083–101.
- Brozovic, A., Ambriovic-Ristov, A., Osmak, M., 2010, The relationship between cisplatin-induced reactive oxygen species, glutathione, and BCL-2 and resistance to cisplatin, *Crit. Rev. Toxicol.*, 40, 347–359.
- Buqué, A., Muhiáldin, J,Sh, Muñoz, A., Calvo, B., Carrera, S., Aresti, U., Sancho, A., Rubio, I., López-Vivanco, G., 2012, Molecular mechanism implicated in Pemetrexed-induced apoptosis in human melanoma cells, *Mol Cancer*, 11 (25), 1-15.
- Calvert, A.H., 2004, Biochemical pharmacology of pemetrexed, *Oncology (Williston Park)*, 18, 13-17.

- Canpolat, F., 2016, Hücre Siklusu ve Apoptoz, *Güncel Dermatoloji Dergisi*, 1 (1), 11-17.
- Casimiro, M., Pestell R.G., Knudsen, E.S., 2017, *Cell Cycle-Related Kinases*, Cancer Therapeutic Targets, In:Marshall J. (ed.) Springer, New York, NY, ISBN: 978-1-4419-0717-2, 989-996.
- Cattamanchi, A., 2018, *What to know about lung cancer*, <https://www.medicalnewstoday.com/articles/323701.php>, [Ziyaret tarihi: 8 Haziran 2019].
- Chen, K.C., Yang, T.Y., Wu, C.C., Cheng, C.C., Hsu, S.L., Hung, H.W., Chen, J.W., Chang, G.C., 2014, Pemetrexed induces S-phase arrest and apoptosis via a deregulated activation of Akt signaling pathway, *PLoS One*, 9 (5), e97888.
- Chen, X.X., Xie, F.F., Zhu, X.J., Lin, F., Pan, S.S., Gong, L.H., Qiu, J.G., Zhang, W.J., Jiang, Q.W., Mei, X.L., Xue, Y.Q., Qin, W.M., Shi, Z., Yan, X.J., 2015, Cyclin-dependent kinase inhibitor dinaciclib potently synergizes with cisplatin in preclinical models of ovarian cancer, *Oncotarget*, 6 (17), 14926-39.
- Ciccio, A., Elledge, S.J., 2010, The DNA damage response: making it safe to play with knives, *Mol Cell*, 40 (2), 179-204.
- Cimprich, K.A., 2007, Probing ATR, activation with model DNA templates, *Cell Cycle*, 6, 2348–54.
- Cimprich, K.A., Cortez, D., 2008, ATR: an essential regulator of genome integrity, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 9, 616–27.
- Ciuleanu, T., Brodowicz, T., Zielinski, C., Kim, J.H., Krzakowski, M., Laack, E., Wu, Y.L., Bover, I., Begbie, S., Tzekova, V., Cucevic, B., Pereira, J.R., Yang, S.H., Madhavan, J., Sugarman, K.P., Peterson, P., John, W.J., Krejcy, K., Belani, C.P., 2009, Maintenance pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care for non-small-cell lung cancer: a randomised, double-blind, phase 3 study, *Lancet*, 374, 1432–1440.
- Clarke, A.R., Gledhill, S., Hooper, M.L., Bird, C.C., Wyllie, A.H., 1994, p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma irradiation, *Oncogene*, 9 (6), 1767-1773.
- Clémence, D., Robin, D., Pierre, D., Corinne, A., Claire, S., Christelle, B., Emmanuelle, M., Frédérique, P.L., Mahchid, B., 2017, Development and cytotoxic response of two proliferative MDA-MB-231 and non-proliferative SUM1315 three-dimensional cell culture models of triple-negative basal-like breast cancer cell lines, *Oncotarget*, 8 (56), 95316–95331.
- Collins, L.G., Haines, C., Perkel, R., Enck, R.E., 2007, Lung cancer: diagnosis and management, *Am Fam Physician*, 75 (1), 56-63.

- Cong, Y., Wang, L., Wang, Z., He, S., Zhou, D., Jing, X., Huang, Y., 2016, Enhancing Therapeutic Efficacy of Cisplatin by Blocking DNA Damage Repair. *ACS Med. Chem. Lett.*, 7, 924–928.
- Cortes-Dericks, L., Carboni, G.L., Schmid, R.A., Karoubi, G., 2010, Putative cancer stem cells in malignant pleural mesothelioma show resistance to cisplatin and pemetrexed, *Int J Oncol.*, 37 (2), 437-44.
- Curtin, N.J., Hughes, A.N., 2001, Pemetrexed disodium, a novel antifolate with multiple targets, *Lancet Oncol.*, 2 (5), 298-306.
- Dai, G., Yu, L., Yang, J., Xia, K., Zhang, Z., Liu, G., Gao, T., Guo, W., 2017, The synergistic antitumor effect of cinobufagin and cisplatin in human osteosarcoma cell line in vitro and in vivo, *Oncotarget*, 8 (49), 85150-85168.
- Darzynkiewicz, Z., Gong, J., Juan, G., Ardelt, B., Traganos, F., 1996, Cytometry of cyclin proteins, *Cytometry*, 1996, 25 (1), 1-13.
- Dasari, S., Tchounwou, P.B., 2014, Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action, *Eur J Pharmacol*, 740, 364-378.
- Desoize, B., 2002, Cancer and metals and metal compounds: Part I—Carcinogenesis., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 42, 1–3.
- Dominguez-Brauer, C., Thu, KL, Mason, J.M., Blaser, H., Bray, M.R., Mak, T.W., 2015, Targeting mitosis in cancer: emerging strategies, *Mol. Cell*, 60, 524–36.
- Einhorn, L.H., Williams, S.D., Loehrer, P.J, Birch, R., Drasga, R., Omura, G., Greco, F.A., 1989, Evaluation of optimal duration of chemotherapy in favorable-prognosis disseminated germ cell tumors: a Southeastern Cancer Study Group protocol, *J Clin Oncol*, 7, 387.391.
- Eliopoulos, A.G., Kerr, D.J., Herod, J., Hodgkins, L., Krajewski, S., Reed, J.C., Young, L.S., 1995, The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and Bcl2, *Oncogene*, 11, 1217-1228.
- Errico, A., Costanzo, V., 2012, Mechanisms of replication fork protection: a safeguard for genome stability, *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 47,222–35.
- Estanqueiro, M., Amaral, M.H., Conceição, J., Sousa Lobo, J.M., 2015, Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art, *Colloids Surf B Biointerfaces*, 126, 631-48.
- Finn, R.S., Dering, J., Conklin, D., Kalous, O., Cohen, D.J., Desai, A.J., Ginther, C., Atefi, M., Chen, I., Fowst, C., Los, G., Slamon, D.J., 2009, PD 0332991, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, preferentially inhibits proliferation of luminal estrogen receptor-positive human breast cancer cell lines in vitro, *Breast Cancer Res.*, 11 (5), R77.
- Florea, A.M., Büsselberg, D., 2011, Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects, *Cancers (Basel)*, 3 (1), 1351-71.

- Frerichs, A., Thoma, R., Abdallah, A.T., Frommolt, P., Werr, W., Chandler, J.W., 2016, The founder-cell transcriptome in the Arabidopsis apetalal cauliflower inflorescence meristem, *BMC Genomics*, 17, 855.
- Fuertes, M.A., Alonso, C., Pérez, J.M., 2003, Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance, *Chem Rev.*, 103, 645-662.
- Gaucher, J., Montellier, E., Sassone-Corsi, P., 2018, Molecular Cogs: Interplay between Circadian Clock and Cell Cycle, *Trends Cell Biol.*, 28 (5), 368-379.
- Ge, H., Ke, J., Xu, N., Li, H., Gong, J., Li, X., Song, Y., Zhu, H., Bai, C., 2018, Dexamethasone alleviates pemetrexed-induced senescence in Non-Small-Cell Lung Cancer, *Food Chem Toxicol.*, 119, 86-97.
- Giovannetti, E., Mey, V., Nannizzi, S., Pasqualetti, G., Marini, L., Del Tacca, M., Danesi, R., 2005, Cellular and pharmacogenetics foundation of synergistic interaction of pemetrexed and gemcitabine in human non-small-cell lung cancer cells, *Mol Pharmacol.*, 68 (1), 110-8.
- Global Cancer Observatory, International Agency for Research on Cancer, World Health Organisation, 2018, *Cancer Today*, [Goel, S., DeCristo, M.J., McAllister, S.S., Zhao, J.J., 2018, CDK4/6 Inhibition in Cancer: Beyond Cell Cycle Arrest, *Trends Cell Biol.*, 28 \(11\), 911-925.

Goldstein, M., Kastan, M.B., 2015, The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy, *Annu. Rev. Med.*, 66, 129-43.

Gonen, N., Assaraf, Y.G., 2012, Antifolates in cancer therapy: structure, activity and mechanisms of drug resistance, *Drug Resist Updat.*, 15 \(4\), 183-210.

Goodsell, D.S., 2006, The Molecular Perspective: Cisplatin, *The Oncologist*, 11, 316-317.

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.

Grem, J.L., 1990, *Fluorinated pyrimidines*, Cancer Chemotherapy: Principles and Practice, In: Chabner, B.A., Collins, J.M. \(ed.\), Philadelphia, PA: JB Lippincott.](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=792&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Afalse%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id=)

- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144, 646–674.
- Hanna, N., Shepherd, F.A., Fossella, F.V., Pereira, J.R., De Marinis, F., von Pawel, J., Gatzemeier, U., Tsao, T.C., Pless, M., Muller, T., Lim, H.L., Desch, C., Szondy, K., Gervais, R., Shaharyar, Manegold, C., Paul, S., Paoletti, P., Einhorn, L., Bunn Jr., P.A., 2004, Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy, *J. Clin. Oncol.*, 22, 1589–1597.
- Harbour, J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A., Dean, D.C., 1999, Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1, *Cell*, 98, 859–869.
- Hekmat-Nejad, M., You, Z., Yee, M.C., Newport, J.W., Cimprich, K.A., 2000, Xenopus ATR is a replication-dependent chromatin-binding protein required for the DNA replication checkpoint, *Curr. Biol.*, 10, 1565–1573.
- Hochegger, H., Takeda, S., Hunt, T., 2008, Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all?, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 9 (11), 910-6.
- Hoeijmakers, J.H., 2001, Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature*, 411, 366–74.
- Horibe, S., Matsuda, A., Tanahashi, T., Inoue, J., Kawauchi, S., Mizuno, S., Ueno, M., Takahashi, K., Maeda, Y., Maegouchi, T., Murakami, Y., Yumoto, R., Nagai, J., Takano, M., 2015, Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins, *Life Sci.*, 124, 31-40.
- Hou, M., Huang, Z., Chen, S., Wang, H., Feng, T., Yan, S., Su, Y., Zuo, G., 2018, Synergistic antitumor effect of suberoylanilide hydroxamic acid and cisplatin in osteosarcoma cells, *Oncology Letters*, 16 (4), 4663-4670.
- Hussain, A., Sharma, C., Khan, S., Shah, K., Haque, S., 2015, Aloe vera inhibits proliferation of human breast and cervical cancer cells and acts synergistically with cisplatin, *Asian Pac J Cancer Prev.*, 16 (7), 2939-46.
- Hustedt, N., Durocher, D., 2017, The control of DNA repair by the cell cycle, *Nat Cell Biol.*, 19 (1), 1-9.
- Icard, P., Fournel, L., Wu, Z., Alifano, M., Lincet, H., 2019, Interconnection between Metabolism and Cell Cycle in Cancer, *Trends in Biochemical Sciences*, 44 (6), 490-501.
- Icse, C., Yilmaz, V.T., Aygun, M., Cevatetme, B., Alper, P., Ulukaya, E., 2018, Palladium(II) and platinum(II) saccharinate complexes with bis(diphenylphosphino)methane/ethane: synthesis, S-phase arrest and ROS-mediated apoptosis in human colon cancer cells, *Dalton Transactions*, 47 (33), 11397-11410.
- Jackson, S.P., Bartek, J., 2009, The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature*, 461, 1071–8.

- Jasin, M., Rothstein, R., 2013, Repair of strand breaks by homologous recombination, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5, a012740.
- Jeffers, J.R., Parganas, E., Lee, Y., Yang, C., Wang, J., Brennan, J., MacLean, K.H., Han, J., Chittenden, T., Ihle, J.N., McKinnon, P.J., Cleveland, J.L., Zambetti, G.P., 2003, Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptosis pathways, *Cancer Cell*, 4, 321-328.
- Joerger, M., Omlin, A., Cerny, T., Früh, M., 2010, The role of pemetrexed in advanced non small-cell lung cancer: special focus on pharmacology and mechanism of action, *Curr Drug Targets*, 11 (1), 37-47.
- Kalucka, J., Missiaen, R., Georgiadou, M., Schoors, S., Lange, C1., De Bock, K., Dewerchin, M., Carmeliet, P., 2015, Metabolic control of the cell cycle, *Cell Cycle*, 14, 3379–3388.
- Kaplon, J., van Dam, L., Peeper, D., 2015, Two-way communication between the metabolic and cell cycle machineries: the molecular basis, *Cell Cycle*, 14, 2022–2032.
- Kastan, M.B., 2005, Cell biology: a BID for the pathway, *Nature*, 437 (7062), 1103.
- Kastan, M.B., Bartek, J., 2004, Cell-cycle checkpoints and cancer, *Nature*, 432, 316-323.
- Keen, N., Taylor, S., 2004, Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents, *Nat. Rev. Cancer*, 4, 927–36.
- Kelland, L., 2007, The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy, *Nat Rev Cancer*, 7, 573-584.
- Kim, S.H., Ho, J.N., Jin, H., Lee, S.C., Lee, S.E., Hong, S.K., Lee, J.W., Lee, E.S., Byun, S.S., 2016, Upregulated expression of BCL2, MCM7, and CCNE1 indicate cisplatin-resistance in the set of two human bladder cancer cell lines: T24 cisplatin sensitive and T24R2 cisplatin resistant bladder cancer cell lines, *Investig Clin Urol.*, 57 (1), 63-72.
- Ko, J.C., Zheng, H.Y., Chen, W.C., Peng, Y.S., Wu, C.H., Wei, C.L., Chen, J.C., Lin, Y.W., 2016, Salinomycin enhances cisplatin-induced cytotoxicity in human lung cancer cells via down-regulation of AKT-dependent thymidylate synthase expression, *Biochem Pharmacol.*, 122, 90-98.
- Kops, G.J., Weaver, B.A., Cleveland, D.W., 2005, On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint, *Nat Rev Cancer*, 5 (10), 773–85.
- Kunkel, T.A., 2015. Celebrating DNA's repair crew. *Cell*, 163:1301–3.
- Lee, Y.J., Lee, G.J., Yi, S.S., Heo, S.H., Park, C.R., Nam, H.S., Cho, M.K., Lee, S.H., 2016, Cisplatin and resveratrol induce apoptosis and autophagy following oxidative stress in malignant mesothelioma cells, *Food Chem Toxicol.*, 97, 96-107.
- Li, X., Wei, S., Chen, J., 2014, Critical appraisal of pemetrexed in the treatment of NSCLC and metastatic pulmonary nodules, *OncoTargets and Therapy*, 7, 937–945.

- Li, Y., Xiao, S., Dan, L., Xue, M., 2015, P16INK4A is required for cisplatin resistance in cervical carcinoma SiHa cells, *Oncol Lett.*, 9 (3), 1104-1108.
- Lin, Y., Ma, W., Benchimol, S., 2000, Pidd, a new death-domain-containing protein, is induced by p53 and promotes apoptosis, *Nat Genet*, 26, 122-127.
- Malkova, A., Haber, J.E., 2012, Mutations arising during repair of chromosome breaks, *Annu. Rev. Genet.*, 46, 455-73.
- Malumbres, M., 2014, Cyclin-dependent kinases, *Genome Biol.*, 15, 122.
- Malumbres, M., Barbacid, M., 2001, To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer, *Nature Rev. Cancer*, 1, 222-231.
- Malumbres, M., Barbacid, M., 2009, Cell cycle, CDKs and cancer: A Changing Paradigm, *Nature Reviews Cancer*, 9 (3), 153-166.
- Massague, J., 2004, G1 cell-cycle control and cancer, *Nature*, 432, 298-306.
- Masuda, H., Tanaka, T., Takahama, U., 1994, Cisplatin generates superoxide anion by interaction with DNA in a cell-free system, *Biochem Biophys Res Commun*, 203, 1175-1180.
- Moggs, J.G., Szymkowski, D.E., Yamada, M., Karran, P., Wood, R.D., 1997, Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts, *Nucleic Acids Res*, 1997, 25, 480-491.
- Moncada, S., Higgs, E.A., Colombo, S.L., 2012, Fulfilling the metabolic requirements for cell proliferation, *Biochem. J.*, 446, 1-7.
- Morris, J., Hartl, D., Knoll, A., Lue, R., Berry, A., Biewener, A., Farrell, B., Holbrook, N., Pierce, N., Viel, A., 2019, *Biology: How Life Works Vol.1 3rd Ed.*, New York: Macmillan Higher Education, New York, ISBN: 978-1319048884.
- Moynahan, M.E., Jasin, M., 2010, Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 11, 196-207.
- Muhsin, M., Gricks, C., Kirkpatrick, P., 2004, Pemetrexed disodium, *Nature Reviews Drug Discovery*, 3, 825-826.
- Murga, M., Campaner, S., Lopez-Contreras, A.J., Toledo, L.I., Soria, R., Montaña, M.F., Artista, L., Schleker, T., Guerra, C., Garcia, E., Barbacid, M., Hidalgo, M., Amati, B., Fernandez-Capetillo, O., 2011, Exploiting oncogene-induced replicative stress for the selective killing of Myc-driven tumors, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 18, 1331-35.
- Musacchio, A., Salmon, E. D., 2007, The spindle-assembly checkpoint in space and time, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 8, 379-393.

- Nakajima, W., Sharma, K., Lee, J.Y., Maxim, N.T., Hicks, M.A., Vu, T.T., Luu, A., Yeudall, W.A., Tanaka, N., Harada, H., 2016, DNA damaging agent-induced apoptosis is regulated by MCL-1 phosphorylation and degradation mediated by the Noxa/MCL-1/CDK2 complex, *Oncotarget*, 7 (24), 36353-36365.
- Nataraj, A.J., II, J.C.T., Ananthaswamy, H.N., 1995, p53 gene mutations and photocarcinogenesis, *Photochem Photobiol*, 62 (2), 218-230.
- Nigg, E.A., 2001, Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 21–32.
- Nyberg, K.A., Michelson, R.J., Putnam, C.W., Weinert, T.A., 2002, Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints, *Annu. Rev. Genet.*, 36, 617–656.
- O'Connell, M., Raleigh, J., Verkade, H., Nurse, P., 1997, Chk1 is a wee1 kinase in the G2 DNA damage checkpoint inhibiting cdc2 by Y15 phosphorylation, *EMBO J.*, 16, 545–54.
- O'Connor, M.J., 2015, Targeting the DNA damage response in cancer, *Mol. Cell*, 60, 547–60.
- Onur, E., Tuğrul, B., Bozyiğit, F., 2009, DNA Hasarı ve Onarım Mekanizmaları, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 7 (2), 61-70.
- Ortega, S., Malumbres, M. Barbacid, M. 2002, Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer, *Biochim. Biophys. Acta*, 1602, 73–87.
- Otto, T., Sicinski, P., 2017, Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy, *Nat Rev Cancer*, 17 (2), 93-115.
- Ozturk, M., Dagdeviren Ozsoylemez, O., Kaya Dagistanli, F., 2017, *The detection techniques for autophagy-associated Cell Death-Related Genes and Proteins: Gene Expression Assay and Immunohistochemistry*, Methods in Molecular Biology, Springer Science+Business Media, New York, 1-12.
- Özcan, F.G., Dağdeviren, Ö., Akman, G., Khalilia, W., Tezel, B. , Karagöz, A., Melikoğlu, G., Anıl, S., Kültür, Ş., Sütülpınar, N., 2016, Screening for antitumour activity of various plant extracts on HeLa and C 4-I cell lines, *Journal Of BUON*, 21, 13-24.
- Pan, H., Li, J., Rankin, G.O., Rojanasakul, Y., Tu, Y., Chen, Y.C., 2018, Synergistic effect of black tea polyphenol, theaflavin-3,3'-digallate with cisplatin against cisplatin resistant human ovarian cancer cells, *J Funct Foods*, 46, 1-11.
- Payet, D., Gaucheron, F., Sip, M., Leng, M., 1993, Instability of the monofunctional adducts in cis-[Pt(NH₃)₂(N7-N-methyl-2-diazapyrenium)Cl](2+)-modified DNA:rates of –linking reactions in cis-platinum-modified DNA, *Nucleic Acids Res.*, 21, 5846-5851.
- Perez de Castro, I., de Carcer, G., Malumbres, M., 2007, A census of mitotic cancer genes: new insights into tumor cell biology and cancer therapy, *Carcinogenesis*, 28, 899–912.
- Petrović, M., Todorović D., 2016, Biochemical and Molecular Mechanisms of Action of Cisplatin in Cancer Cells, *Medicine and Biology*, 18 (1), 12-18.

- Pines, J., 1995, Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations, *Adv Cancer Res*, 66, 181-212.
- Plaimee, P., Weerapreeyakul, N., Barusrux, S., Johns, N.P., 2015, Melatonin potentiates cisplatin-induced apoptosis and cell cycle arrest in human lung adenocarcinoma cells, *Cell Prolif.*, 48 (1), 67-77.
- Prabhakaran, P., Hassiotou, F., Blancafort, P., Filgueira, L., 2013, Cisplatin induces differentiation of breast cancer cells, *Front Oncol.*, 3, 134.
- Proctor, R.N., 2001, Tobacco and the global lung cancer epidemic, *Nat Rev Cancer*, 1, 82–86.
- Qin, Q.P., Wang, S.L., Tan, M.X., Wang, Z.F., Huang, X.L., Wei, Q.M., Shi, B.B., Zou, B.Q., Liang, H., 2018, Synthesis and antitumor mechanisms of two novel platinum(II) complexes with 3-(2'-benzimidazolyl)-7-methoxycoumarin, *Metallomics*, 10 (8), 1160-1169.
- Račkauskas, R., Zhou, D., Ūselis, S., Strupas, K., Herr, I., Schemmer, P., 2017, Sulforaphane sensitizes human cholangiocarcinoma to cisplatin via the downregulation of anti-apoptotic proteins, *Oncol Rep.*, 37 (6), 3660-3666.
- Rathinam, R., Ghosh, S., Neumann, W.L., Jamesdaniel, S., 2015, Cisplatin-induced apoptosis in auditory, renal, and neuronal cells is associated with nitration and downregulation of LMO4, *Cell Death Discov.*, 1, 15052 .
- Reardon, J.T., Vaisman, A., Chaney, S.G., Sancar, A., 1999, Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-amine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts, *Cancer Res.*, 59, 3968-3971.
- Reardon. J.T., Sancar, A., 2005, Nucleotide excision repair, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 79, 183–235.
- Reyes, G.X., Schmidt, T.T., Kolodner, R.D., Hombauer, H., 2015, New insights into the mechanism of DNA mismatch repair, *Chromosoma*, 124, 443–62
- Salazar-Roa, M., Malumbres, M., 2017, Fueling the Cell Division Cycle, *Trends Cell Biol.*, 27 (1), 69-81.
- Sale, J.E., 2013, Translesion DNA synthesis and mutagenesis in eukaryotes, *Cold Spring Harb.*
- Satoh, T., Tatsuta, T., Sugawara, S., Hara, A., Hosono, M., 2017, Synergistic anti-tumor effect of bullfrog sialic acid-binding lectin and pemetrexed in malignant mesothelioma, *Oncotarget*, 8 (26), 42466-42477.
- Satyanarayana, A., Kaldis, P., 2009, Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms, *Oncogene*, 28 (33), 2925-39.
- Sawant, A., Floyd, A.M., Dangeti, M., Lei, W., Sobol, R.W., Patrick, S.M., 2017, Differential role of base excision repair proteins in mediating cisplatin cytotoxicity. *DNA Repair (Amst.)*, 51, 46-59.

- Scagliotti, G.V., Parikh, P., von Pawel, J., Biesma, B., Vansteenkiste, J., Manegold, C., Serwatowski, P., Gatzemeier, U., Digumarti, R., Zukin, M., Lee, J.S., Mellemaard, A., Park, K., Patil, S., Rolski, J., Goksel, T., de Marinis, F., Simms, L., Sugarman, K.P., Gandara, D., 2008, Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.*, 26, 3543–3551.
- Schafer, K.A., 1998, The cell cycle: a review. *Vet Path*, 35: 461-478.
- Schultz, R.M., Patel, V.F., Worzalla, J.F., Shih C., 1999, Role of thymidylate synthase in the antitumor activity of the multitargeted antifolate, LY231514, *Anticancer Res*, 19, 437-443.
- Serbes, U., Dağdeviren Özsöylemez, Ö., Özcan, G., 2016, Evaluation of paclitaxel effects in the pattern of expression of survival and apoptotic genes regulators in HeLa cells. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17, 1058-1067.
- Sherr, C.J., Bartek, J., 2016, Cell Cycle–Targeted Cancer Therapies, *Annual Review of Cancer Biology*, 1, 41-57.
- Sherr, C.J., McCormick, F., 2002, The RB and p53 pathways in cancer, *Cancer Cell* 2, 103–112.
- Shih, C., Chen, V.J., Gossett, L.S., Gates, S.B., MacKellar, W.C., Habeck, L.L., Shackelford, K.A., Mendelsohn, L.G., Soose, D.J., Patel, V.F., Andis, S.L., Bewley, J.R., Rayl, E.A., Moroson, B.A., Beardsley, G.P., Kohler, W., Ratnam, M., Schultz, R.M., 1997, LY231514, a pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-based antifolate that inhibits multiple folate-requiring enzymes, *Cancer Res*, 57, 1116-1123.
- Shiloh, Y., Ziv, Y., 2013, The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 14, 197–210.
- Siddik, Z.H., 2003, Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, *Oncogene*, 22, 7265-7279.
- Strebhardt, K., Ullrich, A., 2006, Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, 6, 321–30.
- Taylor, W.R., Stark, G.R., 2001, Regulation of the G2/M transition by p53, *Oncogene*, 20, 1803–1815.
- Teicher, B.A., Chen, V., Shih, C., Menon, K., Forler, P.A., Phares, V.G., Amsrud, T., 2000, Treatment regimens including the multitargeted antifolate LY231514 in human tumor xenografts, *Clin Cancer Res*, 6, 1016–1023.
- Temel, M.K., 2015, Sitotoksik kemoterapötiklerin yirminci yüzyıldaki gelişimi, *Türk Onkoloji Dergisi*, 30 (2), 96-108.
- Toft, N.J., Winton, D.J., Kelly, J., Howard, L.A., Dekker, M., te Riele, H., Arends, M.J., Wyllie, A.H., Margison, G.P., Clarke, A.R., 1999, Msh2 status modulates both apoptosis and

- mutation frequency in the murine small intestine, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 3911-3915.
- Tong, Y., Huang, H., Pan, H., 2015, Inhibition of MEK/ERK activation attenuates autophagy and potentiates pemetrexed-induced activity against HepG2 hepatocellular carcinoma cells, *Biochem Biophys Res Commun.*, 456, 86-91.
- Torre, L.A., Siegel, R.L., Jemal, A., 2016, Lung Cancer Statistics, *Adv Exp Med Biol.*, 893, 1-19.
- Tudzarova, S., Colombo, S.L., Stoeber, K., Carcamo, S., Williams, G.H., Moncada, S., 2011, Two ubiquitin ligases, APC/C-Cdh1 and SKP1-CUL1-F (SCF)-beta-TrCP, sequentially regulate glycolysis during the cell cycle, *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108 (13), 5278-83.
- Tundo, G.R., Sbardella, D., Ciaccio, C., De Pascali, S., Campanella, V., Cozza, P., Tarantino, U., Coletta, M., Fanizzi, F.P., Marini, S., 2015, Effect of cisplatin on proteasome activity, *J Inorg Biochem*, 153, 253-258.
- Ueki, A., Okuma, T., Hamamoto, S., Miki, Y., 2017, Therapeutic Effects of CT-guided Radiofrequency Ablation with Concurrent Platinum-Doublet Chemotherapy in a Rabbit VX2 Lung Tumor Model, *Radiology*, 283 (2), 391-398.
- Vaisman, A., Varchenko, M., Umar, A., Kunkel, T.A., Risinger, J.I., Barrett, J.C., Hamilton, T.C., Chaney, S.G., 1998, The role of hMLH1, hMSH3, and hMSH6 defects in cisplatin and oxaliplatin resistance: correlation with replicative bypass of platinum-DNA adducts, *Cancer Res*, 58, 3579-3585.
- Velez, M., Arango, B.A., Perez, C.A., Santos, E.S., 2012, Safety and efficacy of pemetrexed in maintenance therapy of non-small cell lung cancer, *Clin Med Insights Oncol.*, 6, 117-24.
- Velic, D., Couturier, A.M., Ferreira, M.T., Rodrigue, A., Poirier, G.G., Fleury, F., Masson, J.Y., 2015, DNA damage signalling and repair inhibitors: the long-sought-after Achilles' heel of cancer, *Biomolecules*, 5, 3204-59.
- Velma, V., Dasari, S.R., Tchounwou, P.B., 2016, Low Doses of Cisplatin Induce Gene Alterations, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia Cells, *Biomarker Insights*, 11, 113-121.
- Vermeulen, K., Berneman, Z.N., Van Bockstaele, D.R., 2003, Cell cycle and apoptosis, *Cell Prolif*, 36, 165-75.
- Visconti, R., Della Monica, R., Grieco, D., 2016, Cell cycle checkpoint in cancer: a therapeutically targetable double-edged sword, *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35, 153.
- Vlajinac, H., Sipetić-Grujčić, S., Janković, S., Marinković, J., Kocev, N., Marković-Denić, L., Bjegović, V., 2006, Burden of cancer in Serbia, *Croat Med J*, 47, 134-141.
- Vogelzang, N. J. Rusthoven, J.J., Symanowski, J., Denham, C., Kaukel, E., Ruffie, P., Gatzemeier, U., Boyer, M., Emri, S., Manegold, C., Niyikiza, C., Paoletti, P., 2003, Phase

- III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma, *J. Clin. Oncol.*, 21, 2636–2644.
- Wahl, G.M., Carr, A.M., 2001, The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53, *Nature Cell Biol.*, 3, E277–E286.
- Wenzel, E.S., Singh, A.T.K., 2018, Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer, *In Vivo*, 32 (1), 1-5.
- Wozniak, K., Blasiak, J., 2002, Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts, *Acta Biochim Pol.*, 49, 583-596.
- Xu, B., Kim, S.-T., Lim, D.-S., Kastan, M.B., 2002, Two molecularly distinct G(2)/M checkpoints are induced by ionizing irradiation, *Mol. Cell Biol.*, 22, 1049–1059.
- Xu, X., Zheng, Z., Jia, L., Suo, S., Liu, B., Shao, T., Tu, Q., Hua, Y., Xu, H., 2018, Overexpression of SMARCA2 or CAMK2D is associated with cisplatin resistance in human epithelial ovarian cancer, *Oncology Letters*, 16, 3796-3804.
- Yang, T., Zhao, P., Rong, Z., Li, B., Xue, H., You, J., He, C., Li, W., He, X., Lee, R.J., Ma, X., Xiang, G., 2016, Anti-tumor Efficiency of Lipid-coated Cisplatin Nanoparticles Co-loaded with MicroRNA-375, *Theranostics*, 6 (1), 142-54.
- Yang, T.Y., Chang, G.C., Chen, K.C., Hung, H.W., Hsu, K.H., Sheu, G.T., Hsu, S.L., 2011, Sustained activation of ERK and Cdk2/cyclin-A signaling pathway by pemetrexed leading to S-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells, *Eur J Pharmacol.*, 663 (1-3), 17-26.
- Yen, H.C., Tang, Y.C., Chen, F.Y., Chen, S.W., Majima, H.J., 2005, Enhancement of cisplatin-induced apoptosis and caspase 3 activation by depletion of mitochondrial DNA in a human osteosarcoma cell line, *Ann N Y Acad Sci.*, 1042, 516-522.
- Yu, J., Zhang, L., 2005, The transcriptional targets of p53 in apoptosis control, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331, 851-858.
- Zetterberg, A., Larsson, O., Wiman, K.G., 1995, What is the restriction point?, *Curr Opin in Cell Biol*, 7 (6), 835-842.
- Zhang, L., Li, Y., Qiao, L., Zhao, Y., Wei, Y., Li, Y., 2015, Protective effects of hepatic stellate cells against cisplatin-induced apoptosis in human hepatoma G2 cells, *Int J Oncol.*, 47 (2), 632-40.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Gizem Akman
Doğum Yeri	Fatih
Doğum Tarihi	12.01.1989
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0212 455 57 00/15104
E-Posta Adresi	gizem.akman@istanbul.edu.tr
Web Adresi	http://aves.istanbul.edu.tr/gizem.akman/



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji Bölümü
Mezuniyet Yılı	21.06.2011

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Radyobiyojoloji Programı

Doktora	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji Anabilim Dalı
Programı	Genel Biyoloji Programı

Makale ve Bildiriler
Makaleler: Özcan, F.G., Dağdeviren, Ö., Akman, G., Khalilia, W., Tezel, B. , Karagöz, A., Melikoğlu, G., Anıl, S., Kültür, Ş., Sütlüpmar, N., 2016, Screening for antitumour activity of various plant extracts on HeLa and C 4-I cell lines, <i>Journal Of BUON</i>, 21, 13-24. Özcan Arican, F.G., Khalilia, W. , Serbes, U., Akman, G., Çetin, İ., Arican, E., 2014, The Effect Of Hypobaric Conditions On The Apoptosis Signalling Pathways In Hela Cells, <i>Asian Pacific Journal Of Cancer Prevention</i>, 15, 20-28. Gerçek, Y.C., Akman, G., Morgil, H., Çalışkan, M., Öz, G., 2017, Organosulfur Compounds Of Allium Tuncelianum (Kollmann) Ozhatay, B.Mathew & Şiraneci

Extracts By Spme/Gc-Ms And Determining Their Cytotoxic Effect On HeLa Cells, *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology*, 5, 53-58.

Bildiriler:

Özcan, F.G., Dağdeviren, Özsöylemez O., Akman, G., Şahin, A.M., 2018, Anti-Proliferative Effects of Hypobaric Stress Conditions in Normal Cells, *II. International Symposium on Multidisciplinary Academics Studies*, 16-17 Kasım 2018, İstanbul, Türkiye, 343-350.

Özcan, F.G., Akman, G., Khalilia, W., 2017, C-4 I Hücreleri Üzerine Hipobarik Stres Koşullarının Antiproliferatif Etkisi, *Uluslararası Multidisipliner Çalışmaları Kongresi*, Antalya, Türkiye, 25-26 Kasım 2017, 78-78.

Özcan, F. G., Dağdeviren Özsöylemez, O., Akman, G., Khalilia, W., 2017, Çeşitli Bitki Ekstrelerinin Hücre Kültüründe Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması, *Uluslararası Multidisipliner Çalışmaları Kongresi*, Antalya, Türkiye, 25-26 Kasım 2017, 79-79.

Özcan, F. G., Dağdeviren Özsöylemez, O., Akman, G., Khalilia, W., 2017, Anticancer Activity Of Colchicum Sanguicolle In Hela And C-4 I Cells, *Uluslararası Multidisipliner Çalışmaları Kongresi*, Antalya, Türkiye, 25-26 Kasım 2017, 197-197.

Akman, G., Karaçam, S., Özcan, F.G., 2017, The Effects of Gamma Radiation and Hypobaric Conditions and Investigation of CDK Genes Expression In vitro, *VI. International Congress of Molecular Medicine*, İstanbul, Türkiye, 22-25 Mayıs 2017, 196-196.

Özcan, F.G., Khalilia, W., Serbes, U., Akman, G., Çetin, İ., Arican, E., 2017, Antiproliferative Activity of Hypobaric Conditions and Evaluation of Bcl-2 Gene Expression on HeLa Cells, *VI. International Congress of Molecular Medicine*, İstanbul, Türkiye, 22-25 Mayıs 2017, 198-198.

Akman, G., Karaçam, S., Özcan Arican, F.G., 2014, Gama Radyasyonu Ve Hipobarik Stres Koşulları Altındaki Hela Hücrelerinde Siklin Bağımlı Kinaz Genlerinin Anlatımının Araştırılması, *22. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Eskişehir, Türkiye, 23-27 Haziran 2014, 301-301.

Özcan Arican, F.G., Khalilia, W., Serbes, U., Akman, G., Çetin, İ., Arican E., 2012, Düşük Basınç (Hipobarik) Koşullarının Doku Kültüründe Anti-Proliferatif Ve Apoptotik Etkilerinin Moleküler Mekanizmalarının Araştırılması, *21. Ulusal Biyoloji Kongresi*, İzmir, Türkiye, 3-7 Eylül 2012, 1333-1333.