

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**NCI-H1975 (P53-MUTANT) VE A549 (P53-VAHŞİ TİP) KÜÇÜK HÜCRELİ
DIŞI AKCİĞER KANSERİ (NSCLC) HÜCRELERİNDE, PRİMA-1^{met} VE
ETOPOSİDE KOMBİNASYONUNUN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Fatma T. KAHRAMAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2020

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ**



**NCI-H1975 (P53-MUTANT) VE A549 (P53-VAHŞİ TİP) KÜÇÜK HÜCRELİ
DIŞI AKCİĞER KANSERİ (NSCLC) HÜCRELERİNDE, PRİMA-1^{met} VE
ETOPOSİDE KOMBİNASYONUNUN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Fatma T. KAHRAMAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞUBAT 2020

ANTALYA

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

**NCI-H1975 (P53-MUTANT) VE A549 (P53-VAHŞİ TİP) KÜÇÜK HÜCRELİ
DIŞI AKCİĞER KANSERİ (NSCLC) HÜCRELERİNDE, PRİMA-1^{met} VE
ETOPOSİDE KOMBİNASYONUNUN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Fatma T. KAHRAMAN

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FYL-
2019-4600 nolu proje ile desteklenmiştir.**

ŞUBAT 2020

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NCI-H1975 (p53-MUTANT) VE A549 (p53-VAHŞİ TİP) KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI
AKCİĞER KANSERİ (NSCLC) HÜCRELERİNDE, PRİMA-1^{met} VE
ETOPOSİDE KOMBİNASYONUNUN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Fatma T. KAHRAMAN

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 10/02/2020 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer İMİR (Danışman)

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Dr. Öğr. Üyesi Dilara YILDIZ

ÖZET

NCI-H1975 (P53-MUTANT) VE A549 (P53-VAHŞİ TİP) KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ (NSCLC) HÜCRELERİNDE, PRİMA-1^{met} VE ETOPOSİDE KOMBİNASYONUNUN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Fatma T. KAHRAMAN

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer İMİR

Şubat 2020; 69 sayfa

Kanser her yıl artan vakalarla oldukça yaygın bir hastalıktır. Mevcut kemoterapi tedavisinde artan başarı oranıyla çok sayıda kanser tedavisinde ilerleme kaydedilmesine rağmen kemoterapi ile ilişkili yan etkiler ve kemoterapötik ilaca karşı oluşan direnç kemoterapiye alternatif yeni tedavilerin araştırılması için yenilik ihtiyacını ortaya koymuştur. Bu nedenle, kemoterapi farklı kanser tedavileri ile kombine edilmektedir. Ayrıca, kişiye ve tümöre özel ilaç hedefleme terapileri, apoptozis yolağını hedeflemesi nedeniyle birçok potansiyel alternatif tedaviler arasından tercih edilmektedir.

Tümör baskılayıcı protein, p53, hücre döngüsünün ve apoptozun kontrolüne ve hücre genomik bütünlüğünün düzenlenmesine katılan bir transkripsiyon faktörüdür. P53 proteini, mutasyona uğramış ya da hasar gören DNA'ların bölünmesini engelleyerek tümörlerin gelişimini önlemeye yardımcı olur. P53, hücre bölünmesini düzenleme ve tümör oluşumunu önleme açısından çok önemli olduğu için genomun gardiyanı olarak adlandırılır ve solid tümörlerde en sık mutasyona uğrayan tümör baskılayıcı proteindir. Mutant-p53 geç dönem malignite ve ilaç direnci ile yüksek derecede ilişkili olduğundan yeni kanser tedavilerinin geliştirilmesinde potansiyel bir hedef olarak görülmüştür. Bu sebeple mutant-p53'ün farmakolojik olarak reaktivasyonu, gelişen kanser tedavileri için umut verici bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. PRİMA-1^{met}'in, vahşi tip (wild type) fonksiyonların mutant p53'e geri kazandırılmasında klinik kullanım için en umut verici ilaçlardan biri olarak tanımlanmıştır.

Bugüne kadar yapılan kombinasyon terapisi çalışmalarında, kemoterapötik ilaçlarla mutant-p53 seviyelerinin indüksiyonunun, tümör hücrelerinin PRİMA-1^{met}'e duyarlılığını artırması olasılığını göstermiştir. Dolayısıyla, PRİMA-1^{met}'in hali hazırda kullanılan kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonu, mutant p53 taşıyan tümörlerin tedavisi için yeni ve daha etkili bir terapötik stratejiyi temsil edebilir.

Literatürden elde edilen tüm bu bilgilere dayanarak, bu tez çalışmasında, TP53 mutasyonları taşıyan NCI-H1975 (p53-mutant) ve TP53 mutasyonu taşımayan A549 (p53-vahşi tip) insan NSCLC (Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri) hücre hatlarında,

antineoplastik bir ilaç olan Etoposide ile birlikte, NSCLC’de henüz klinik çalışmaları bulunmayan PRİMA-1^{met}’in antikanser etkisinin *in-vitro* olarak araştırılması hedeflenmiştir. Bunun için öncelikle PRİMA-1^{met} ve Etoposide’nin tek başlarına sitotoksik etkisi değerlendirildi. Ardından, Etoposide’nin 24. saatte etkin olan dozlarından 20 ve 40 µM’lık dozları seçilerek PRİMA-1^{met} dozları ile kombinasyonun sitotoksik etkileri değerlendirildi. A549 ve NCI-H1975 hücrelerinde Etoposide uygulamasının PRİMA-1^{met} etkinliğini artırdığı gözlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: A549, Etoposide, Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, NCI-H1975, PRİMA-1^{met}, Sitotoksite, TP53

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer İMİR

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Dr. Öğr. Üyesi Dilara YILDIZ

ABSTRACT

CYTOTOXICITY EFFECTS OF COMBINATION OF PRIMA-1^{met} AND ETOPOSIDE ON NON-SMALL CELL LUNG CANCER (NSCLC) CELL LINES A549 (WILD TYPE-P53) AND NCI-H1975 (MUTANT-P53)

Fatma T. KAHRAMAN

MSc Thesis in Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Nilüfer İMİR

February 2020; 69 pages

Cancer is a common disease with increasing cases each year. Although progression has been made in many cancer treatments with an increasing success rate in the current chemotherapy treatment, the side effects associated with chemotherapy and resistance to the chemotherapeutic drug have demonstrated the need for novelty to investigate new treatments alternative to chemotherapy. Therefore, chemotherapy is combined with different cancer treatments. In addition, individual and tumor specific drug targeting therapies are preferred among many potential alternative therapies because they target the pathway of apoptosis.

The tumor suppressor protein, p53, is a transcription factor involved in controlling cell cycle and apoptosis and regulating cell genomic integrity. P53 protein helps prevent the development of tumors by preventing the division of mutated or damaged DNA. P53 is called the guardian of the genome because it is crucial for regulating cell division and preventing tumor formation, and is the most frequently mutated tumor suppressor protein in solid tumors. Since mutant p53 is highly associated with late-stage malignancy and drug resistance, it has been considered a potential target for the development of new cancer therapies. Therefore, pharmacological reactivation of mutant-p53 has emerged as a promising strategy for developing cancer therapies. PRIMA-1^{met} has been described as one of the most promising drugs for clinical use in restoring wild type functions to mutant p53.

In combination therapy studies to date, induction of mutant-p53 levels with chemotherapeutic drugs has shown the possibility of increasing the sensitivity of tumor cells to PRIMA-1^{met}. Thus, the combination of PRIMA-1^{met} with currently used chemotherapeutic drugs may represent a new and more effective therapeutic strategy for the treatment of mutant p53-carrying tumors.

Based on all the information obtained from the literature, in this thesis, it was aimed to investigate the anticancer effect of PRIMA-1^{met} with Etoposide, a chemotherapeutic drug, in NCI-H1975 (p53-mutant) and A549 (p53-wild type) human NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) cell lines.

Firstly, the cytotoxic effect of PRIMA-1^{met} and Etoposide alone was evaluated. Subsequently, doses of 20 and 40 µM were selected from the effective doses of Etoposide at 24 h and the cytotoxic effects of their combination with Prima-1met doses were evaluated. It was observed that treatment of etoposide increased the efficacy of PRIMA-1^{met} in A549 and NCI-H1975 cells.

KEYWORDS: A549, Cytotoxicity, NCI-H1975, Non-small cell lung cancer, PRIMA-1^{met}, TP53

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Nilüfer İMİR

Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN

Asst. Prof. Dr. Dilara YILDIZ



ÖNSÖZ

TP53, insan kanserlerinde sıklıkla mutasyona uğrayan en önemli tümör baskılayıcı genlerden biridir. Mutant-p53 taşıyan tümörler genellikle kemoterapötik ilaçlara karşı daha dirençlidir. Tüm kanserlerin neredeyse %50 'sinde *p53* mutasyonu görülmekle beraber akciğer kanseri çeşitlerinde bu oran %90'a kadar çıkmaktadır. Bu sebeple *p53* kanser tedavisinde cazip bir hedef olarak görülmektedir. Bu *p53*-hedefli tedavilerin bazıları klinik denemelere girmiştir ve bunlardan biri PRİMA-1^{met} 'dir.

Bu çalışmada tümör hücrelerini inhibe etmek için, *p53*'ü yeniden aktive eden bileşik PRİMA-1^{met} ile kemoterapötik ilaç Etoposide kombinasyonu'nun Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanser'li hücre hatlarında sitotoksik etkisi gösterildi.

Öncelikle böyle kapsamlı bir çalışma ile bana yüksek lisans yapabilme fırsatı sunan, görüş ve önerileriyle tez çalışmasına yön veren ve tez çalışmasının tüm aşamalarında yaptığı katkılarla desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışmanım sayın Dr. Öğr. Üyesi Nilüfer İMİR'e;

Yüksek Lisans ders döneminde Kanser Moleküler Biyolojisi ve Genetiği üzerine tüm derslerini alarak bilgisinden ziyadesiyle yararlandığım, bu alanda ufku açan kıymetli hocam Prof. Dr. Kayahan FIŞKIN'a, ayrıca deneysel süreçlerde sağladığı laboratuvar koşulları için Doç. Dr. Esra AYDEMİR'e ve bölümde derslerini aldığım diğer hocalarıma;

Eğitim döneminde tanıştığım, benimle her daim bilgisini paylaşan, gittiğim yolda tüm heyecan ve üzüntülerimde dostluğunu benden hiçbir zaman esirgemeyen değerli meslektaşım ve sevgili kardeşim Orhan KOÇAK'a;

Eğitimim süresince beni destekleyen ve göstermiş olduğu anlayışla bana zaman kazandıran Daire Başkanım Dr. Öğr. Üyesi Tayfun YÖRÜK'e, bana yol gösteren Fen Bilimleri Enstitüsü'nün güleryüzlü tüm çalışanlarına ve özellikle Enstitü Müdür Yardımcısı Prof. Dr. Mustafa ALKAN hocama;

Bu süreçte ne zaman kapılarını çalsam hep açık bulduğum, dostluklarıyla beslendiğim canım arkadaşlarım Nevin TERCAN, Necla ÖZKAN ve İlter ÖZCAN'a;

Manevi desteğiyle her zaman yanımda olan sevgili ablam Süheyla AVDAN ve bugünlerimin mimarı annem Hatice T. KAHRAMAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tezi; bu süreçte kaybettiğim ancak varlığını kalbimde her daim hissettiğim, sevgisinin onsuzken de sonsuz olduğu kıymetli babam merhum Kadir T. KAHRAMAN'a atfediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. Kanser ve P53.....	4
2.2. Akciğer Kanseri.....	13
2.3. Kanser Tedavileri	14
2.3.1. Kemoterapi	15
2.3.1.1. Etoposide	16
2.3.2. Hedefe Yönelik Tedaviler ve Terapötik Bir Hedef Olarak Mutant-p53.....	17
2.3.2.1. Mutant-p53'ü Reaktif Eden İlaçlar	20
2.3.2.2. PRİMA-1 ^{met} ve Moleküler Mekanizması.....	23
2.3.3. Kombine Tedaviler ve PRİMA-1 ^{met} ile Kemoterapötik İlaçların Sinerjisi. .	26
3. MATERYAL VE METOT	30
3.1. Hücre Kültürü.....	30
3.1.1. Hücreler ve inkübasyon koşulları	30
3.1.2. Besiyerlerinin hazırlanması	31
3.1.2.1. %10 FBS içeren besiyeri hazırlanması	31
3.1.2.2. %1 FBS içeren besiyeri hazırlanması	31
3.1.3. Hücrelerin tripsinasyonu ve pasajlanmaları.....	31
3.1.4. Hücrelerin dondurulma işlemleri.....	32
3.1.4.1. Dondurma mediumu hazırlanması.....	32
3.2. Hücre Sayılarının Belirlenmesi ve Hücrelerin Deney Grupları İçin Bölünmesi.....	32
3.2.1. Hücrelerin sitotoksik deneyleri için 96 kuyucuklu steril plaklara bölünmesi.....	33

3.2.2. Hücrelerin tripan mavisi testi için petrilere bölünmesi.....	33
3.3. İlaç Dozlarının Belirlenmesi ve Uygulanması	34
3.3.1. Etoposide ve PRİMA-1 ^{met} dozlarının hazırlanması ve uygulanması	34
3.3.2. Etoposide ve PRİMA-1 ^{met} kombinasyonlarının uygulanması	35
3.4. WST-1 Hücre Proliferasyon Testi Uygulanması.....	35
3.5. Tripan Mavisi'yle mL'deki Canlı ve Ölü Hücre Sayılarının Belirlenmesi	36
3.6. İstatistiksel Analizler	36
4. BULGULAR.....	38
4.1. PRİMA-1 ^{met} 'in A549 Hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine ilişkin bulgular..	38
4.2. Etoposide'nin A549 Hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisine ilişkin bulgular...	42
4.3. PRİMA-1 ^{met} ve Etoposide Kombinasyonunun A549 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisine İlişkin Bulgular	47
4.4. PRİMA-1 ^{met} 'in NCI-H1975 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisine İlişkin Bulgular.....	49
4.5. Etoposide'nin NCI-H1975 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisine İlişkin Bulgular	52
4.6. PRİMA-1 ^{met} ve Etoposide Kombinasyonunun NCI-H1975 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisine İlişkin Bulgular	54
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇLAR	61
7. KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “NCI-H1975 (p53-Mutant) ve A549 (p53-Vahşi Tip) Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (NSCLC) Hücrelerinde, PRIMA-1^{met} ve Etoposide Kombinasyonunun Sitotoksik Etkisinin Araştırılması” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.



10/02/2020

Fatma T. KAHRAMAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	:Yüzde
°C	: Santigrad Derece
dk	: Dakika
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
mm	: Milimetre
mm ³	: Milimetreküp
®	: Tescil Edildi
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
OD	: Optik Dansite
™	: Tescilli Marka

Bu tez kapsamında ondalık ayırıcı olarak virgül (,) kullanılmıştır.

Kısaltmalar

A549	: Akciğer Kanseri Hücre Hattı (p53 Vahşi Tip)
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
ATM	: Ataksi Telenjektazi Geni Mutasyonu
Bcl-2	: B Hücreli Lenfoma 2/Antiapoptik Protein
BRAF	: RAF Kinaz Ailesi Üyesi
BRCA	: Göğüs Kanseri Duyarlılık Geni
Cyt-c	: Sitokrom C
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagles Medium

DN	: Dominant-Negatif Etki
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
ECM	: Ekstraselüler Matriks
Erk	: Ekstraselüler Sinyal Düzenlenleyici Kinaz
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
ER	: Endoplazmik Retikulum
FBS	: Fetal Bovine Serum
GOF	: Gain Of Function/Fonksiyon Kazanımı
GSH	: Glutatyon
LOF	: Loss of Function/Fonksiyon Kaybı
PRİMA	: p53 Reaktivasyonu ve Masif Apoptoz İndüksiyonu
RB	: Retinoblastoma Tümör Baskılayıcı Geni
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RNA	: Ribonükleik Asit
M.Ö.	: Milattan Önce
MQ	: Michael Akseptör/Metilen Küniklidinon
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NCI-H1975	: Akciğer Kanseri Hücre Hattı (p53 Mutant)
NSCLC	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
SCLC	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
SCID	: Ağır Kombine İmmün Yetmezlik
TCGA	: Kanser Genom Atlası
TrxR	: Tioredoksinin Redüktaz
WT	: Vahşi Tip

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kolon kanserinde moleküler düzeyde çok aşamalı gidiş.....	5
Şekil 2.2. Kanser hücrelerinin on temel özelliği.....	7
Şekil 2.3. Ekzom sekanslama kullanılarak analiz edilen 24 kanser genomunda TP53 mutasyonunun sıklığı	8
Şekil 2.4. İnsan p53 proteininin şematik yapısı	9
Şekil 2.5. p53 aktivasyonu ve hücre fonksiyonları	10
Şekil 2.6. p53 apoptoz yolağı.....	11
Şekil 2.7. Kanser tedavisi yöntemleri	14
Şekil 2.8. Kemoterapide kullanılan antikanser ilaçlar	15
Şekil 2.9. Etoposide	16
Şekil 2.10. Baskın-negatif etki ve ifade edilen vahşi tip-p53 proteini ve mutant p53 protein varyantları	18
Şekil 2.11. Küçük moleküller ile mutant-p53 reaktivasyonunun genel stratejisi ..	20
Şekil 2.12. PRİMA-1, p53'ün apoptotik fonksiyonunu yeniden aktive eder	23
Şekil 2.13. Bağlandığı proteini stabilize eden ilaçlar için mutant proteinin özündeki cepler	24
Şekil 2.14. PRİMA-1 ve PRİMA-1 ^{met} 'in kimyasal yapıları	25
Şekil 2.15. Sisplatin ve PRİMA-1 ^{met} ile tedavi edilen SCID farelerindeki H1299-His175 insan tümör ksenograftları için büyüme kinetiği	27
Şekil 2.16. PRİMA-1 ^{met} ve kemoterapötikler arasındaki sinerji.....	28
Şekil 3.1. A549 hücrelerinin 20X objektifteki morfolojisi	30
Şekil 3.2. NCI-H1975 hücrelerinin 20X objektifteki morfolojisi	30
Şekil 3.3. Thoma lamı yöntemi	33
Şekil 4.1. Prima-1 ^{met} 'in 24. saatteki absorbands değerleri	38
Şekil 4.2. PRİMA-1 ^{met} 'in 24. saatteki hücre canlılığına etkisi	39
Şekil 4.3. PRİMA-1 ^{met} 'in 48. saatteki absorbands değerleri	40
Şekil 4.4. PRİMA-1 ^{met} 'in 48. saatteki hücre canlılığına etkisi	40

Şekil 4.5. PRİMA-1 ^{met} 'in 72. saatteki absorbans değerleri	41
Şekil 4.6. PRİMA-1 ^{met} 'in 72. saatteki hücre canlılığına etkisi	42
Şekil 4.7. Etoposide'nin 24. saatteki absorbans değerleri	43
Şekil 4.8. Etoposide'nin 24. saatteki hücre canlılığına etkisi	43
Şekil 4.9. Etoposide'nin 48. saatteki absorbans değerleri	44
Şekil 4.10. Etoposide'nin 48. saatteki hücre canlılığına etkisi	45
Şekil 4.11. Etoposide'nin 72. saatteki absorbans değerleri	46
Şekil 4.12. Etoposide'nin 72. saatteki hücre canlılığına etkisi	46
Şekil 4.13. PRİMA-1 ^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının 24. saatteki hücre canlılığına etkisi	48
Şekil 4.14. PRİMA-1 ^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının 48. saatteki hücre canlılığına etkisi	48
Şekil 4.15. PRİMA-1 ^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının 72. saatteki hücre canlılığına etkisi	49
Şekil 4.16. PRİMA-1 ^{met} 'in 24. saatteki hücre canlılığına etkisi (NCI-H1975)	50
Şekil 4.17. PRİMA-1 ^{met} 'in 48. saatteki hücre canlılığına etkisi (NCI-H1975)	51
Şekil 4.18. PRİMA-1 ^{met} 'in 72. saatteki hücre canlılığına etkisi (NCI-H1975)	51
Şekil 4.19. Etoposide'nin 24. saatteki hücre canlılığına etkisi (NCI-H1975)	52
Şekil 4.20. Etoposide'nin 48. saatteki hücre canlılığına etkisi (NCI-H1975)	53
Şekil 4.21. Etoposide'nin 72. saatteki hücre canlılığına etkisi (NCI-H1975)	53
Şekil 4.22. PRİMA-1 ^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının 24. saatteki hücre canlılığına etkisi (NCI-H1975)	55
Şekil 4.23. PRİMA-1 ^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının 48. saatteki hücre canlılığına etkisi (NCI-H1975)	55
Şekil 4.24. PRİMA-1 ^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının 72. saatteki hücre canlılığına etkisi (NCI-H1975)	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. p53 hedefli inceleme altındaki ajanlar	21
Çizelge 3.1. Plaklardaki doz grupları.....	34
Çizelge 3.2. Plaklardaki kombinasyon grupları.....	35
Çizelge 3.3. Tripan mavisi testi için petrilerin gruplandırılması	36
Çizelge 5.1. PRIMA-1 ^{met} 'in istatistiksel olarak elde edilen hücre canlılığına etkisindeki anlamlı değerleri	58
Çizelge 5.2. Etoposide'nin istatistiksel olarak elde edilen hücre canlılığına etkisindeki anlamlı değerleri	59
Çizelge 5.3. Kombine dozların istatistiksel olarak elde edilen hücre canlılığına etkisindeki anlamlı değerleri	59

1. GİRİŞ

Kanser her yıl artan vakalarla oldukça yaygın bir hastalıktır. Mevcut kemoterapi tedavisinde artan başarı oranıyla çok sayıda kanser tedavisinde ilerleme kaydedilmiştir. Ancak bu gelişmeye rağmen kemoterapi ile ilişkili olan ızdıraplı yan etkiler ve en önemlisi kanser hücrelerinin kullanılan kemoterapötik ilaca karşı direnç geliştirmesi kemoterapiye alternatif yeni tedavilerin araştırılması için yenilik ihtiyacını ortaya koymuştur. Söz konusu direncin ortadan kaldırılması ve yan etkilerin azaltılarak tedavi etkinliğinin artırılması için kemoterapi, farklı kanser tedavileri ile kombine edilmektedir. Kişiyi ve tümöre özel yaklaşımlardan ilaç hedefleme terapileri, apoptozis yolağını hedeflemesi nedeniyle birçok potansiyel alternatif tedaviler arasından tercih edilmektedir.

Tümör baskılayıcı protein, p53, hücre döngüsünün ve apoptozun kontrolüne ve hücre genomik bütünlüğünün düzenlenmesine katılan bir transkripsiyon faktörüdür, *TP53* geni tarafından kodlanılır. P53 proteinini, doğrudan DNA'ya bağlıdır ve vücudumuzdaki her hücrenin çekirdeğinde bulunur. Mutasyona uğramış ya da hasar gören DNA'ların bölünmesini engelleyerek tümörlerin gelişimini önlemeye yardımcı olur. P53, hücre bölünmesini düzenleme ve tümör oluşumunu önleme açısından çok önemli olduğu için DNA'nın koruyucusu olarak adlandırılmıştır (Ananiev vd 2011). P53, solid tümörlerde en sık mutasyona uğramış proteindir. Kanser Genom Atlası (TCGA) ekson sekanslama ile analiz edilen 24 kanser genomunda; kanserde *TP53* mutasyonlarının yüksek frekansını teyit etmiştir (Robles vd 2015). Vahşi tip (WT) p53'ün genomik stabilitenin korunması ve onkogenezin önlenmesinde kritik bir rolü olduğundan, kodlayıcı geni olan *TP53*, insan kanserlerinin yaklaşık % 50'sinde yüksek oranda mutasyona uğrar ve diğer kanserlerde ise etkinliği neredeyse yok olmuştur. Bu mutasyonlar, moleküler bozulma tipine ve WT-p53 proteinindeki biyolojik sonuçlara dayanarak geniş bir şekilde kategorize edilebilir. *TP53* mutasyonları, tümör baskılayıcı fonksiyonun kaybolmasına (Loss of Function-LOF) neden olabilir veya mutant- p53'ün WT-p53 proteinini ile bir heterodimer oluşturmaya ve aktivitesini bloke etmesine yol açmanın yanı sıra protein üzerinde downstream efektör proteinler ile farklı şekilde etkileşime girmesini sağlayan ve 'fonksiyon kazanma' (Gain of Function-GOF) olarak adlandırılan tamamen yeni, DNA hedef dizilerini bağlayan yapısal onkojenik bir değişiklik meydana getirir. Mutant p53 tarafından kazanılan onkojenik aktiviteler arasında artmış proliferasyon, artmış metastatik potansiyel ve spesifik tedavilere direnç kazanımı bulunur. Mutant p53'ün GOF'si, geç dönem malignite ve ilaç direnci ile yüksek derecede ilişkili olduğundan yeni kanser tedavilerinin geliştirilmesinde mutant-p53 potansiyel bir hedef olarak görülmüştür. Bu sebeple mutant-p53'ün farmakolojik olarak reaktivasyonu, gelişen kanser tedavileri için umut verici bir strateji olarak ortaya çıkmıştır (Biegging vd, 2014, Robles vd 2016, Zou vd 2019).

Mutant-p53 taşıyan tümörler genellikle kemoterapötik ilaçlara karşı daha fazla direnç gösterir (Mohell vd 2010). Kanser tedavilerinde, oluşan bu direncin üstesinden

gelmek için geleneksel anti-neoplastik ajanlar ile kombine edilmiş çeşitli moleküler hedefleme terapileri geliştirilmektedir. Bunlardan en yaygın olarak araştırılan PRİMA-1 ve PRİMA-1^{Met} dir. PRİMA-1 (p53 reaktivasyonu ve masif apoptoz indüksiyonu) ve onun metillenmiş türevi olan PRİMA-1^{Met} çeşitli kanser türlerinde mutant p53'ü, p53'ün wild type (vahşi tip) fonksiyonlarını geri kazanan aktif bir formuna dönüştürür (Aryee vd 2013). PRİMA-1^{Met}, wild type fonksiyonların mutant p53'e geri kazandırılmasında klinik kullanım için en umut verici ilaçlardan biridir (Mohell vd 2016).

PRİMA-1^{Met} mutant-p53'e tümör baskılayıcı fonksiyonunu geri kazandıran ve çeşitli kanser hücresi soylarında hücre ölümünü indükleyen eşsiz bir anti-onkojenik moleküldür. Son yirmi yılda, yaygın olarak mutasyona uğramış onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin tanımlanması, insan kanserinin genetik temelini anlamada benzeri görülmemiş bir büyüme sağlamıştır (Lane ve Hubb 2003, Bykov vd 2002).

Yapılan çalışmalarda; sisplatin ve PRİMA-1^{Met} ile kombine tedavi tümör hücrelerinde apoptozunun sinerjik bir uyarımına ve SCID (ağır kombine immun yetmezlik) farelerinde *in vivo* olarak insan tümör büyümesinin inhibe edilmesine neden olmuştur. Bu da göstermiştir ki; kemoterapötik ilaçlarla mutant-p53 seviyelerinin indüksiyonunun, tümör hücrelerinin PRİMA-1^{Met}'e duyarlılığını artırması olasıdır. Dolayısıyla, PRİMA-1^{Met} 'in hali hazırda kullanılan kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonu, mutant p53 taşıyan tümörlerin tedavisi için yeni ve daha etkili bir terapötik stratejiyi temsil edebilir (Bykov vd 2005)

Bugüne kadar, bu bileşiklerden ikisi, PRİMA-1^{Met} ve COTI-2 klinik deneme aşamasına kadar ilerlemiştir. PRİMA-1^{Met} ile yapılan bir faz I/IIa klinik çalışmasında önemli bir yan etki bildirilmemiştir. Halen PRİMA-1^{Met}, ileri seröz over kanseri olan hastalarda faz Ib/II denemesinde, COTI-2 ise ileri jinekolojik kanserli hastalarda evre I denemesinde değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, herhangi bir mutant-p53 reaktifleştirici bileşiğin, insan kanserinin tedavisi için etkinliği olup olmadığı gösterilmemiştir (Duffy vd 2017). Literatür taramaları; PRİMA-1^{Met}'in akciğer, over, meme, prostat, özafagus kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde tümör hücresi büyümesini inhibe etmek için çeşitli kemoterapötik ajanlar ile sinerji veya güçlü sinerji oluşturduğunu göstermektedir (Liu vd 2015, Mohell vd 2015, Bykov vd 2016, Franson vd 2016, Synnot vd 2017).

Dünya Sağlık Örgütü (2018) verilerine göre; akciğer kanseri, tüm dünyada hem erkek hem de kadınlarda kansere bağlı yaşam kaybının ilk nedenidir ve görülme sıklığı artmaya devam etmektedir. İnsan akciğer kanserleri; küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) olmak üzere başlıca iki tipte sınıflandırılır. İkincisi tüm primer akciğer kanserlerinin yaklaşık % 80'ini oluşturur ve NSCLC oranı her yıl artmaktadır (Mogi ve Kuwano 2011).

Yıllar boyunca, tek başına cerrahi, evre I-III NSCLC'li hastalar için standart tedavi olmuştur. Ancak tam rejeksiyona rağmen, 5 yıllık sağ kalım oranları çok düşük

olmakla beraber hastaların yaklaşık %50'sinde nüks etme ve ölümlle sonuçlanmaktadır. Daha sonra yapılan çalışmalar sitotoksik kemoterapinin, rejekte edilmiş NSCLC'li hastalarda sağ kalımı arttırdığını göstermiştir (Spira ve Ettinger 2004, Suehisa ve Toyooka 2009).

TP53 anormalliği, akciğer kanserlerinde en önemli olaylardan biridir ve akciğer epitel hücrelerinin tümör oluşumunda önemli bir rol oynar. Ayrıca, yapılan klinik çalışmalar, *TP53* değişikliklerine sahip NSCLC'nin hem daha kötü bir prognoz taşıdığını hem de kemoterapiye karşı nispeten daha dirençli olabileceğini göstermektedir (Joseph vd 2001, Kaufmann ve Vaux 2003, Mogi ve Kuwano 2011); ki bu da tedavinin başarısızlığına ve tümörün nüksetmesine neden olmaktadır (Deben vd 2018).

Etoposide intravenöz yoldan kullanılan bir antineoplastik ajandır. Tek başına veya diğer sitotoksik ajanlarla kombine şekilde kullanılabilir. Etoposide ile kombinasyon halinde PRIMA-1^{met} ile tedavi, *TP53* mutasyonları taşıyan SCLC hücrelerinde sinerji veya güçlü sinerji ile sonuçlanmıştır (Mohell vd 2016). Ancak Etoposide ile kombinasyon halinde PRIMA-1^{met} tedavisinin NSCLC hücrelerindeki etkisi bilinmezliğini korumaktadır. Bu sebeple, tez çalışmasının temel hedefi; model olarak seçilen *TP53* mutasyonları taşıyan NCI-H1975 (p53-mutant) ve *TP53* mutasyonu taşımayan A549 (p53 wild type) insan NSCLC hücre hatlarında, Etoposide ile birlikte PRIMA-1^{met}'in antikanser etkisinin araştırılmasıdır. Bu bağlamda, tez kapsamında elde edilen bulgularla, PRIMA-1^{met} ile devam eden klinik çalışmalara güçlü bir destek sağlayarak, kanser alanında gerçekleştirilen çalışmalara özgün bir katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

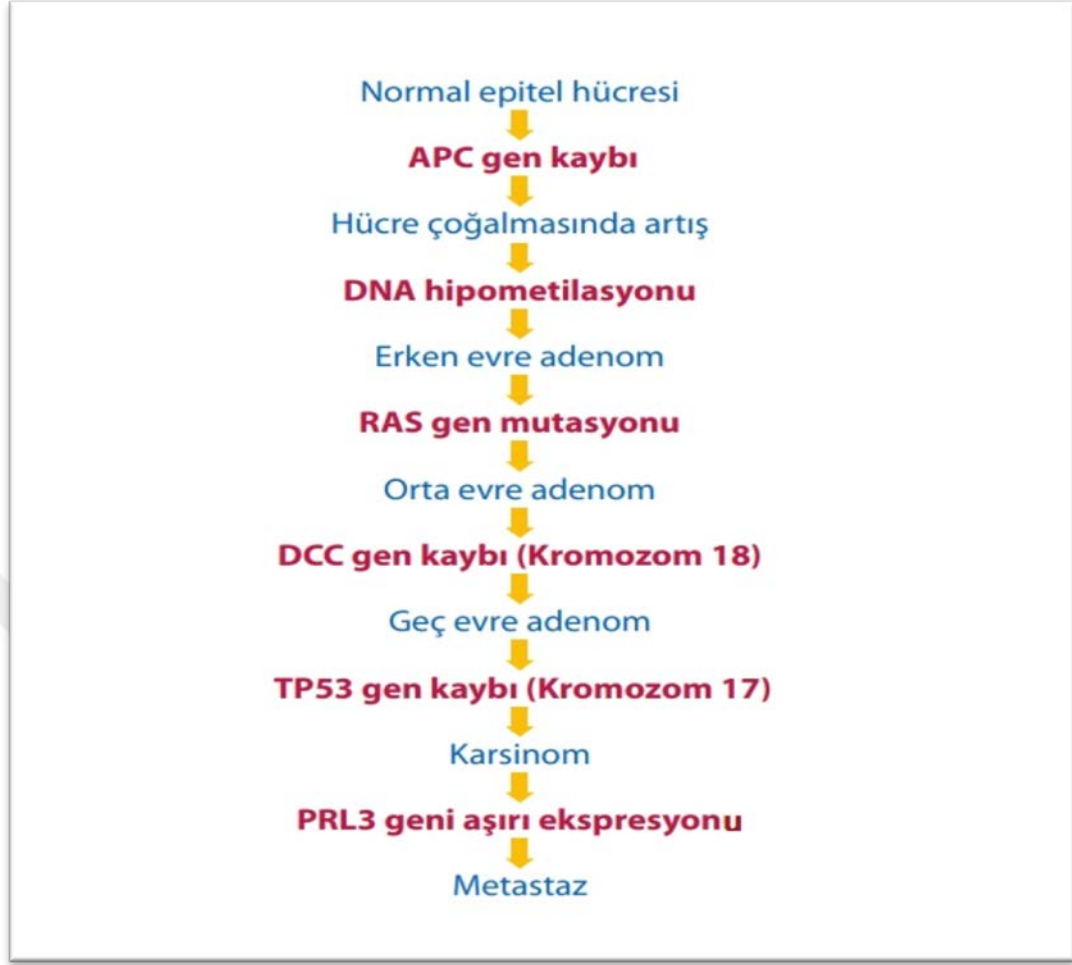
2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Kanser ve P53

Kanser terimi ilk defa Hipokrat tarafından (M.Ö. 460-377) organizmanın şifa bulmayan yeni yapılanmaları için kullanıldığı görülür. Bu yapılanmalara Hipokrat, “carcinos” ya da “carcinoma” demiştir. “Carcinos” Yunanca’da yengeç demektir ve Hipokrat da bu yapılanmanın etrafındaki şişmiş kan damarlarını yengecin bacaklarına benzeterek hastalığa bu adı vermiştir. Romalı hekim Celcus (M.Ö. 28-50) Hipokrat’ın bu terimini Latinceye çevirerek “cancer” demiştir. Bir başka Romalı hekim Galen ise (M.S. 129-200), oluşan tümörleri tanımlamak için Yunancada şişlik anlamına gelen “oncos” sözcüğünü kullanmıştır. Onkoloji olarak bildiğimiz, kanser hastalığını inceleyen bilim dalının adı buradan gelir (Mukherjee 2010).

Kanser çevrenin ve yaşlanmanın etkisiyle hücre çoğalmasını ve hücrelerin birbirleriyle olan ilişkilerini kontrol eden genlerdeki hasarların birikmesi sonucu hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi, çoğalması ve birikmesine neden olan hücresel düzeyde genetik bir hastalıktır. Kanser oluşum süreci çok basamaklı bir proses olarak tanımlanmaktadır.

Kanserin genetik temeli, bir asırdan daha önce, David von Hansemann’ın çeşitli karsinoma örneklerinden alınan hücrelerdeki kromozomal değişiklikleri gözlemlemesine dayanmaktadır. Yirminci yüzyılın başında Theodor Boveri, bu kromozomal sapmaların bir sonucu olarak kanserin genetik bir hastalık olarak kabul edilebileceği fikrini ileri sürdü. Ancak, genetik bir hastalık olarak kanser fikri o zaman çok yaygın olarak kabul edilmedi. Kansere genetik bir mutasyon neden olmuşsa, neden bir mutajenik maddeye maruz kalma ile kanserin başlangıcı arasında uzun yıllar boyunca bir gecikme olduğu ya da kanser sıklığının yaşla birlikte neden bu kadar arttığı açık değildi. Zamanla, tek bir gen kusurunun kansere neden olmadığı ve kanserin gelişmesi için çeşitli birçok mutasyonların gerekli olabileceği gözlemleri, uzun latent kanser periyodunu ve bu hastalığın yaş dağılımını açıkladı. Yirminci yüzyılın ikinci yarısında, kanser gelişiminin birçok mutasyonun edinilmesini gerektirdiği fikri geniş çapta kabul görmeye başlamış ve hangi genlerin kanserleşme sürecinde diğer bir ifadeyle karsinogenezde yer aldığının belirlenmesi için çabalar gösterilmiştir (Lopez-Lazaro 2010). Örneğin Şekil 2.1’de belirtildiği gibi normal bir kolon epitel hücresinin karsinom özelliğini kazanabilmesi ve metastaz yapabilme yeteneğini kazanması bir dizi mutasyona bağlıdır. Normalde bu süreç uzun yıllar alabilmektedir. Ancak DNA tamir genlerindeki mutasyona bağlı olarak genomik instabilite gelişirse söz konusu olaylar dizisi hızlanabilir (Adkison ve Brown 2007).



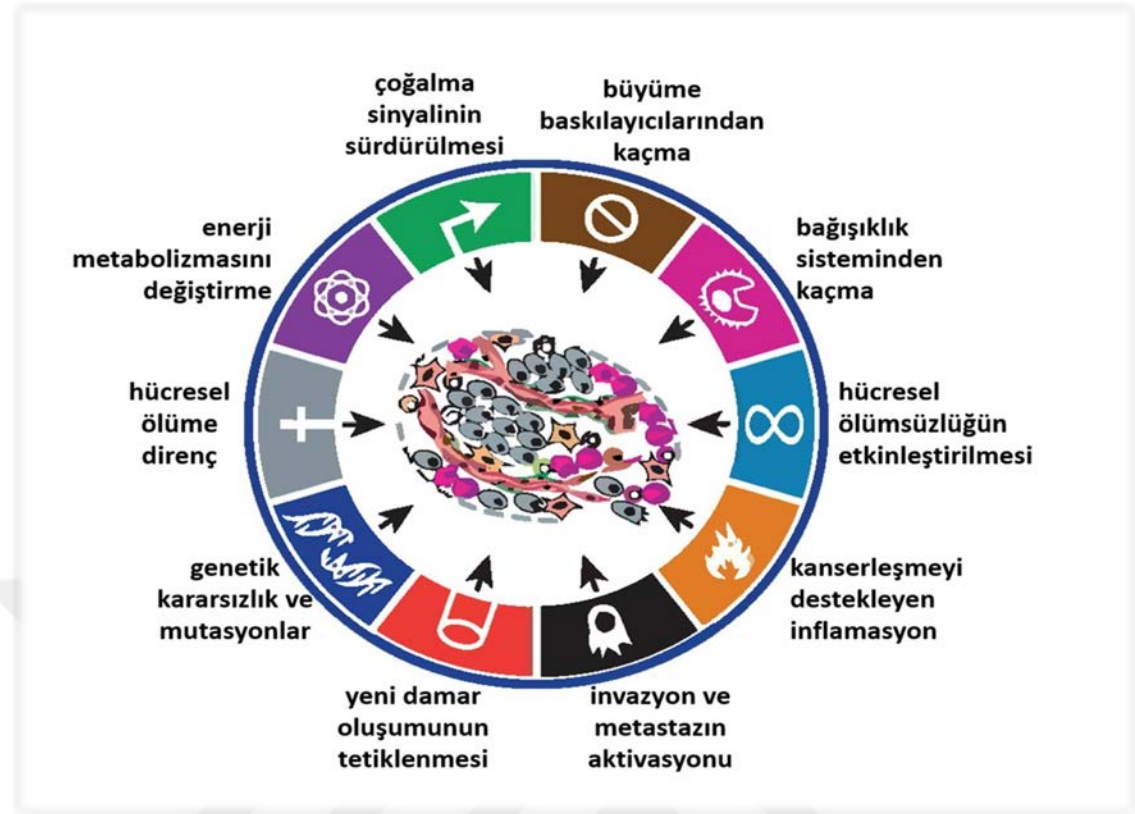
Şekil 2.1. Kolon kanserinde moleküler düzeyde çok aşamalı gidiş

İlk insan onkogenleri ve tümör baskılayıcı genler 1980'lerde keşfedildi ve kansere bu genlerde oluşan mutasyonların neden olduğu fikri sağlam bir zemin kazandı. Onkogenlerdeki mutasyonlar hücre çoğalmasını uyaran proteinlerin sentezini artırırken tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar hücre çoğalmasını sınırlayan ve apoptozu uyaran proteinlerin kaybına neden olmaktadır. Bu iki tip gende çeşitli mutasyonların birikmesi, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasını sağlayarak kansere sebep olmaktadır (Reddy 1982; Stanbridge 1990). O dönemde, kanserin bu genlerdeki nispeten az sayıda mutasyonla açıklanacağı ve sonunda bu genetik değişikliklerin tersine çevrilmesi ya da kullanılmasıyla kanserin tedavi edilebileceğine inanılıyordu. Ancak son yıllarda gerçekleştirilen insan tümörlerinin moleküler analizleri, kanser hücrelerinin genetik değişikliklerinin önceden düşünülenlerden çok daha fazla ve kararsız olduğunu ortaya koymuştur (Folkman 2000). Örneğin, Stoler ve ark. (1999), kolorektal premalign polip ve karsinom hücre genomlarını örnekleyerek, karsinom hücresi başına ortalama genomik değişiklik sayısının yaklaşık 11.000 olduğunu bulmuşlardır. Ek olarak, mutasyonların kanser hücrelerinin değişmiş gen ekspresyonunun tek nedeni

olmadığını belirten çok fazla kanıt toplanmıştır. Epigenetik değişiklikler (DNA dizisi dışındaki kalıtsal ve tersine çevrilebilir değişiklikler) ve aneuploidi (kromozomlardaki sayısal ve yapısal anormallikler), tümör hücrelerinde gen ekspresyonunu değiştiren ve ayrıca karsinogeneze çok önemli bir rol oynayabilecek olan genel değişikliklerdir (Rajagopalan vd 2004; Iacobuzio-Donahue 2009). Bu, tümör hücrelerinin genetik kararsızlığı ve karmaşıklığıdır.

Kanser genomunun karmaşıklığına ve değişkenliğine rağmen, kanser tedavisini rasyonelleştirmek ve kişiselleştirmek için tümörlerin genetik profilini karakterize etmek için birçok araştırma yapılmıştır (German 2007; Hayden 2009). Bu çalışmalar sonucunda; kanser tipine bağlı olmaksızın normal hücrelerden farklı olarak tüm malignant hücrelerde var olan on temel özellik ortaya çıkarılmıştır. Bu özellikler Şekil 2.2’de de görüldüğü gibi şöyledir:

- 1-Kendi sinyallerini üreterek bağımsız çoğalabilme
- 2-Yandaki hücreye temas sonrası bölünmeyi durdurumama ve büyüme inhibitörlerine duyarsızlık göstererek kontrolsüz çoğalabilme
- 3-Genetik kararsızlık ve mutasyonlar
- 4-Programlı hücre ölümü olan apoptozdan kaçabilme
- 5-Telomerlerini sabitleyerek veya telomeraz aktivitesini koruyarak yaşlanmaya direnç gösterme ve sonsuz şekilde replikasyon ile ölümsüzlük kazanma
- 6-Yeni kan damarları oluşturabilme diğer deyişle anjiyogenez
- 7-Bazal membranı parçalayarak çevre dokulara yayılma (invazyon), kan ve lenf damarı yardımıyla ya da doğrudan başka bir bölgeye taşınabilme (metastaz)
- 8-Enerji metabolizması farklılaşması: Sağlıklı hücreler her tipteki besini kullanabilirken kanser hücreleri sadece glikolizden gelen glukozu kullanabilirler. Şeker normal hücrelere oranla yaklaşık 100 kat daha fazla olarak kandan alırlar ve laktat üreterek enerji sağlarlar (Warburg etkisi).
- 9-İnflammatuar mikroçevre
- 10-İmmün sistemden kaçış.

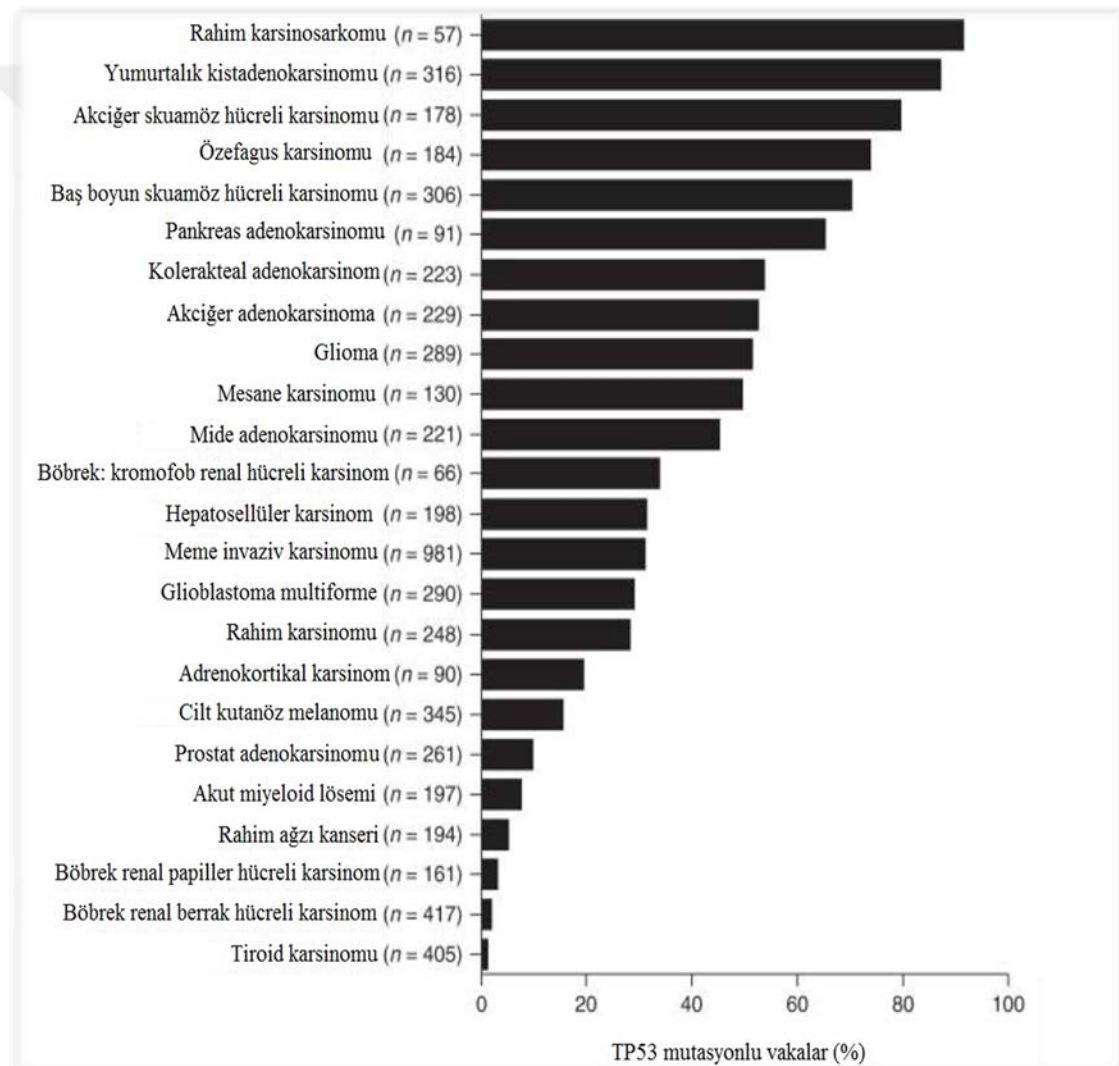


Şekil 2.2. Kanser hücrelerinin on temel özelliği (Hanahan ve Weinberg 2011)

Bu özelliklerin her biri kanser tedavisi için farklı hedefler olarak kabul edilmektedir. Bazı hedefe yönelik kanser tedavilerinin, özellikle de kanser hücrelerinin moleküler kusurlarını hedef alan tedavilerin, yakın zamanda onaylanmış olması kanser hücrelerinin değişmiş genomunun terapötik olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Bu yeni tedavilerin başarılı bir şekilde kullanılması, bireysel tümörlerdeki genetik kusurların detaylı bilgisine dayanacaktır (Bertram 2000; Ma ve Adjei 2009).

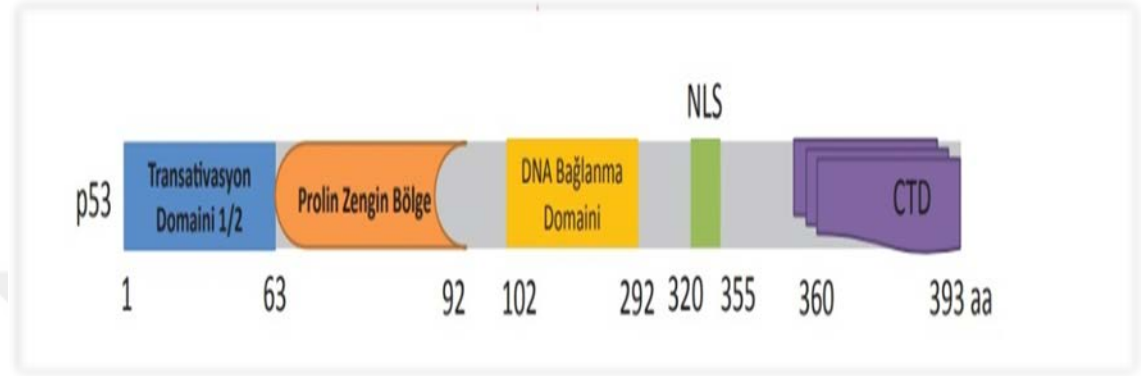
Genom, DNA hasarına neden olan sayısız farklı eksojen veya endojen etkene maruz kalır. Tüm organizmalar genetik materyallerini bu çevresel etkenlerin oluşturduğu hasarlara karşı korumak amacıyla DNA onarım mekanizması içerirler. DNA onarımı, hücrede tek bir mutasyonla başlayan, hasarlı DNA oluşumu ve kanser tablosuyla son bulabilen yolda, hücreyi koruyan önemli bir mekanizmadır. Mutajenite kanser gelişiminin hem başlangıç hem de gelişme evresinde rol oynar. Hücre büyümesini ve farklılaşmasını sağlayan normal genler olan proto-onkogenler; mutasyonlar, artmış gen ifadesi, gen duplikasyonları ve/veya kromozal düzenlemeler nedeniyle etkin hale geçip onkogen haline dönüşebilirler. En bilinen onkogenlere örnek olarak RAS, BRAF, Erk, MYC gibi genler gösterilebilir. Protoonkogenlerdeki aktivasyon ya da tümör baskılayıcı genlerdeki inaktivasyon ile sonuçlanan mutasyonlar karsinogenezi başlatmaktadır. İnsan kanserlerinin hemen her tipinde tümör baskılayıcı

genler ve/veya onkogenlerde mutasyon saptanmış olması bu genlerin kanser gelişimi açısından başlangıç noktası olarak kabul edilmelerine neden olmuştur (Weir 2004). Hücrenin bölünmesini ve çoğalmasını kontrol eden, hasar durumunda DNA tamirini başlatan, tamir girişiminin başarısız olması durumunda apoptozu tetikleyen gen gruplarına tümör baskılayıcı genler denir. *Rb*, *BRCA-1/2*, *Tp53*, *PTEN*, *Cadherin* genleri bunlardan birkaçıdır. Tümör baskılayıcı genler adeta hücrenin kontrolünü elinde tutan anahtarlar gibi davranmaktadır (Lodish vd. 2000). İnsan kanserleri içerisinde en sık mutasyona uğrayan ve tüm kanserlerin %50'sinden fazlasında mutasyona uğradığı gözlenen tümör baskılayıcı gen *TP53*'dür. Şekil 2.3'te çeşitli kanser türlerindeki *TP53* mutasyonunun sıklığı görülmektedir.



Şekil 2.3. Kanser Genom Atlası (TCGA) tarafından ekzom sekanslama kullanılarak analiz edilen 24 kanser genomunda *TP53* mutasyonunun sıklığı (Robles vd.)

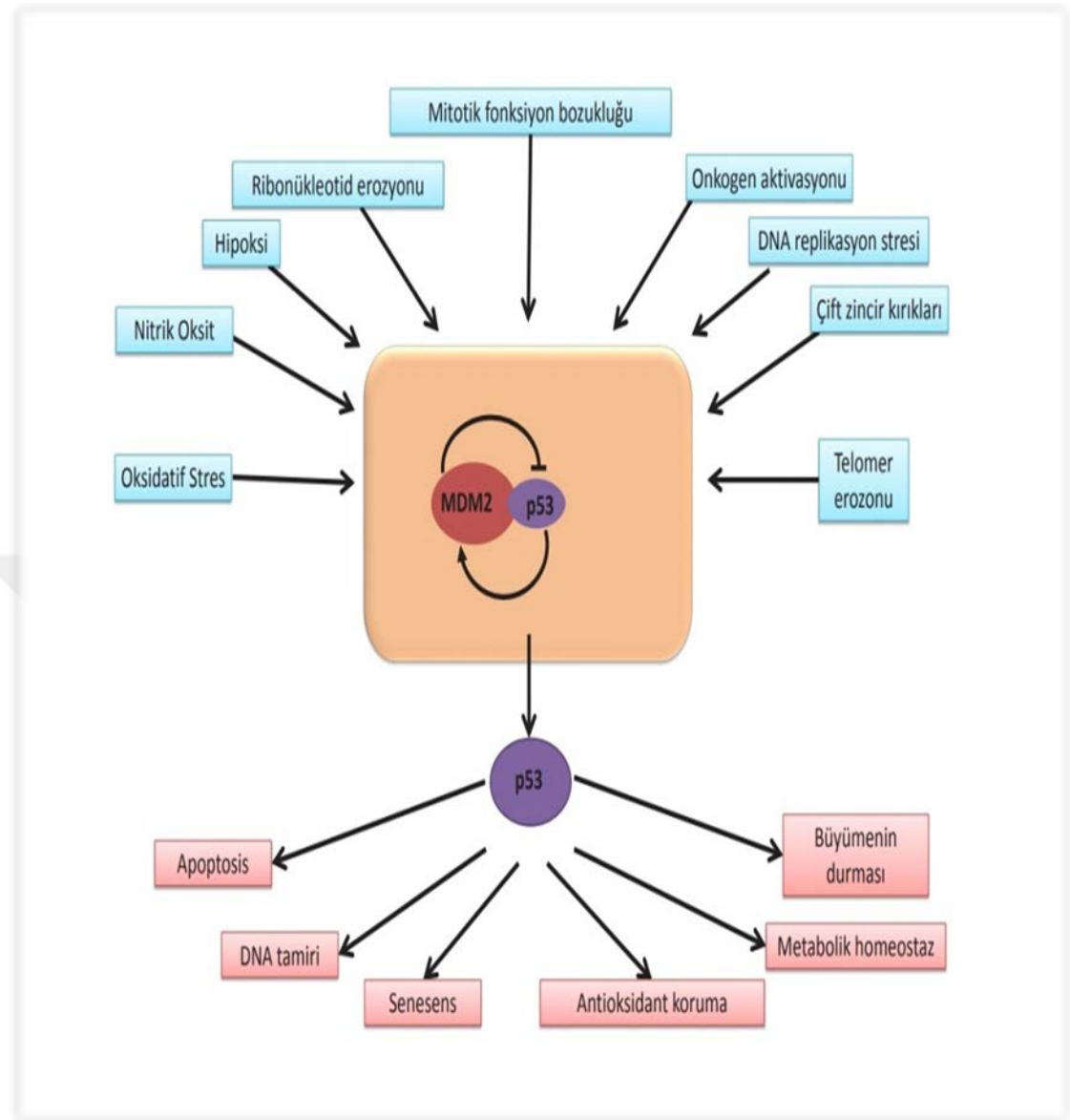
TP53 geni 17p13.1 kromozom bölgesinde lokalize olup 393 aminoasitten oluşan, 50'den fazla farklı genin transkripsiyonunu uyaran ya da baskılayan bir transkripsiyon faktörü rolü oynayan p53 adı verilen bir çekirdek proteinini kodlamaktadır. Şekil 2.4'teki şematik yapısında görüldüğü gibi p53 proteinini yapısal ve fonksiyonel olarak beş farklı bölgeden oluşur.



Şekil 2.4. İnsan p53 proteininin şematik yapısı (Bell vd. 2002)

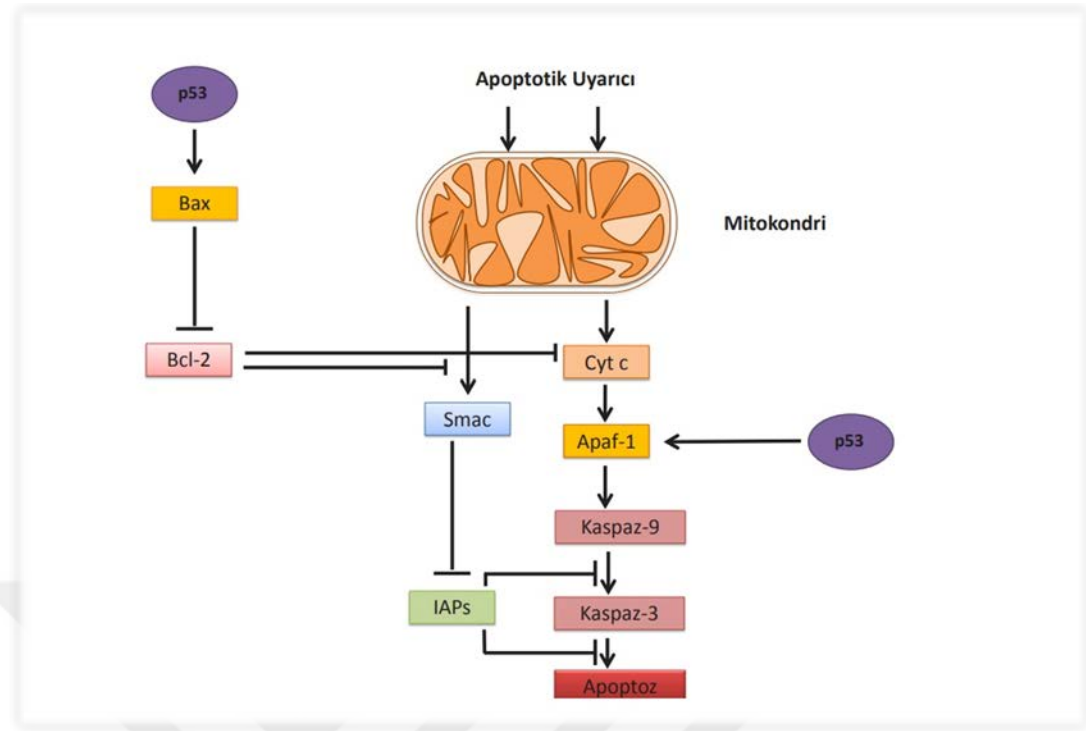
1-63. amino asitlerin oluşturduğu N-terminal transaktivasyon domaini, p53'ün parçalanmasına neden olan MDM2 proteininin bağlanma bölgesiyken, 360-393. amino asitlerin oluşturduğu C-terminal negatif düzenleyici bölge DNA ve RNA'ya bağlanabilen dokuz bazik amino asit içerir. Bu da p53'ün DNA'ya bağlanabilmek için özelleşmiş bir yapıya sahip olduğunu gösterir.

Şekil 2.5'te aktivasyonu ve hücre fonksiyonları belirtilen p53, hücre döngüsünün durdurulması, yaşlanma, apoptoz, DNA onarımı, otofaji ve metabolizma gibi çok çeşitli hücresel süreçlere dahil olan anahtar bir tümör baskılayıcıdır (Hainaut ve Wiman 2005; Green and Kroemer 2009 ; Vousden ve Prives 2009).



Şekil 2.5. P53 aktivasyonu ve hücre fonksiyonları (Levine ve Oren 2009)

P53 spesifik olarak DNA'ya bağlanır ve apoptoz ile hücre ölümünü tetikleyen hücre döngüsü ilerlemesini bloke eden *p21* ve *Bax*, *Puma* ve *Noxa* gibi hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler (Vousden ve Lu, 2002; Hainaut ve Wiman, 2005). Ek olarak, p53, anti-apoptotik *Bcl-2* ve *hTERT* de dahil olmak üzere spesifik genlerin transkripsiyonunu inhibe eder (Xu vd. 2000; Mirza vd. 2003). p53, mitokondriye translokasyon üzerine transkripsiyondan bağımsız mekanizmalar ile apoptozu destekleyebilir (Mihara vd. 2003). Şekil 2.6'da p53'ün apoptoz yolağı şematize olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.6. P53 apoptoz yolağı (Riedl ve Shi 2004)

P53 proteini normal koşullar altında kısa bir yarı ömre sahiptir. p53 hedef geni MDM2, yapısal olarak ilişkili ortak protein MDMX (HDM4) ile birlikte, p53'ü ubiquitinatlayan ve böylece aracılık eden proteazom indirgemesini hedefleyen bir E3 ligazdır. MDM2 ayrıca p53'ün işlem etki alanını da engeller. Böylece, p53 ve MDM2, hücrel stres olmadığında düşük p53 seviyelerini koruyan negatif bir geri besleme döngüsü oluşturur (Vousden ve Lu 2002). Onkogen aktivasyonu ve DNA hasarı gibi hücrel stres, p53'ü MDM2 bağlanmasını önleyen fosforilasyon dahil olmak üzere transkripsiyon sonrası modifikasyonlar yoluyla ve kısmen de artmış mRNA seviyeleri ve gelişmiş transkripsiyon ile stabilize eder. Sonuç olarak, p53 biyolojik bir yanıtı biriktirir ve tetikler (Hainaut ve Wiman 2005).

P53'e bağlı yaşlanma ve apoptoz, tümör gelişimine karşı kritik bir engeldir. Onkogen aktivasyonu ve hücre döngüsü kontrolünün bozulması sonucu oluşan onkojenik stres, ATM-Chk2 veya ATR-Chk1 kinaz yollarının aktivasyonunu ve p53 birikimini içeren bir DNA hasar tepkisini tetikleyen durgun replikasyon çatalları ile anormal DNA replikasyonuna yol açar. (Berkova vd. 2005; Gorgoulis vd. 2005 ; Bartek vd. 2007). Ayrıca onkogen aktivasyonu, p14 birikmesine ve p53'e bağlı biyolojik bir tepkiye yol açan p53AF proteininin (farede p19ARF) MDM2'yi inhibe etmesine neden olur (Sherr ve Weber 2000). Dolayısıyla, p53'ün onkojenik stres üzerinde aktivasyonu, yeni başlayan tümör hücrelerinin apoptoz ve/veya yaşlanma ile ortadan kaldırılmasına hizmet eder.

TP53 mutasyonu, farklı tümör tiplerinde değişken frekansta olmasına rağmen, insan tümörlerinin önemli bir bölümünde meydana gelir. Küçük hücreli akciğer kanseri ve yumurtalık karsinomu gibi tümörler, en yüksek p53 mutasyonlarına sahipken testis kanseri nadiren mutant-p53 taşır (Olivier vd. 2002). p53 mutasyonlarının çoğu, DNA bağlanma çekirdeği alanındaki, yetersiz DNA bağlanmasıyla sonuçlanan ve bunun sonucunda hedef genlerin işlem yapamamasıyla sonuçlanan yanlış mutasyonlardır (Soussi ve Wiman 2007). p53'ün mutasyonla etkisiz hale getirilmesi, DNA hasar tepki yolunu bozacak ve böylece onkogenik stres üzerinden hasarlı hücrenin hayatta kalmasına izin verecektir. MDM2'nin aşırı ekspresyonu, p14ARF kaybı veya ATM mutasyonu ile p53 yolunun, vahşi tip-p53 taşıyan tümörlerde de işlevsiz olduğunu gösterir. Bu nedenle, p53 yanıtının etkisiz hale gelmesi, hasarlı hücrelerin apoptozdan kaçmasında ve sürekli tümör büyümesine izin veren tümör gelişimi sırasında kritik bir adımdır (Gaidon vd. 2001).

P53, hücre bölünmesini düzenleme ve tümör oluşumunu önleme açısından çok önemli olduğu için 'genomun gardiyanı' olarak adlandırılmıştır. p53 proteini insan sağlığı için bu kadar temel bir konumda olsa bile halen fonksiyonu hakkında bilinmeyen pek çok detay bulunmaktadır. Bu bağlamda hem temel bilimsel araştırmaların hem de ilaç geliştirme girişimlerinin önemli bir hedefi olmaya devam etmektedir.

2.2. Akciğer Kanseri

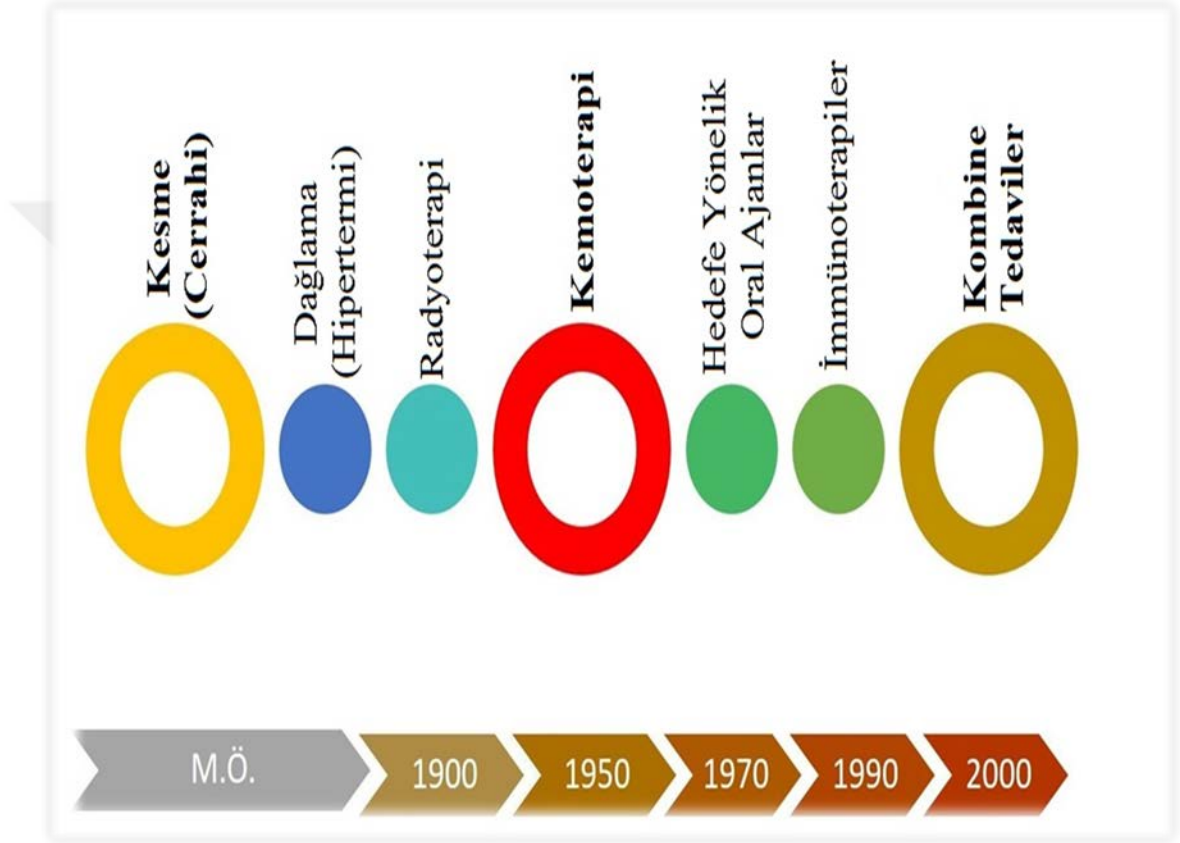
Her yıl kansere bağlı ölümlerin yaklaşık üçte biri akciğer kanseri nedeniyle gerçekleşmektedir ve bu oran artarak devam etmektedir. Erkeklerde kansere bağlı ölümlerin % 29'u akciğer kanserine bağlı iken kadınlarda kansere bağlı ölümlerin % 26'sından akciğer kanseri sorumludur (Jemal vd. 2010).

Akciğer kanseri, tedavi ve prognoz açısından küçük hücreli akciğer kanseri (SLCL) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) olarak başlıca 2 grupta sınıflandırılır. Skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom, NSCLC olarak sınıflandırılır ve tüm akciğer kanseri vakalarının % 75-80'ini oluşturur (Magrini vd. 2008). Akciğer tümörlerinin histolojik sınıflaması Dünya Sağlık Örgütü tarafından 2004 yılında yeniden düzenlenmiştir (Travis vd. 2004).

Tedavi edilmemiş metastatik NSCLC'li hastaların ortalama sağkalımı sadece dört ile beş aydır ve hayatta kalma oranı yalnızca bir yılda % 10'dur (Rapp vd. 1988). NSCLC'de toplamda 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık % 15'tir (Spira ve Ettinger, 2004). NSCLC'de çok sayıda faktör prognozu etkilemektedir. Yaş, cinsiyet, performans durumu, ek hastalık varlığı, tümör histolojisi, tümör evresi, tedavi yöntemi prognozu etkileyen faktörler arasında sayılmaktadır. Tümör evresi, en önemli prognostik faktörlerden biridir. Cerrahi tedavi uygulanan hasta grubunda 5 yıllık sağ kalım oranı evre IA için % 67, evre IIA için % 55 ve evre IIIA için % 23 olarak bildirilmektedir. Bu sağ kalım oranı evre IIIB olgularda ise sadece % 3-7'dir Erken evredeki hastalarda cerrahi tedavi en iyi sonucu verirken ileri evre hastalarda ise kemoterapi ve radyoterapi seçilen tedavi yöntemleri olarak öne çıkar (Damadoğlu 2007).

2.3. Kanser Tedavileri

Kanserin kesin bir tedavisinin olmaması uygulanacak kanser tedavisi yöntemini; kanserin türü, evresi ve tedaviden ne beklendiğine göre değiştirmektedir. Ancak bu alandaki ilerlemelerle birlikte yeni nesil tedavi yöntemlerin kullanımı geleneksel yöntemlere göre daha umut vericidir çünkü yeni nesil yöntemler organizmanın kanser hücrelerini daha iyi tanımasını ve yok etmesini sağlayan özellikler taşır.



Şekil 2.7. Kanser tedavisi yöntemleri

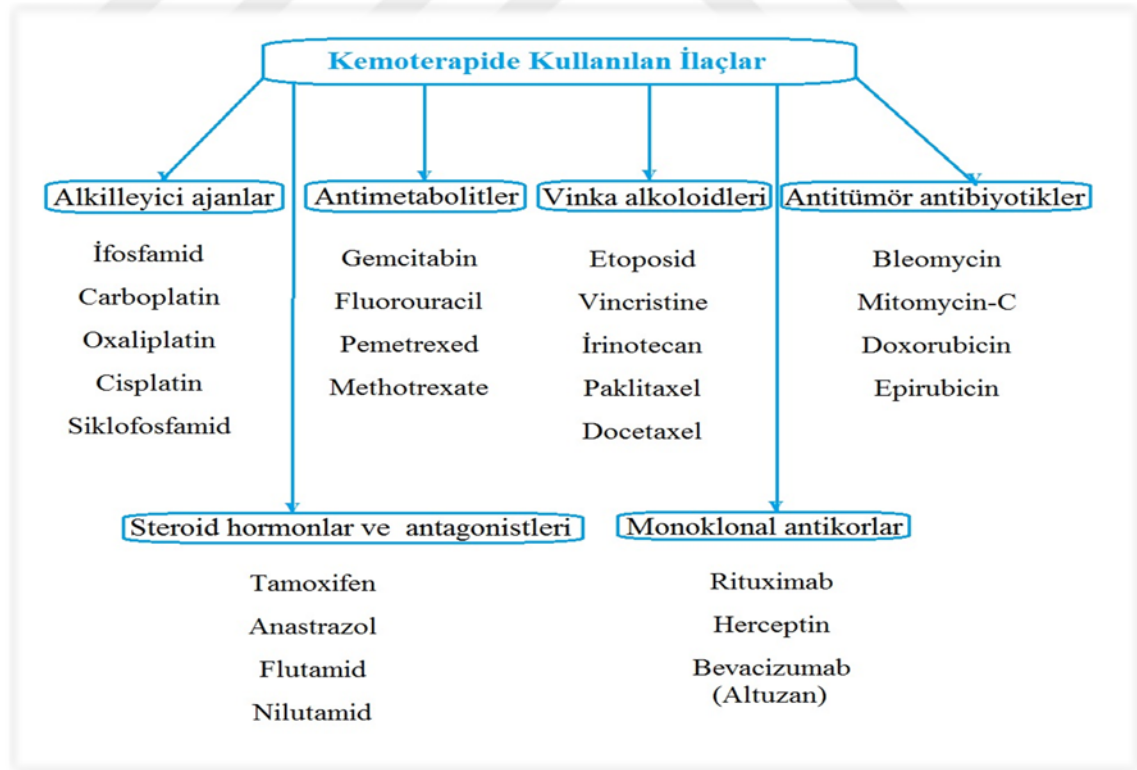
Kanser tedavilerinde kemoterapinin keşfi, kanser tedavi gelişiminin en önemli basamağı olmuştur (Şekil 2.7). Bu tez kapsamında, kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler ile kombine tedavilerden bahsedilecektir.

2.3.1. Kemoterapi

Kemoterapinin asıl amacı; kemoterapötik ajanlar kullanarak kanser hücrelerinin doğrudan ya da dolaylı olarak çoğalmasına engel olmak ve onları öldürmek olup, sitotoksik ve sitostatik ajanlar bu tip tedavide başrolüdür (Besse vd. 2012).

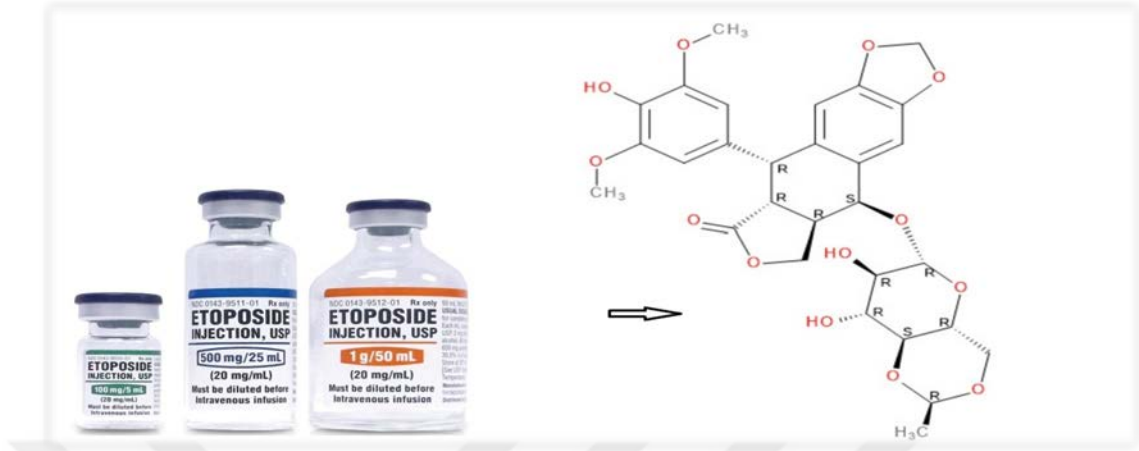
Kemoterapide kullanılan ilaçlar DNA ve RNA'yı etkileyerek protein sentezini bozarlar (Espinosa vd. 2003). Bu ilaçların çoğu hücre çoğalmasını nükleotit sentezini inhibe ederek engeller, bu durumdan daha hızlı büyüyen ve çoğalan hücreler en fazla etkilendiği için sadece malign hücreler değil bu özellikleri taşıyan kemik iliği (eritrosit, lökosit oluşumu), gonadlar, gastrointestinal kanal (8 epitel tabakasının idamesi), deri (özellikle saç folikülleri) gibi dokular da etkilenir. Bu kemoterapinin en büyük dezavantajlarından biridir (Guillot vd. 2004, Dharap vd. 2005). Ayrıca kusma, saç kaybı, halsizlik, iştah kaybı gibi sık görülen yan etkiler de hastanın yaşam kalitesini etkileyebilir (Carelle vd. 2002).

Kemoterapide farmasötik uygulama; sistemik tedavi ve rasyonel damar içi perfüzyon tedavisi olmak üzere iki şekilde olmaktadır. Kemoterapi uygulamaları esnasında verilen antikanser ilaçlarını etki mekanizmalarına göre, Şekil 2.8'deki gibi 6 ana gruba ayırabiliriz (Ölmez 2016).



Şekil 2.8. Kemoterapide kullanılan antikanser ilaçlar

2.3.1.1 Etoposide



Şekil 2.9. Etoposide

Şekil 2.9’da moleküler yapısı da görülen Etoposide, sitostatik bir ajan olup podofilotoksinin yarı sentetik bir türevidir. Etoposidenin fibroblastlarda metafazın durmasına neden olduğu gösterilmiştir. Ancak ana etkisini memeli hücrelerinde hücre siklusunun G2 fazında gösterir. Doza bağlı olarak iki farklı yanıt görülmüştür. Yüksek konsantrasyonlarda (10 µg/ml ya da daha fazla) mitoz giren hücrelerin parçalanmasına sebep olurken düşük konsantrasyonlarda (0.3 - 10 µg/ml) hücrelerin profaza girişini inhibe eder. Etoposide, NADH dehidrojenaz düzeyinde mitokondriyal geçişi inhibe edebilir ya da HeLa hücreleri içine nükleosidlerin geçişini inhibe edebilir. Mikrotübüler yapı ile etkileşime girmez. Etoposidenin en önemli etkisi DNA topoizomera II ya da serbest radikallerle etkileşime girerek DNA sentezini inhibe etmesidir. Bu da tek veya çift DNA zincirinin kırılması ile sonuçlanır (Koçak Farma 2009).

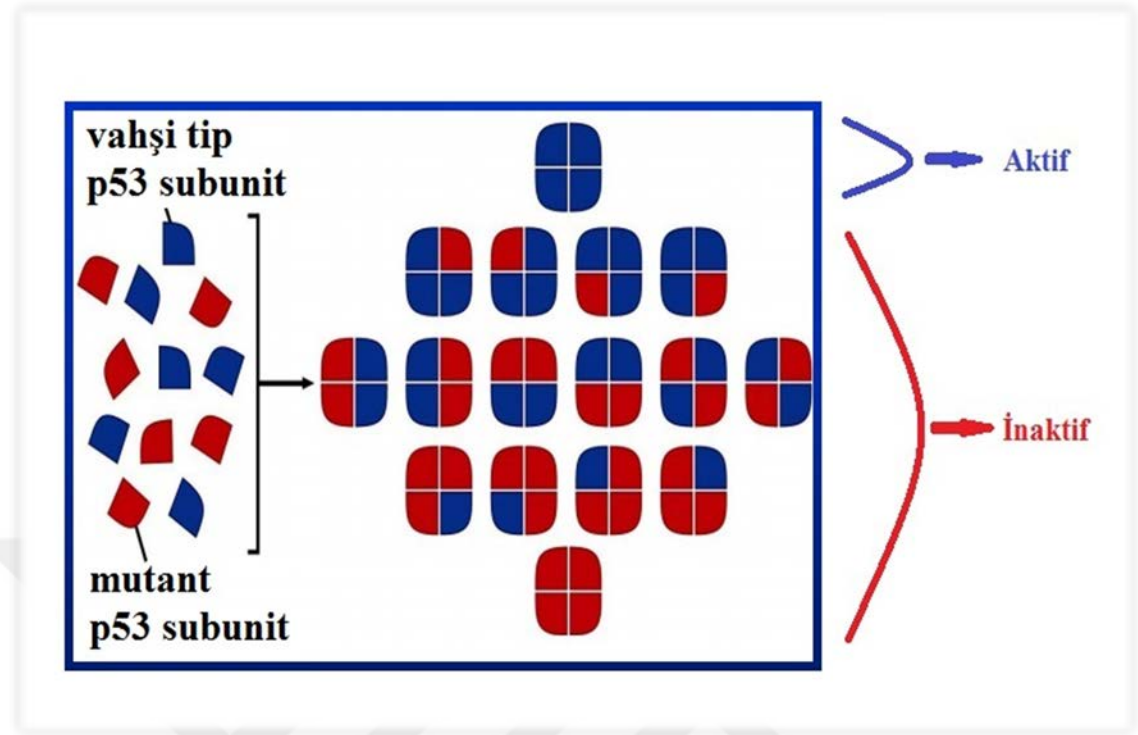
Etoposide diğer ajanlarla birlikte akciğer kanserine karşı etkilidir ve küçük hücreli akciğer kanserinde % 90’lık yanıt oranları gözlenmiştir. Etoposide diğer ajanlarla kombinasyon halinde kullanıldığında, testis kanseri olan hastalarda yaklaşık % 80’lik yanıt oranları gözlenmiştir. Lösemi, lenfoma, meme ve yumurtalık karsinomlarının ve diğer tümörlerin tedavisinde etoposidenin etkinliği tartışılmaktadır. Etoposidenin akciğerde ve testis kanserinde sağkalımı uzatmaya etkisi ele alınmakta ve etoposidenin farmakodinamiğini değerlendiren çalışmalar anlatılmaktadır. Etoposide tedavisi ile ilişkili yan etkiler arasında hızlı intravenöz uygulama sonrası mielosupresyon, alopesi, bulantı ve kusma, mukozit ve hipotansiyon bulunur. Etoposide, geniş bir tümör yelpazesine karşı kayda değer klinik etkinlik göstermiştir (Fleming vd. 1989).

2.3.2. Hedefe yönelik tedaviler ve terapötik bir hedef olarak mutant-p53

Araştırmacılar kontrolsüz hücre çoğalmasına neden olan genler hakkında daha fazla bilgi sahibi oldukça bu değişiklikleri tedavi edecek yeni ajanlar geliştirebilmeleri de mümkün olmuştur. Bu ajanlarla yapılan tedaviye hedefe yönelik tedaviler denilmektedir. Bu ajanlar doğrudan kanser hücrelerindeki proteinlerle bağlanırlar böylece kemoterapide kullanılan ajanların aksine sağlıklı hücreleri etkilemeden yalnızca kanser hücrelerini öldürürler. Hedefe yönelik tedavilerin de çoğu deneyseldir ve diğer tedavi yöntemleriyle kombine halde kullanılır.

TP53 genindeki mutasyonlar, % 10 (hematopoetik malignitelerde) ve % 96 (yüksek dereceli over seröz karsinomu) arasında değişiklik gösteren frekanslarda hemen hemen her kanser türünde oluşmaktadır (Rivlin vd. 2011). Şekil 2.3'te de gösterilen kanser genomu dizileme çalışmaları, *TP53*'ün insan kanserlerinde en yaygın mutasyona uğramış tümör baskılayıcı gen olduğunu doğrulamaktadır. Çalışmaların çoğunluğu mutasyona uğramış *TP53* varlığının çeşitli kanser türlerinde kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Brosh ve Rotter 2009). Bu durum onu terapötik bir hedef haline getirmektedir.

TP53 mutasyonları tümör baskılayıcı özelliklerin tamamen kaybedilmesine yol açar. Bu durum protein tetramer yapıda olduğundan, mutant-p53 alt biriminin vahşi tip-p53 alt birimi ile heterodimer oluşturmaya ve mutant alt birimlerin vahşi tip üzerinde dominant-negatif (DN) etki göstermesiyle 'fonksiyon kaybı'(Loss of Function-LOF) olarak bilinen proteinin işlevini kaybetmesine yol açar (Şekil 2.10). Ya da proteinin üzerinde konformasyonel bir değişiklik sağlayarak onun downstream efektör proteinleri ile farklı etkileşime girmesine ve 'fonksiyon kazanımı' (GOF-Gain of Function) olarak adlandırılan yeni onkojenik özellikler kazanmasına yol açar (Robles vd. 2016). Sonuç olarak apoptoz yolağı çalışmaz, hücre döngüsü onarımsız devam eder, mutasyonların ve kromozomal değişikliklerin oranı artar.



Şekil 2.10. Baskın-negatif etki ve ifade edilen vahşi tip-p53 proteini ve mutant-p53 protein varyantları

TP53 mutasyonları, vakaların %70'inden fazlasında, en sık olarak DNA'nın bağlanmasından sorumlu olan p53 proteininin çekirdek alanını kodlayan bölge içinde oluşan yanlış anlamlı (missense) mutasyonlardır. Çekirdek alanındaki mutasyonlar, Bcl-2/Bcl-XL ile etkileşimi de içeren, sitoplazmik ve mitokondriyal p53'ün proapoptotik aktivitesini de bozabilir. *TP53* somatik mutasyonlarının kanser hastaları üzerindeki detaylı sonuçları, p53'ün DNA bağlanması ve transkripsiyonel ve onkogenik özelliklere dayalı yanlış anlamlı *TP53* mutasyonlarının sistematik sınıflandırılması yoluyla ortaya çıkmaya başlamıştır (Robles vd. 2015). Örneğin, göğüs kanserinde DNA bağlanmasını etkileyen yanlış anlamlı mutasyonlarının diğer yanlış anlamlı mutasyonlara göre daha kötü prognozla ilişkili olduğu bilinmektedir. Dahası p53 mutant protein varyantlarının spesifik fonksiyonel özelliklerinin ortak olarak zayıf prognoz ve terapötik direnç ile çeşitli tümör tiplerini oluşturmada yani metastazda kilit bir rol oynadığı görülmektedir (Poeta vd. 2007).

Vahşi tip p53'ün transaktivasyon hedefleri, hücre döngüsü durdurma/yaşlanma veya programlanmış hücre ölümünü teşvik etme eğilimindeyken, tümör kaynaklı p53 mutantlarının hedefleri biyolojik etkileri açısından oldukça değişkendir. Bunlar proliferasyonu arttırmaya, apoptozu inhibe etmeye, kemoterapötik direnci arttırmaya ve anahtar metabolik veya hücre-hücre/hücre-ECM (ekstraselüler matriks) sinyal

yolaklarına etki etmeye yarayan bir takım hedef genlerini etkilerler (Walerych vd. 2015).

TP53'ün mutasyona uğramış varyantları tarafından kodlanan mutant-p53 proteinlerinin; aktif onkoproteinler olarak tümör büyümesini ve metastazı teşvik ettiği yapılan birçok deneyle desteklenmiştir. p53 yanlış anlamlı mutant proteinleri vahşi tip tümör baskılayıcı etkisini kaybeder; fare modelleri ve hücrede çeşitli transformasyon yeteneklerini kazanarak onkojenik potansiyel kazanır. Çeşitlilik gösteren mutant-p53 varyantlarının her birinin onkojenik özelliklerinin de farklılık gösterip göstermediği tartışma konusu olmakla birlikte son yapılan buluşlar farklı mutant-p53 varyantları için ortak olan mutant-p53 program akışının varlığını ortaya çıkarmıştır (Walerych vd. 2015). Nihai terapötik yaklaşım, bu downstream yolağını hedefleyen küçük moleküllerin kullanımı ve tümör büyümesini teşvik eden p53'ün tümör türevli mutantlarının ortak mekanizmasını tanımlayarak insan kanserlerindeki p53 mutasyonlarının oranından yararlanmaya çalışır (Freed-Pastor vd. 2012).

Mutant p53'ü terapötik bir hedef yapan diğer bir özelliği, birçok tümör hücresindeki yüksek ekspresyon seviyesidir. p53 kendisinin transkripsiyonel aktivasyonunu tetikleyerek hücredeki p53 seviyesinin artmasını sağlarken, diğer taraftan da parçalanmasına neden olan negatif regülatörleri Mdm2 ve/veya MdmX'in transkripsiyonel aktivasyonunu tetiklemektedir. Tümör hücrelerinde mutant-p53 seviyesinin yükselmesi, *Mdm-2* genini transaktive edememekten ve onkojen aktivasyonu ve hücre büyümesinin düzensizleşmesinin bir sonucu olarak yapısal stres sinyallemesinden kaynaklanabilir. Bu durumda yüksek seviyelerde eksprese edilen mutant-p53'ün vahşi tip fonksiyonuna restorasyonu, güçlü bir biyolojik yanıtı ve tümör hücrelerinin apoptoz veya yaşlanma boyunca etkili bir şekilde yok edilmesini tetikleyecektir (Wiman 2010).

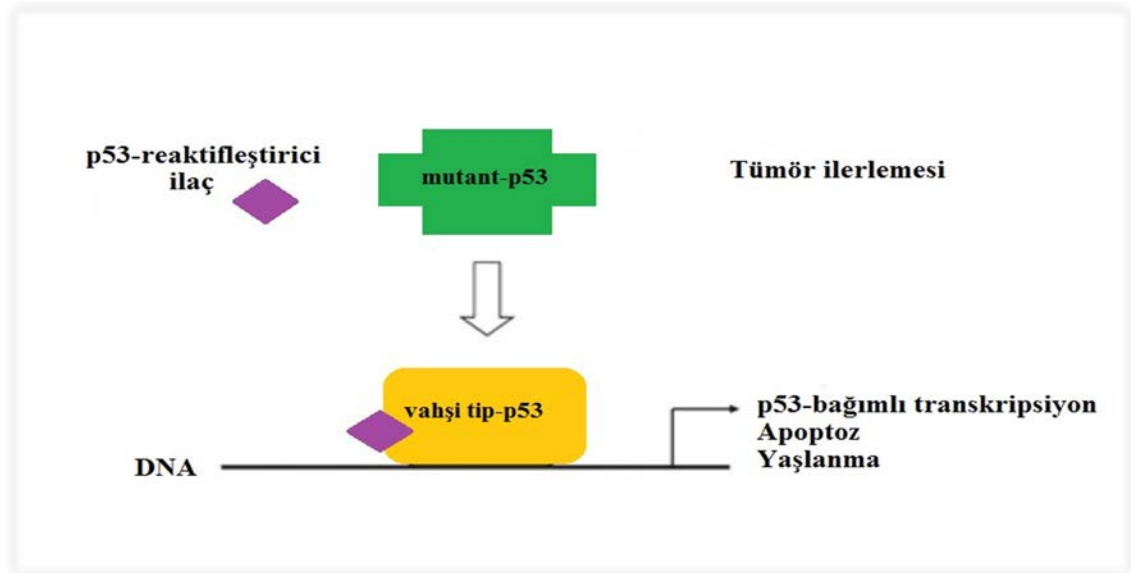
Yapılan gözlemlerde birçok p53 mutantının ortak bir özelliğe sahip olması, vahşi tip konformasyonu stabilize eden ve dolayısıyla vahşi tip fonksiyonunu geri kazandıran ilaçların tasarlanma olasılığını arttırmıştır. Hem rasyonel tasarım hem de rasgele tarama yaklaşımları, farklı yapı ve özelliklere sahip mutant-p53 hedefleme bileşiklerinin tanımlanmasına yol açmıştır. İlginç bir şekilde, rastgele tarama ile tanımlanan bileşiklerin birçoğu, mutant p53 reaktivasyonunda kilit bir rol oynaması muhtemel olan ortak bir kimyasal aktiviteyi paylaşır (Wiman 2010). Fareler üzerinde vahşi tip-p53 restorasyonuna dayalı çeşitli birçok in vivo çalışma hızlı tümör gerilemesi ile sonuçlanmış olup bu sonuçlar vahşi tip-p53 ekspresyonunun restorasyonunun, tümörle ilişkili çoklu genetik değişikliklerin varlığında bile tümörlerin ortadan kaldırılması için yeterli olduğunu göstermektedir (Martins vd. 2006; Ventura vd. 2007; Xue vd. 2007).

2.3.2.1. Mutant-p53'ü reaktive eden ilaçlar

İnsan tümörlerinde *TP53* mutasyonlarının çokluğu ve mutant P53'ün tümör hücrelerinde sıklıkla birikmesi mutant P53'ü yeni kanser tedavilerinin geliştirilmesinde potansiyel bir hedef yapar. Bu sebeple mutant-p53'ün farmakolojik olarak reaktivasyonu kanser tedavisi gelişimi için umut verici bir strateji olarak ortaya çıkmıştır. Son yirmi yılda, kimyasal kütüphane taraması ve rasyonel ilaç tasarımlarını içeren çeşitli yaklaşımlar kullanılarak, mutant-p53'e vahşi tip aktivitesini geri kazandıran küçük moleküller tanımlanmıştır (Hong vd. 2014). Bu moleküller Çizelge 2.1'de belirtilmiştir.

Küçük moleküller terapötik ajanlar olarak, peptidler ve daha büyük makromoleküllerin de üstünde daha önemli avantajlar sunar. En önemlisi, bunlar büyük ölçekli GMP (Guanin Mono Fosfat) sentezi ve potansiyel olarak sistemik tedavi için uygundur, örneğin intravenöz veya oral uygulamada kullanılabilir. Sistemik tedavi, yayılmış tümörlü hastalarda metastazların etkin tedavisi için kritiktir. Bu özellik, özellikle bu hasta grubu sağkalımının en düşük olduğu ve bu nedenle tedavi için en büyük zorluğu temsil ettiği için önemlidir (Selivanova ve Wiman 2007).

Şekil 2.11'de gösterildiği gibi mutant-p53 reaktivasyonunun arkasındaki temel fikir, vahşi tip konformasyonun ve DNA bağlanmasının restorasyonu, ardından hedef genlerin transkripsiyonel transaktivasyonu ve apoptoz ve/veya yaşlanmanın indüklenmesidir ki bu da etkin tümör eliminasyonuna yol açacaktır. Bu durum birçok *in vivo* çalışma ile desteklenmiştir (Wiman 2010).



Şekil 2.11. Küçük moleküller aracılığı ile mutant-p53 reaktivasyonunun genel stratejisi (Wiman 2010)

Çizelge 2.1. P53 hedefli inceleme altındaki ajanlar (Hong vd. 2014)

Terapötik	Mekanizma	Test Aşaması
1) P53 işlevini geri yüklemek için gen tedavisi		
Gendicine	Vahşi tip- p53'ün adenovirüs ile taşınması	Faz IV
Advexin	Vahşi tip- p53'ün adenovirüs ile taşınması	Faz I/II
2) MDM2-p53 eksenini hedefleme		
Nutlin	P53-MDM2 etkileşiminin inhibisyonu	Preklinik
RITA	P53-MDM2 etkileşiminin inhibisyonu	Preklinik
MI-219	P53-MDM2 etkileşiminin inhibisyonu	Preklinik
RG7112	P53-MDM2 etkileşiminin inhibisyonu	Faz I
3) Mutant- p53'ün vahşi tip-p53'e restorasyonu		
PRİMA-1 PRİMA-1 ^{met}	Hem DNA teması hem de yapısal olarak p53 mutantına vahşi tip-p53 fonksiyonlarını yeniden kazandırır.	Faz I/II
PhiKan083	Mutant-p53 Y220C'deki özgün bir cebe bağlanır ve mutant-p53 Y220C'yi stabilize eder	Preklinik
NSC319726	Mutant-p53 R175H'nin vahşi tip-p53 aktivitesini spesifik olarak geri getirir.	Preklinik
CP31398	Mutant-p53'ün çekirdek bölgesini stabilize eder	Preklinik
SCH529074	Mutant p53'ün DNA bağlanma domainine bağlanır ve mutant p53'ü stabilize eder	Preklinik
Ellipticine	Mutant-p53'ün transkripsiyon aktivitesini geri yükler	Preklinik
WR1065	Sıcaklığa duyarlı mutant-p53 V272M'e vahşi tipteki konformasyonunu geri yükler	Preklinik
p53R3	R175H ve R273H p53 mutantlarının DNA bağlanmasını geri kazandırır	Preklinik
4) p53 ailesi proteinlerini hedefleme		
RETRA	p73 seviyelerini artırır ve p73'ü mutant p53 / p73 kompleksinden ayırır.	Preklinik
37AA	İASPP'ye bağlanır ve p73'ün iASSP / p73 kompleksinden salınması ile sonuçlanır.	Preklinik
5) Mutant-p53'i ortadan kaldırılması		
17AAG	Mutant p53'ün yıkımı amacıyla salınması için mutant-p53 ve HSP90 kompleksini yok ederek mutant-p53'ü azaltır	Preklinik
SAHA	HDAC6-Hsp90 şaperon ekseninin inhibisyonu ile mutant p53'ü düşürür	Preklinik
6) p53 tabanlı aşılar		
p53-SLP	Bir p53 sentetik uzun peptid aşısı	Faz I/II
INGN-225	Bir p53'ü değiştirilmiş transdüksiyonlu adenovirüs dendritik hücre aşısı	Faz I/II

Çizelge 2.1’de bahsedilen p53 hedefli küçük moleküllerden en yaygın olarak araştırılan PRİMA-1 ve PRİMA-1^{met} dir. PRİMA-1 (p53 reactivation and induction of massive apoptosis-p53 reaktivasyonu ve masif apoptoz indüksiyonu) ve onun metillenmiş türevi olan PRİMA-1^{met} çeşitli kanser türlerinde mutant p53’ü, p53’ün vahşi tip fonksiyonlarını geri kazandıran aktif bir formuna dönüştürür (Aryee vd. 2013). PRİMA-1^{met}, vahşi tip fonksiyonların mutant p53’e geri kazandırılmasında klinik kullanım için en umut verici ilaçlardan biridir (Mohell vd. 2016).

PRİMA-1^{met} şu anda, yüksek dereceli seröz yumurtalık kanserinde bir faz II klinik denemede test edilmektedir (Wiman 2010; Synnott vd. 2018). Hematolojik maligniteler ve prostat kanserinde yapılan faz I / IIa klinik araştırması bazı hastalarda iyi güvenlik profili ve klinik etkiler göstermiştir (Bykov 2016).



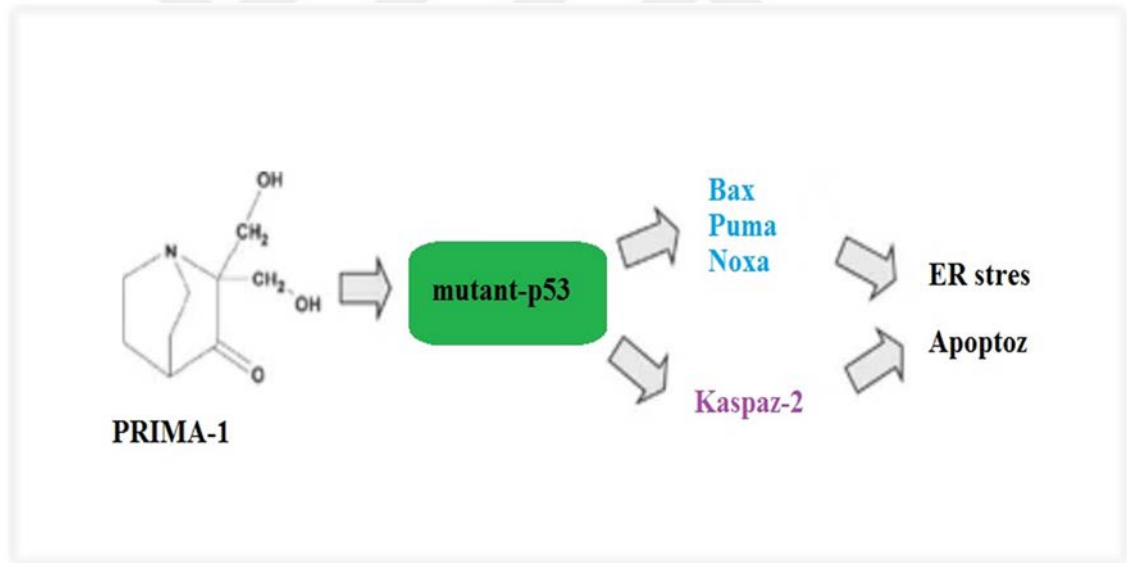
2.3.2.2. PRİMA-1^{met} ve moleküler mekanizması

Moleküler formül : C₁₀ H₁₇ NO₃

PRİMA-1^{met}, mutant p53'e tümör baskılayıcı fonksiyonunu geri kazandıran ve çeşitli kanser hücresi soylarında hücre ölümünü indükleyen PRİMA-1'in bir metillenmiş türevidir (Aryee vd. 2013). APR-246 olarak da adlandırılır.

PRİMA-1^{met}, mutasyon sonucu katlanmış p53'ü protein sentezinden bağımsız olarak aktif bir forma dönüştürür (Bykov vd. 2002). PRİMA-1^{met}; mutant-p53e kovalent olarak bağlanır ve bu proteinin merkez domainindeki tiyol gruplarını modifiye eder. Bu sayede p53 proteininin reaktivasyonuna sebep olur ve p53 apoptozu indüklemeye yeteneğini yeniden kazanır (Şekil 2.13).

P53 tümör baskılayıcıdaki mutasyonlar, birçok farklı neoplastik hücrede bulunur. PRİMA-1, fonksiyona özgü epitopların konformasyonel modülasyonu yoluyla mutant p53'ün apoptotik fonksiyonunu yeniden aktive eden eşsiz bir anti-onkojenik maddedir (Bykov vd. 2002; Lane ve Hubb 2003) (Şekil 2.12).

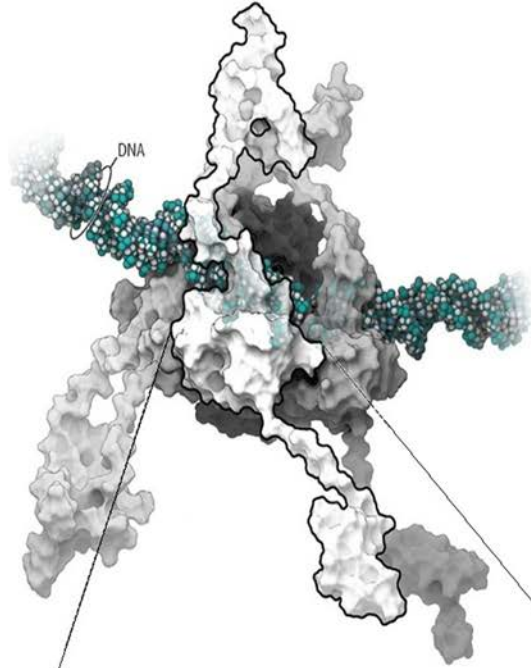


Şekil 2.12. PRİMA-1, p53'ün apoptotik fonksiyonunu yeniden aktive eder (Wiman 2010)

Düşük moleküler ağırlıklı bileşik olan PRİMA-1, mitokondriyal yol boyunca mutant p53'e bağlı apoptozu indükler. Mutant p53'ün reaktivasyonu, pro-apoptotik p53 hedef genlerinin (Bax, Puma ve Noxa) ve ER stresinin upregülasyonuna yol açar. PRIMA-1 ayrıca kaspaz-2'yi aktive eder, bunu kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonu takip eder. Bu da apoptoz ile hücre ölümünü tetikler (Shen vd. 2008; Lambert vd. 2010).

Genomun gardiyanı

p53 proteinini, bir hücreyi kanserli hale getiren genetik mutasyonlara karşı koruma sağlar. Mutasyonlar tespit edildiğinde, dört p53 kopyası bir araya gelir ve DNA'ya bağlanır ve tamir veya kendini imha etmeyi tetikleyen hücrel bir alarm verir.

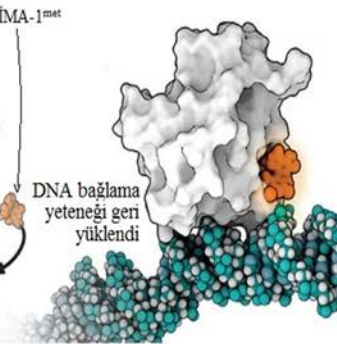
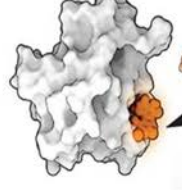


Yamalanmış p53

Genetik mutasyonlar, DNA'ya bağlanamayacak kadar gevşek olan katlama kusurlu p53'e yol açar. Bilgisayar simülasyonları, yanlış katlanmış proteinin çekirdeğindeki, proteini stabilize eden ve DNA bağlama kabiliyetini geri kazandıran ilaçlar için mükemmel olan, cepleri ortaya çıkardı.

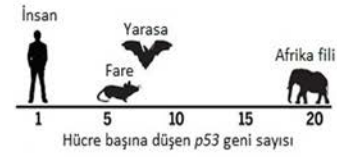
Stabil olmayan mutant-p53

İlaçla stabilize edilmiş



Peto'nun Paradoksu

1970'lerde, epidemiyolog Richard Peto, filler gibi büyük memelilerin neden insanlardan daha az kanser olduğunu merak etti, hatta daha fazla hücreye sahip olmalarına rağmen? Peki bunun sebebi fillerin p53 yapabilen daha fazla genleri olduğu için olabilir mi?



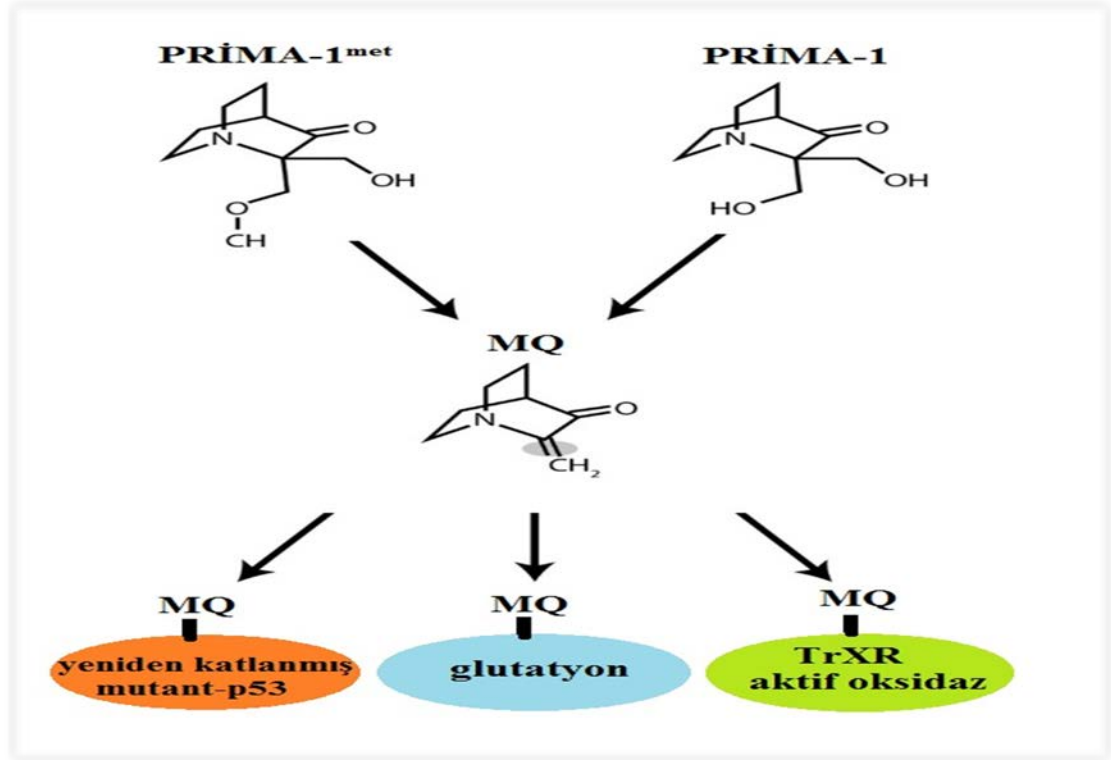
p53

- Diğer p53 kopyaları ile bağlantı kurulur.
- DNA'ya bağlanır.
- Hücrel yıkım veya onarım için genleri tetikler

Hücre başına düşen p53 geni sayısı

Şekil 2.13. Bağlandığı proteini stabilize eden ve DNA bağlama yeteneğini geri kazandıran ilaçlar için mutant proteinin özündeki cepler (Service 2016)

Gen ontolojisi analizi PRİMA-1^{met} 'in oksidatif strese cevap, gen ekspresyonu, hücre proliferasyonu, nitrosatif strese cevap ve glutasyon biyosentezi işlemi gibi yollarda değişikliklere neden olduğunu göstermiştir (Synnott vd. 2018). Şekil 2.14'te gösterildiği gibi, her iki bileşik de aktif kısım olan Michael Akseptör metilen küniklidinon (MQ) oluşturur. Bu dönüşüm kendiliğindendir ve fizyolojik pH'da birkaç saatlik bir zaman dilimi boyunca gerçekleşir (Lambert vd. 2009). MQ reaktif olduğu için, bir ön ilaç olarak uygulanması, çeşitli hücre dışı hedeflerle ek oluşumunu önlemek için önemlidir. Tiyol, hücrelerde herhangi bir oksidatif stres durumunun oluşumunu önlemede kritik role sahip sülfidril grubu içeren organik bileşiktir. Oksidatif hasara karşı hücrenin korunması işlevi düşük ağırlıklı tiyol ve sistein depoları ile gerçekleşmektedir. MQ, mutant p53'te tiyollere kovalent olarak bağlanır. MQ ayrıca, aktif bölgesinde tiyol glutasyon bulunan tiyoredoksin proteinini indirgeyen enzim tiyoredoksinin redüktaz (TrxR) ve serbest radikalleri nötralize ederek dokuları koruyan glutasyonu (GSH) hedefler. TrxR'ye MQ bağlanması, bu enzimi ROS üreten aktif bir oksidaza dönüştürür; glutatona MQ bağlanması ise, ayrıca ROS'u indükleyen intraselüler serbest glutasyonu da tüketir (Bykov vd. 2016). PRİMA-1^{met} / MQ, hem mutant p53'ü hem de hücrel redoks dengesini hedefler. Bu durum yapılan son çalışmalarda ortaya çıkan PRİMA-1^{met} ile kemoterapötik ilaçlar arasında oluşan sinerjinin kaynağını anlamamıza yardımcı olur.



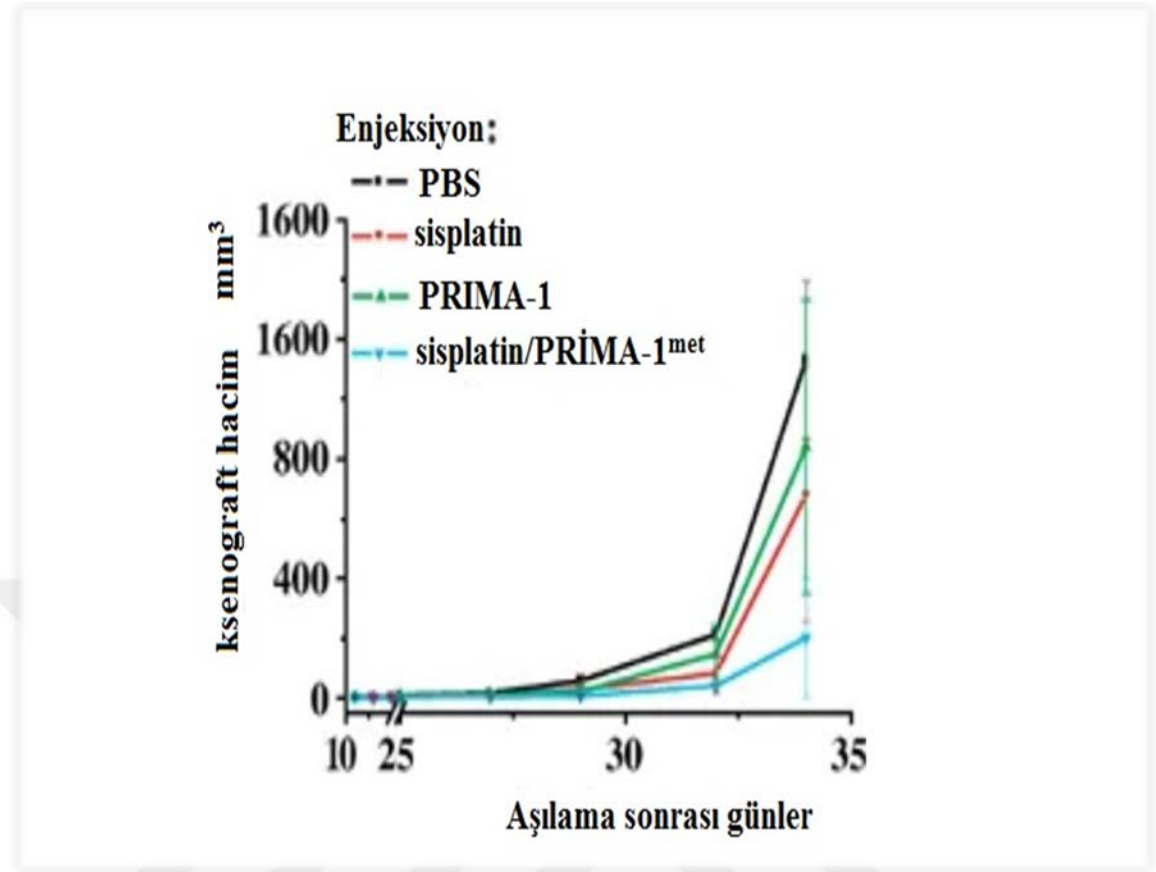
Şekil 2.14. PRİMA-1 ve PRİMA-1^{met}'in kimyasal yapıları (Bykov vd. 2016)

2.3.3. Kombine tedaviler ve PRİMA-1^{met} ile kemoterapötik ilaçların sinerjisi

Kanser tedavisinde; her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajlarının bulunması, kanserin kişiye özgü bir hastalık olması, tedavilerin kişiden kişiye farklılık gösterebilmesi nedeniyle tek bir kesin tedavi yönteminin varlığından bahsetmek imkansızdır. Bu sebeple tedavideki asıl amaç bu yöntemleri hastaya en çok yarar sağlayacak ve yan etkileri en az olacak şekilde kullanmaktır. Bazen tek bir tedavi yöntemi ile istenilen sonuç alınamaz ve çeşitli tedavi yöntemlerinin eş zamanlı olarak ya da belli bir sıra ile uygulanması gerekebilir. Kombinasyon tedavilerinin iki avantajı vardır; direnç gelişiminin önlenmesi ve toksisite riskine ulaşmadan terapötik indeksin yükseltilmesidir. Tümörlerin ve uzun süreli kanser tedavisinin etkili bir şekilde ortadan kaldırılması için önemli bir engel, terapi direncinin hızlı gelişimidir. Çoklu terapötik ajanların kombinasyon halinde kullanılması, ilaca dirençli kanserlerin tedavisinde birincil strateji haline gelmiştir. Genel olarak uygun ilaç kombinasyonu ile tedavinin sinerjik etkilerinin teşvik edebileceği, hedef seçiciliğini artırabileceği ve kanser ilacı direncinin gelişimini engelleyebileceği kabul edilmektedir (Hu vd. 2012).

Mutant p53 taşıyan tümörler genellikle kemoterapötik ilaçlara daha dirençlidir. Bu nedenle geleneksel antikanser ajanları, yeni hedeflenen ilaçlar ve deneysel ilaçlar arasındaki olası sinerjileri araştırmak önemlidir. Yapılan çalışmalarda, mutant p53'ü yeniden aktive eden bileşik PRİMA-1^{met}'in, tümör hücresi büyümesini inhibe etmek için çeşitli kemoterapötik ilaçlar ile sinerjistik olarak etki ettiği gösterilmiştir (Bykov 2016).

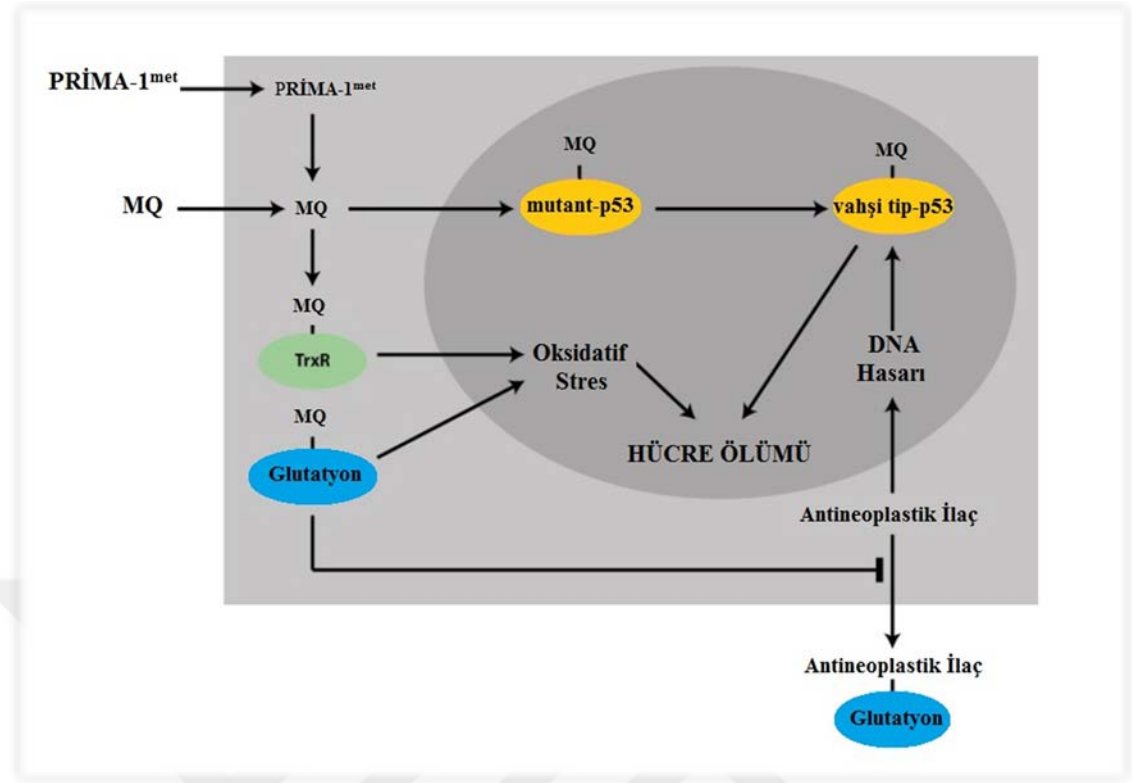
Yapılan çalışmalarda; Sisplatin ve PRİMA-1met ile kombine tedavi, tümör hücresi apoptozunun sinerjik bir uyarımına ve SCID farelerinde in vivo olarak insan tümör ksenograft büyümesinin inhibe edilmesine neden olmuştur (Şekil 2.15). Bu da gösteriyor ki; kemoterapötik ilaçlarla mutant P53 seviyelerinin indüksiyonunun, tümör hücrelerinin PRİMA-1met 'e duyarlılığını arttırması olasıdır. Dolayısıyla, PRİMA-1met 'in hali hazırda kullanılan kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonu, mutant-p53 taşıyan tümörlerin tedavisi için yeni ve daha etkili bir terapötik stratejiyi temsil edebilir (Bykov vd. 2005).



Şekil 2.15. Tek başına veya kombinasyon halinde cisplatin ve PRIMA-1^{met} ile tedavi edilen SCID farelerindeki H1299-His175 insan tümör ksenogreftleri için büyüme kinetiği (Bykov vd. 2005)

Sisplatin ve doksorubisin gibi kemoterapötik ilaçların neden olduğu DNA hasarı; vahşi tip-p53 aktivasyonu ve p53 kaynaklı apoptoz yoluyla büyük ölçüde tümör hücresi ölümüne neden olmaktadır. Buna göre, mutant-p53 taşıyan veya tamamen p53 içermeyen tümör hücreleri geleneksel kemoterapiye karşı daha dirençlidir. Bu, vahşi tip-p53 fonksiyonunun PRIMA-1^{met} ile restorasyonunun, örneğin cisplatin ile sinerjize olabileceğini gösterir. Sistemik uygulama üzerine, mutant-p53 taşıyan akciğer, yumurtalık ve özofagus kanseri hücrelerinde PRIMA-1^{met} ile cisplatin, 5-flüorourasil (5-FU) ve doksorubisin gibi kemoterapötik ilaçlar arasında *in vivo* olarak güçlü bir sinerji ortaya çıkmıştır (Bykov vd. 2005; Kobayashi vd. 2013; Mohell vd. 2015; Liu vd. 2015).

Şekil 2.16'te görüldüğü gibi PRIMA-1^{met}/MQ, hem mutant-p53'ü hem de hücrel redoks dengesini hedefler.



Şekil 2.16. PRIMA-1^{met} ve kemoterapötikler arasındaki sinerji (Bykov 2016)

PRIMA-1^{met} ve sisplatin ve doksorubisin gibi DNA'ya zarar veren kemoterapötik ilaçlar arasındaki çarpıcı sinerjinin birkaç nedeni açıklanmıştır. Bunlar:

- 1) Mutant p53'ün PRIMA-1^{met} ile vahşi tip fonksiyonuna restorasyonu, verimli tümör hücresi apoptozisinin indüklenmesi için vahşi tip p53'e bağlı kemoterapötik ilaçlara duyarlılığı artırması
- 2) Kemoterapötik ilaçlar tarafından mutant p53'ün birikiminin PRIMA-1^{met} 'in etkisini artırması
- 3) MQ (Michael Akseptör metilen küniklidinon) tarafından hücre içi GSH (glutasyon) miktarının tüketilmesinin, sisplatin gibi ilaçların akışını engellemesi;
- 4) TrxR (tiyoredoksinin redüktaz)'nin inhibisyonu ve enzimin aktif oksidaz haline dönüştürülmesinin ROS (reaktif oksijen türleri) seviyesini indükleyerek oksidatif stresi artırmasıdır (Bykov 2016).

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; PRIMA-1^{met} 'in hali hazırda kullanılan kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonu, ilaç direncinin gelişmesine karşı önemli stratejidir ve mutant p53 taşıyan tümörlerin tedavisi için yeni ve daha etkili bir terapötik stratejiyi temsil edebilir (Mohell vd. 2015). Bu nedenle çeşitli tümör tiplerinde ilgili

kemoterapötik ve hedefli ilaçlarla kombinasyon halinde klinik etkinliği değerlendirmek bundan sonraki daha ileri çalışmalar için önemli bir amaç olacaktır.

Yapılan literatür taramalarında, Etoposide ile kombinasyon halinde PRİMA-1^{met} tedavisinin mutant-p53 taşıyan Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (SCLC) hücrelerinde güçlü sinerji ile sonuçlandığı görülmüştür ancak Etoposide ile PRİMA-1^{met} kombinasyonunun NSCLC hücrelerindeki etkisi bilinmezliğini korumaktadır.

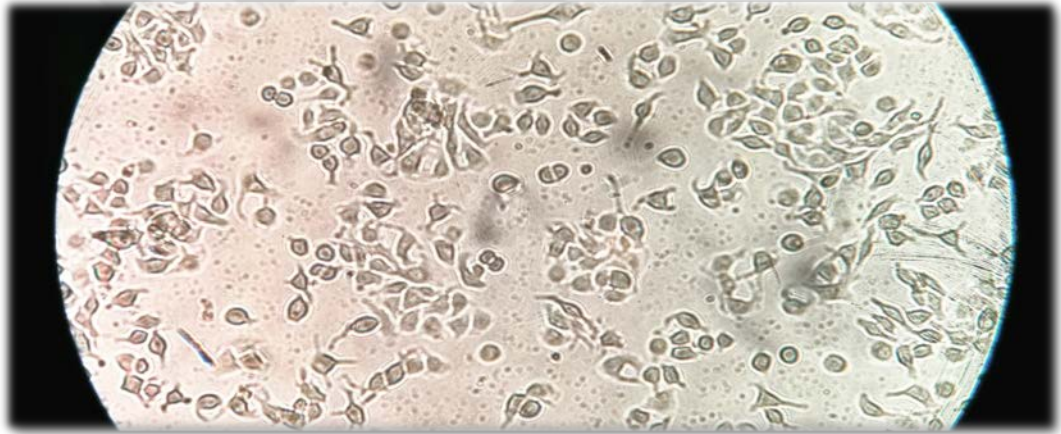
Tez kapsamında; model olarak seçilen *TP53* mutasyonları taşıyan NCI-H1975 (mutant-p53) ve *TP53* mutasyonu taşımayan A549 (vahşi tip-p53) insan NSCLC hücre hatlarında, daha önce araştırılması yapılmamış olan, Etoposide ile birlikte PRİMA-1^{met}'in antikanser etkisinin gösterilmesi amaçlanmaktadır. Bu bağlamda, Tez kapsamında elde edilecek bulguların PRİMA-1^{met} ile devam eden klinik çalışmalara güçlü bir destek sağlayabileceği umut edilmektedir.

3. MATERYAL VE METOT

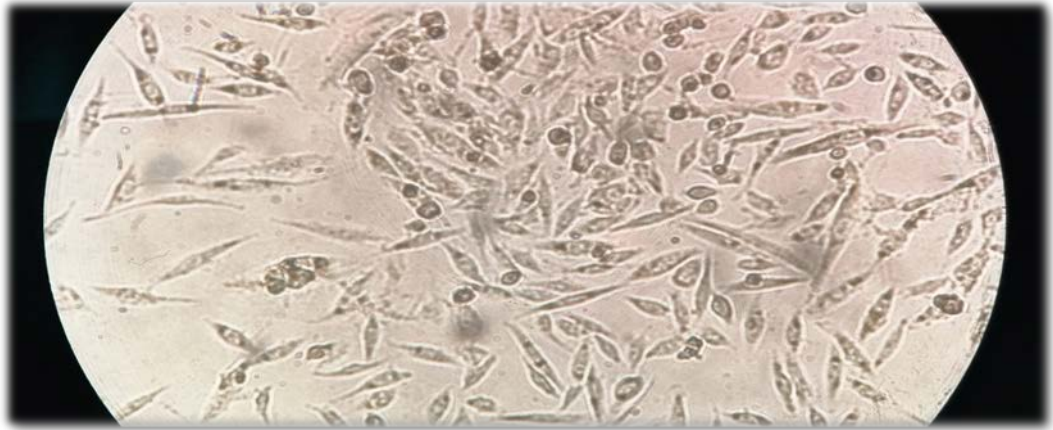
3.1. Hücre Kültürü

3.1.1. Hücreler ve inkübasyon koşulları

Tez kapsamındaki deneylerde Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection, ATCC)'ndan temin edilen ve Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Kanser Moleküler Biyolojisi Laboratuvarı'nda -80 °C derin dondurucuda muhafaza edilen insan akciğer kanseri A549 (ATCC® CCL-185™) hücre hattının 15. pasajı ve NCI-H1975 (ATCC® CRL-5908™) hücre hattının 4. pasajı açılarak kullanıldı. Hücreler 90x15mm'lik petrilerin içinde, %10 FBS (Fetal Sığır Serum) ve %1 antibiyotik karışımı (Penicilin Streptomycin) içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) besiyerinde, %5 CO₂'li atmosfere sahip etüvde 37 °C'de steril şartlarda inkübe edildi. Kültür edilen hücrelerin morfolojik gözlemi inverted mikroskopta yapıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. A549 hücrelerinin 20X objektifteki morfolojisi



Şekil 3.2. NCI-H1975 hücrelerinin 20X objektifteki morfolojisi

3.1.2. Besiyerlerinin hazırlanması

Deneylerde %10 FBS içeren ve %1 FBS içeren olmak üzere iki farklı besiyeri kullanıldı.

3.1.2.1. %10 FBS içeren besiyeri hazırlanması

500 mL DMEM kültür mediumu içine; 50 mL FBS, 5 mL antibiyotik çözeltisi, 2,5 mL sodyum pirüvat, 5 mL esansiyel olmayan amino asit solüsyonu eklenerek iyice karışması sağlandı, üzerine yüzde kaçık olduğu ve o günün tarihi not edilerek +4 °C de muhafaza edildi.

3.1.2.1. %1 FBS içeren besiyeri hazırlanması

500 mL DMEM kültür mediumu içine; 5 mL FBS, 5 mL antibiyotik çözeltisi, 2,5 mL sodyum pirüvat, 5 mL esansiyel olmayan amino asit solüsyonu eklenerek iyice karışması sağlandı, üzerine yüzde kaçık olduğu ve o günün tarihi not edilerek +4 °C de muhafaza edildi.

3.1.3. Hücrelerin tripsinasyonu ve pasajlanmaları

İnkübasyondaki hücreler, petrilerin zeminini %80 ile %100 arasında kapladığında (confluence) 1:2 veya 1:3 oranında pasajlandı. Bu amaçla öncelikle etüvdeki petriler kabine alınıp içindeki fenol kırmızısı iyice azalmış 10 mL'lik besiyerleri, 5 mL'lik ve 10 mL'lik steril pipetler kullanılarak uzaklaştırıldı. Zemine yapışan hücrelerin kalkması için petrilere % 0.25 tripsin, %0.03 EDTA karışımından 2mL eklenip 10 dk bekletildi. Hücreler zeminden kaldırıldıktan sonra, tripsinin inhibisyonu için, petrilerin içine eklediğimiz tripsin-EDTA solüsyonunun iki katı kadar besiyeri ilave edilip oluşan hücre süspansiyonu 50 mL'lik falkonlara aktarıldı. Falkonlardaki hücre süspansiyonları +4 °C, 1000 rpm'de 5 dk'lık santrifüj işlemine tabi tutuldu. Daha sonra falkondaki dökelti (süpernatant) kısım uzaklaştırılarak geriye kalan hücre peleti üzerine %10 FBS'li taze besiyeri ilave edilip, her bir petride 10 mL besiyeri bulunacak şekilde, hücreler yeni petrilere aktarıldı.

Pasajlanan hücreler etüvde yeniden inkübasyona bırakıldı.

3.1.4. Hücrelerin dondurulma işlemleri

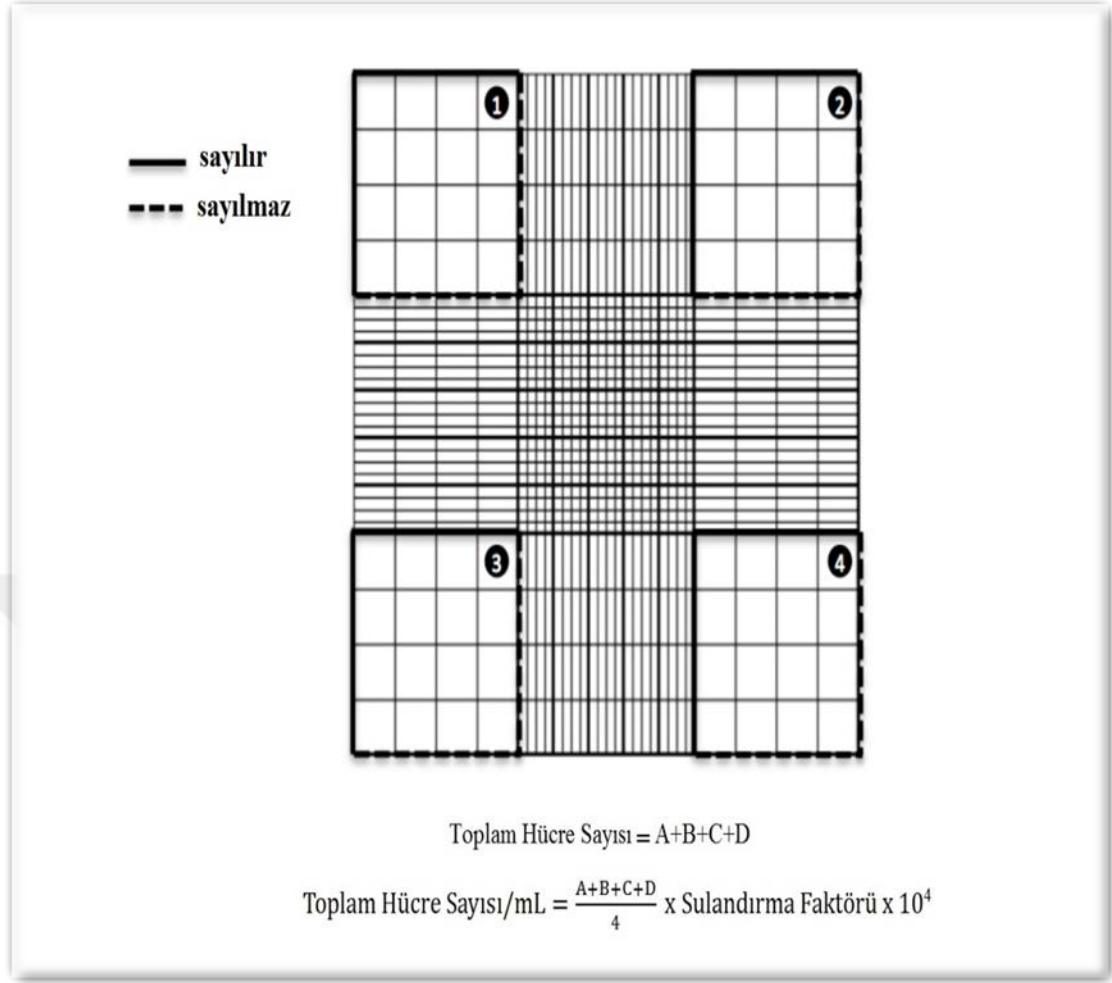
Kullanılmayan hücreler etüvden kabine alınıp tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırıldıktan sonra santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süpernatant kısımları uzaklaştırılarak hücre peletinin üzerine dondurma mediumu eklendi. Oluşan hücre süspansiyonu ependorf tüplere 1'er mL eklenerek -20 °C'lik derin dondurucuda bir gün bekletilip daha sonra -80 °C'lik derin dondurucuda ihtiyaç halinde kullanılmak üzere muhafaza edildi.

3.1.4.1. Dondurma mediumu hazırlanması

50 mL'lik dondurma mediumu için; 50 mL'lik falkon içine 47,5 mL FBS ve 2,5 mL DMSO (dimetil sülfatoksit) eklenerek karıştırıldı. DMSO'nun ışığa maruz kalmaması için falkonun üzeri ışık geçirmez folyo ile kaplanarak gerektiğinde kullanılmak üzere +4 °C'ye kaldırıldı.

3.2. Hücre Sayılarının Belirlenmesi ve Hücrelerin Deney Grupları İçin Bölünmesi

Tripsinasyon ve santrifüj işlemi sonrası falkon tüp içerisindeki hücre peletinin üzerine %10 FBS içeren besiyeri eklenerek 10 mL'lik hücre ana stoğu oluşturuldu. Bu 10 mL'lik hücre ana stoğunun 1mL'sinde kaç hücre vardır bulmak için Şekil 3.2'deki thoma lamı (hemositometre) yöntemi kullanıldı. Bunun için; hücre ana stoğundan 10 kat sulandırılarak (900 µL %10 FBS içeren besiyeri + 100 µL hücre ana stoğu) ependorf tüpe, hücre numunesi alındı. Bu numune, 16 karelik 4 bölgenin bulunduğu thoma lamına yayılarak, bu bölgelerde bulunan hücrelerin invert mikroskopunun 40X objektifinde sayımı yapıldı. Tüm bölgelerdeki hücre sayısı toplamı, bölge sayısına bölünerek ortalama hücre sayısı bulundu. Ortalama hücre sayısı sulandırma katsayısı ve 10^4 ile çarpılarak 1 mL'deki toplam hücre sayısına ulaşıldı.



Şekil 3.3. Thoma lamı yöntemi

3.2.1. Hücrelerin sitotoksite deneyleri için 96 kuyucuklu steril plaklara bölünmesi

Thoma lamı yöntemiyle hücre sayısı belirlenen hücre ana stoğu seyreltilerek 1 mL'sinde 10^5 yani $10^4/100\mu\text{L}$ hücre bulunan yeni bir stok hazırlandı ve 96 kuyucuklu plaklara kuyucuk başına 10^4 hücre olacak şekilde bölündü.

3.2.2. Hücrelerin tripan mavisi testi için petrilere bölünmesi

Thoma lamı yöntemiyle hücre sayısı belirlenen hücre ana stoğu seyreltilerek, $10^5/\text{mL}$ hücre bulunan yeni bir hücre stoğu hazırlandı ve iki tekrarlı olacak şekilde 60mm x15mm' lik 4 adet küçük petriye 3'er mL olacak şekilde bölündü.

3.3. İlaç Dozlarının Belirlenmesi ve Uygulanması

3.3.1. Etoposide ve PRİMA-1^{met} dozlarının hazırlanması ve uygulanması

Etoposide, %1 FBS içeren besiyeri içerisinde çözülerek 50 μ M stok solüsyon olarak, Prima-1^{met} ultrapure su içerisinde 1000 μ M stok solüsyon olarak hazırlandı. Yapılan literatür taraması sonucunda Etoposide için 10-50 μ M (Ko vd. 2015), Prima-1^{met} için 5-50 μ M arasındaki dozlar kullanılarak sitotoksik etki araştırıldı (Magrini vd. 2008). Etoposide dozları E1, E2, E3 ve E4 için sırasıyla 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M ve 50 μ M; PRİMA-1^{met} dozları P1, P2, P3, P4 ve P5 için sırasıyla 5 μ M 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M ve 50 μ M seçildi. Seçilen dozlar %1 FBS içeren besiyerlerinde seyreltilerek oluşturuldu.

Çizelge 3.1. Plaklardaki doz grupları

—	—	—	—	—	—	—	Boş	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	Boş	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Time 0	Kontrol Grubu	P1 Dozu	P2 Dozu	P3 Dozu	P4 Dozu	P5 Dozu	—	E1 Dozu	E2 Dozu	E3 Dozu	E4 Dozu
Time 0	Kontrol Grubu	P1 Dozu	P2 Dozu	P3 Dozu	P4 Dozu	P5 Dozu	—	E1 Dozu	E2 Dozu	E3 Dozu	E4 Dozu
Time 0	Kontrol Grubu	P1 Dozu	P2 Dozu	P3 Dozu	P4 Dozu	P5 Dozu	—	E1 Dozu	E2 Dozu	E3 Dozu	E4 Dozu
Time 0	Kontrol Grubu	P1 Dozu	P2 Dozu	P3 Dozu	P4 Dozu	P5 Dozu	—	E1 Dozu	E2 Dozu	E3 Dozu	E4 Dozu
Time 0	Kontrol Grubu	P1 Dozu	P2 Dozu	P3 Dozu	P4 Dozu	P5 Dozu	—	E1 Dozu	E2 Dozu	E3 Dozu	E4 Dozu

96 kuyucuklu plaklara (11x5 kuyucuk) bölünen hücrelerin, 24 saatlik inkübasyondan sonra, üzerlerindeki %10 FBS içeren besiyerleri 200 μ L'lik çoklu mikropipetler vasıtasıyla uzaklaştırıldı. Çizelge 3.1'de gösterildiği gibi oluşturulan gruplardan time 0 ve kontrol grubundaki hücrelere %1 FBS içeren besiyerinden 200'er μ L eklenip diğer gruplara PRİMA-1^{met} ve Etoposide dozları 200'er μ L uygulandı. 2 adet boş kuyucuğa arkaplan okuması almak için 200 μ L %1 FBS içeren besiyeri eklendi.

3.3.2. Etoposide ve PRİMA-1^{met} kombinasyonlarının uygulanması

Birinci deney grubundan elde edilen veriler doğrultusunda Prima-1^{met}'in P1, P2, P3 ve P4; Etoposide'nin E1 ve E2 dozlarının kombinasyonları seçildi.

96 kuyucuklu plaklara (8x10 kuyucuk) bölünen hücrelerin, 24 saatlik inkübasyonundan sonra üzerlerindeki %10 FBS içeren besiyerleri uzaklaştırıldı. Çizelge 3.2'de gösterildiği şekilde oluşturulan gruplardan time 0 ve kontrol gruplarına %1 FBS içeren besiyerinden 200'er µL, kombinasyon gruplarına da önce Etoposide dozları uygulandı. 24 saat sonra Etoposide dozları uzaklaştırılarak PRİMA-1^{met} dozları uygulandı. Arkaplan okuması almak için adet boş kuyucuğa 200 µL %1 FBS içeren besiyeri eklendi.

Çizelge 3.2. Plaklardaki kombinasyon grupları

Time 0	Kontrol Grubu	P1+E2	P1+E3	P2+E2	P2+E3	P3+E2	P3+E3	P4+E2	P4+E3	—	—
Time 0	Kontrol Grubu	P1+E2	P1+E3	P2+E2	P2+E3	P3+E2	P3+E3	P4+E2	P4+E3	—	—
Time 0	Kontrol Grubu	P1+E2	P1+E3	P2+E2	P2+E3	P3+E2	P3+E3	P4+E2	P4+E3	—	—
Time 0	Kontrol Grubu	P1+E2	P1+E3	P2+E2	P2+E3	P3+E2	P3+E3	P4+E2	P4+E3	—	—
Time 0	Kontrol Grubu	P1+E2	P1+E3	P2+E2	P2+E3	P3+E2	P3+E3	P4+E2	P4+E3	—	—
Time 0	Kontrol Grubu	P1+E2	P1+E3	P2+E2	P2+E3	P3+E2	P3+E3	P4+E2	P4+E3	—	—
Time 0	Kontrol Grubu	P1+E2	P1+E3	P2+E2	P2+E3	P3+E2	P3+E3	P4+E2	P4+E3	—	—
Time 0	Kontrol Grubu	P1+E2	P1+E3	P2+E2	P2+E3	P3+E2	P3+E3	P4+E2	P4+E3	Boş	Boş

3.4. WST-1 Hücre Proliferasyon Testi Uygulanması

WST-1 testinde canlı hücrelerdeki metabolik aktivite, hücrelerin WST-1'i parçalayarak çözülebilir formazan tuzları oluşturması ile ölçülür. Oluşan formazan renk değişimini beraberinde getirir. Yani canlı hücreler renk değişimi meydana getirirken ölü hücreler renk değişimine neden olmazlar (Şekil 3.2). Oluşan renk değişimi kolorimetrik olarak ölçülür.

İlaç uygulamasının hemen ardından ilk sıradaki kuyucuklardaki hücre canlılığı saptandı (sıfırinci zaman). İnkübasyon süresi 24, 48 ve 72 saatlik periyotlar olarak

belirlendi. İnkübasyon süreleri sonunda ışısız ortamda kuyucuklara WST-1 karışımından 10 μ M eklenerek 37 °C’de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda örneklerin absorbsansları ELISA mikropalak okuyucu (Thermo Scientific Multiscan Go ELISA Plate Reader)’da 450 nm dalga boyunda okunarak kaydedildi.

3.5. Tripan Mavisiyle mL’deki Canlı ve Ölü Hücre Sayılarının Belirlenmesi

Yukarıda belirtilen test sonuçlarını desteklemek amacı ile hücre canlılığını doğrudan mikroskopik olarak belirleyebilmeyi sağlayan Tripan Mavisi Testi kullanıldı. Hücrelerin canlılığı, hücre içine tripan mavisi alınıp alınmadığına bağlı olarak gözlenen renk ile değerlendirildi. Membran hasarı olan hücreler boyayı aldıkları için mavi renkte gözlenirken canlı hücreler boyayı almadıkları için şeffaf renkte görüldü. Canlı hücrelerin miktarı Thoma Lamı yöntemi ile hesaplandı. Canlı hücre yüzdesi için; canlı hücre sayısı toplam hücre sayısına oranlanarak 100 ile çarpıldı.

Çizelge 3.3. Tripan mavisi testi için petrilerin gruplandırılması

Kontrol	P1	P1+E2	P1+E3
Kontrol	P1	P1+E2	P1+E3

Tripn Mavisi Testi için hücreler 3×10^5 hücre/petri olacak şekilde 8 adet petriye bölünüp 24 saat sonra besi yeri uzaklaştırılarak, önce Etoposide’nin E2 (20 μ l) ve E3 (40 μ l) dozu daha sonra PRİMA-1^{met}’in P1 (5 μ l) dozu Çizege 3.3’deki gibi iki tekrarlı olacak şekilde petrilere uygulandı. 24 ve 72 saat sonunda besi yerleri toplanarak +4 °C, 1000 rpm’de 2 dk döndürülerek çöktürölüp süpernatant uzaklaştırıldı. Petrilerin üzerine 500 μ l Tripsin-EDTA eklenerek hücreler kaldırıldı, üzerine 1mL besiyeri ilave edilerek falkon tüpteki ölü hücre peletinin üzerine eklendi. Karışım 1500 rpm’de 2 dk daha santrifüj edilerek çöktürölldü. Süpernatant uzaklaştırılıp peletler 500 μ l besiyerinde çözüldü. Ependorf tüpe 200 μ l numune alınarak içine 200 μ l tripan mavisi eklenip iyice karışması sağlandı. Örnekler içindeki canlı ve ölü hücre sayıları ışık mikroskobu altında 40X büyütmede hemositometre kullanılarak belirlendi.

3.6. İstatistiksel Analizler

Deneylerden elde edilen tüm veriler ortalama $\pm$ SEM değerleri halinde kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testiyle değerlendirildi. Kontrol grubu ile tüm deney grupları arasındaki farklılık, GraphPad Instat 3 istatistik programında Tek Yönlü Anova Testi ve ardından Tukey Çoklu

Karşılaştırma Testi kullanılarak değerlendirildi. $p < 0,05$, $p < 0,01$ ve $p < 0,001$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm grafikler, Sigma Plot 10.0 programında, ortalama $\pm$ SEM değerleri kullanılarak çizildi.

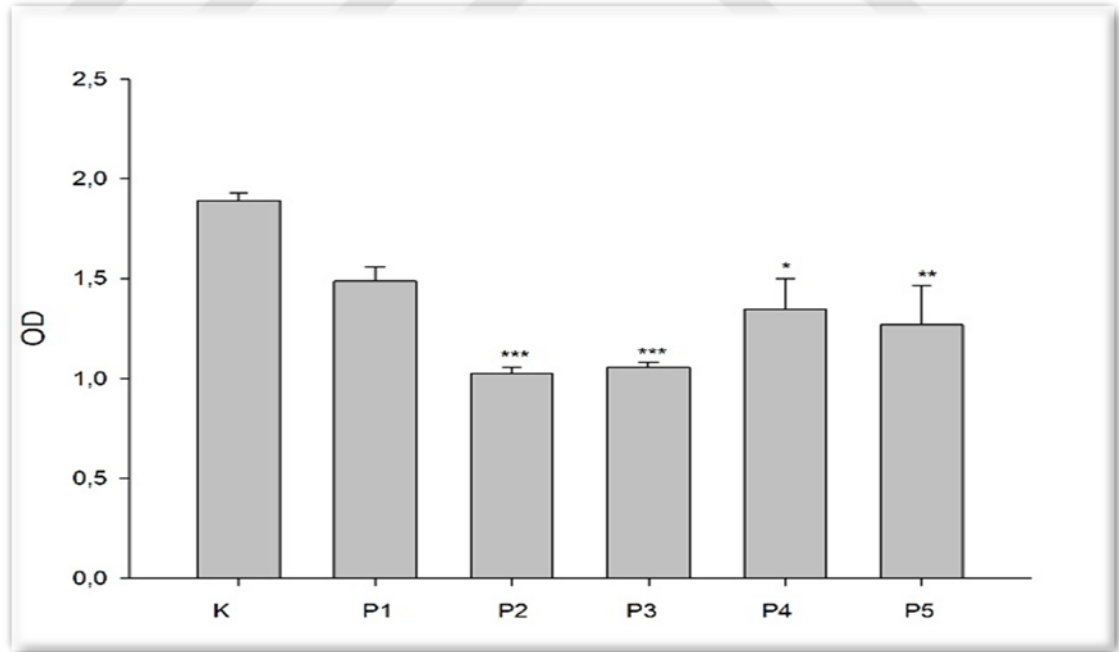


4. BULGULAR

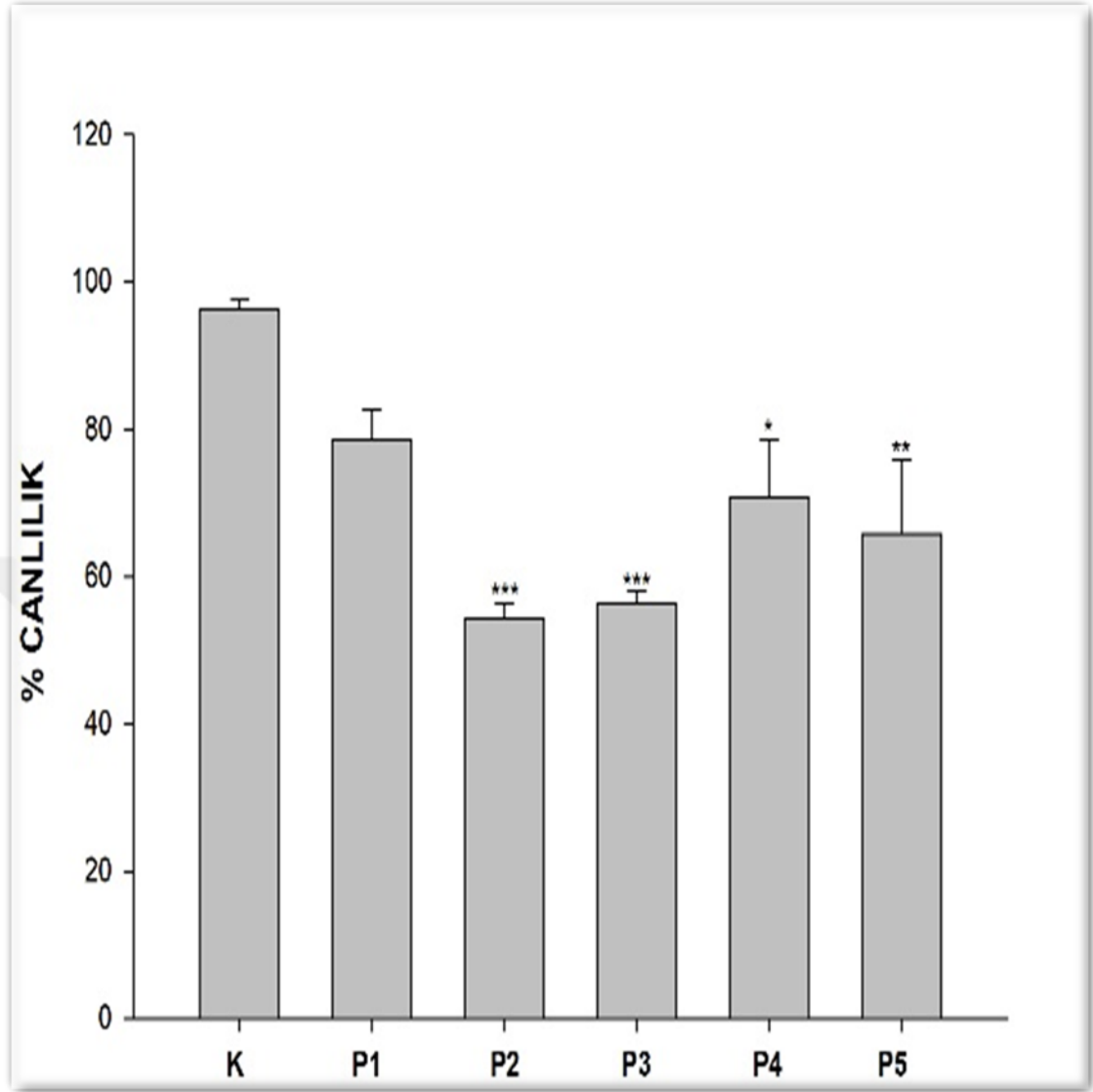
4.1. PRİMA-1^{met}'in A549 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisine İlişkin Bulgular

Sitotoksikite denemeleri için PRİMA-1^{met}'in daha önceki çalışmalarda kullanılan 5 farklı dozu seçildi. Çalışma boyunca bu dozlar P1-P5 olarak isimlendirildi. P1 dozu 5µM, P2 dozu 10 µM, P3 dozu 20 µM, P4 dozu 40 µM ve P5 dozu 50 µM'ı ifade etmektedir. Sitotoksikite deneyleri için bu dozlar, 96 kuyucuklu steril plaklara 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde bir gün önceden bölünen hücrelere uygulandı ve 24, 48 ve 72. saatlerdeki sonuçlar değerlendirildi. Her bir deney beş tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız olarak en az iki kez tekrarlandı. PRİMA-1^{met} A549 hücre hattı üzerinde her bir inkübasyon süresi için farklı dozlarda sitotoksik etkiler sergiledi.

24 saatlik inkübasyon sonunda; PRİMA-1^{met}'in P1-P5 dozları uygulanan kuyucuklardan elde edilen ortalama absorbans değerleri (OD₄₅₀) Şekil 4.1'de verildi. Aynı deney için PRİMA-1^{met}'in hücre canlılığına etkisi değerlendirildi. Bunun için absorbans değerleri kontrol absorbans değerine oranlandı ve yüzde canlılık değerleri hesaplandı ($OD_{\text{örnek}} / OD_{\text{kontrol}} \times 100$). Buna göre; 24. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri P1 için 78.6 ± 4.067 ; P2 için 54.3 ± 2.071 ; P3 için 56.3 ± 1.838 ; P4 için 70.7 ± 7.915 ve P5 için 65.7 ± 10.112 olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda 24. saatte kontrole oranla en fazla sitotoksik etki P2 ve P3 ($p < 0.001$) dozlarında görüldü (Şekil 4.2).

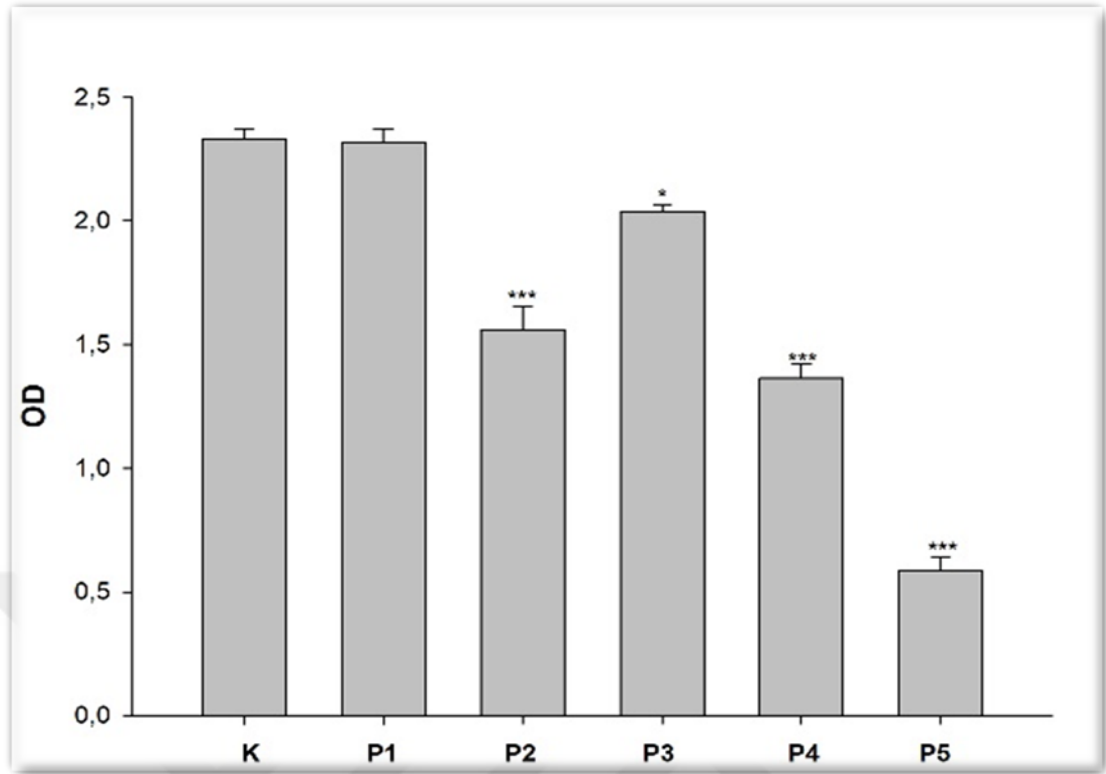


Şekil 4.1. PRİMA-1^{met}'in 24. saatteki absorbans değerleri (*: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ ve ***: $p < 0.001$)

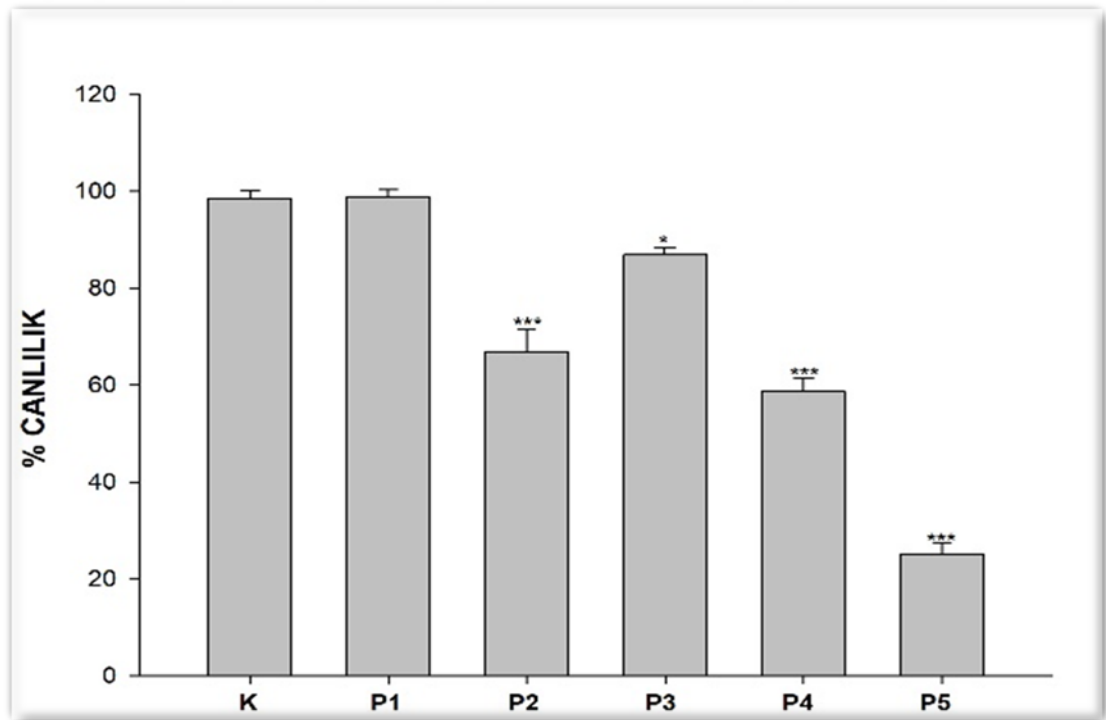


Şekil 4.2. PRİMA-1^{met}'in 24. saatteki hücre canlılığına etkisi (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ ve ***: $p < 0,001$)

P1-P5 dozları uygulanan kuyucuklardan elde edilen 48. saatteki ortalama absorbands değerleri Şekil 4.3'de verildi. PRİMA-1^{met}'in 48. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri P1 için $98,8 \pm 1,504$; P2 için $66,9 \pm 4,525$; P3 için $86,9 \pm 1,494$; P4 için $58,6 \pm 2,841$ ve P5 için $25,1 \pm 2,223$ olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda 48. saatte kontrole oranla en fazla sitotoksik etki P2, P4 ve P5 ($p < 0,001$) dozlarında görüldü (Şekil 4.4).

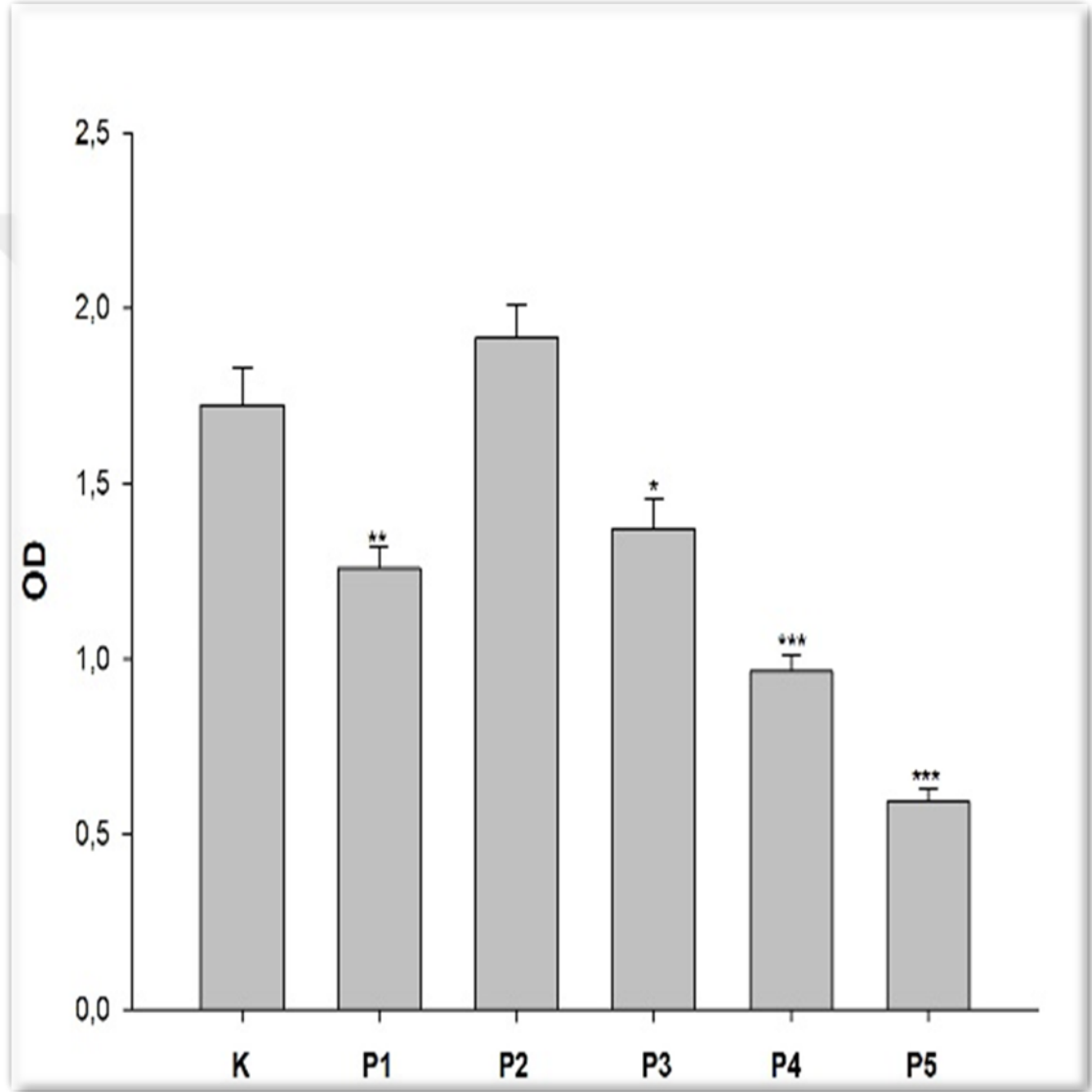


Şekil 4.3. PRİMA-1^{met}'in 48. saatteki absorbands değerleri (*: $p < 0,05$ ve ***: $p < 0,001$)

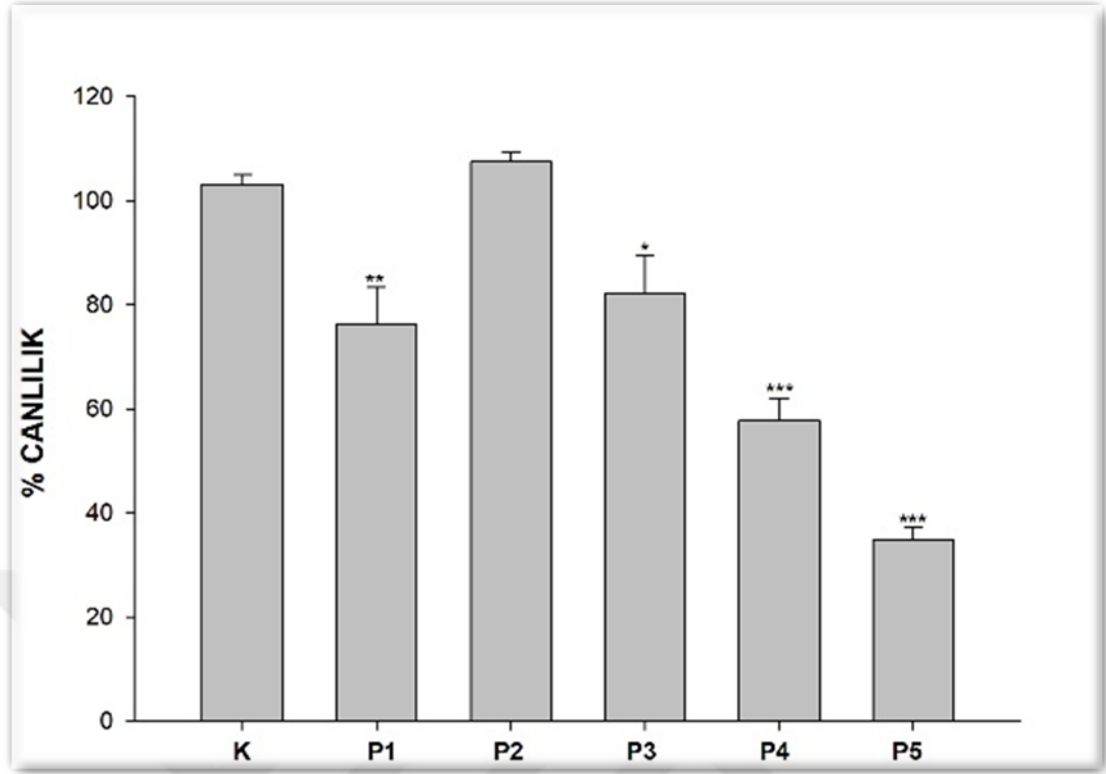


Şekil 4.4. PRİMA-1^{met}'in 48. saatteki hücre canlılığına etkisi (*: $p < 0,05$ ve ***: $p < 0,001$)

72 saatlik inkübasyon sonunda; P1-P5 dozları uygulanan kuyucuklardan elde edilen ortalama absorbans değerleri Şekil 4.5’de verildi. PRİMA-1^{met}’in 72. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri P1 için %76,2±7,136; P2 için %107,4±1,904; P3 için %82,1±7,244; P4 için %57,7±4,333 ve P5 için %34,8±2,299 olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda 48. saatte kontrole oranla en fazla sitotoksik etki P2, P4 ve P5 (p<0,001) dozlarında görüldü (Şekil 4.6).



Şekil 4.5. PRİMA-1^{met}’in 72. saatteki absorbans değerleri (*: p<0,05; **: p<0,01 ve ***: p<0,001)

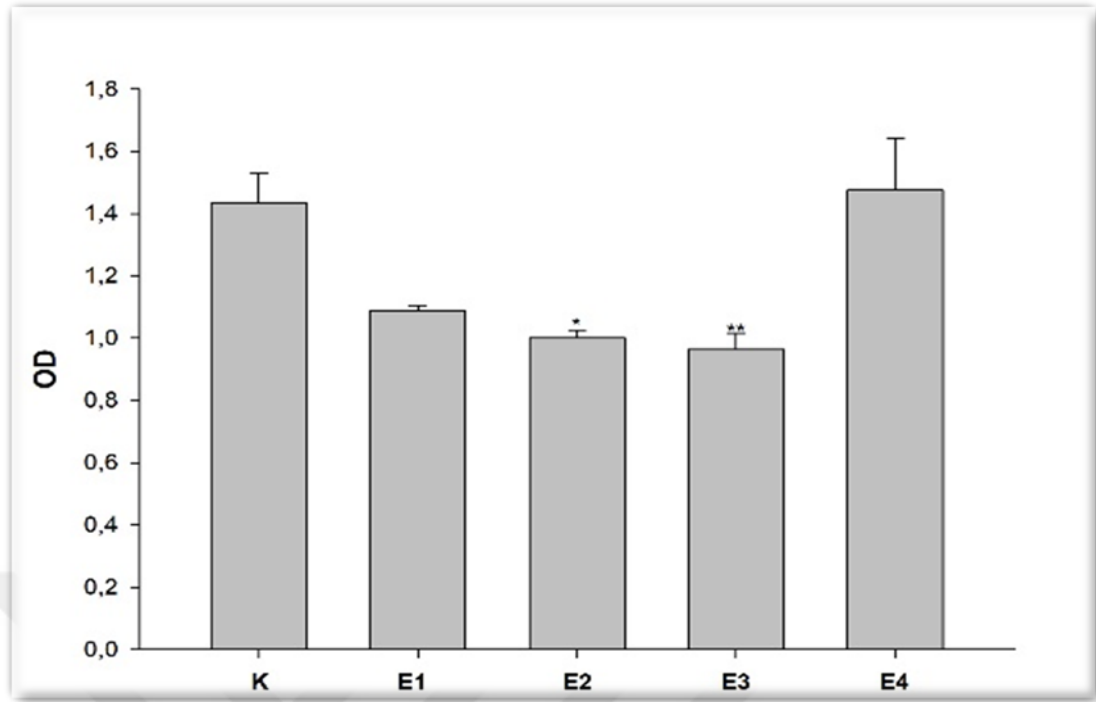


Şekil 4.6. PRIMA-1^{met}'in 72. saatteki hücre canlılığına etkisi (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$ ve ***: $p<0,001$)

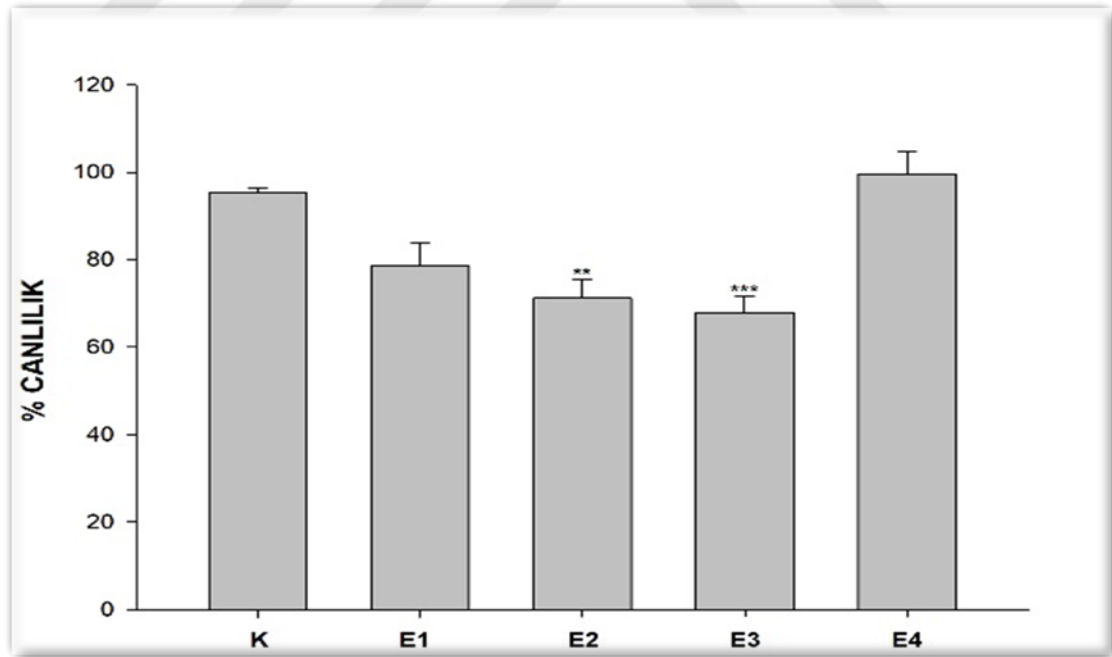
4.2. Etoposide'nin A549 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisine İlişkin Bulgular

Sitotoksikite denemeleri için Etoposide'nin daha önceki çalışmalarda kullanılan 4 farklı dozu seçildi. Çalışma boyunca bu dozlar E1-E4 olarak isimlendirildi. E1 dozu 10 μ M, E2 dozu 20 μ M, E3 dozu 40 μ M ve E4 dozu 50 μ M'ı ifade etmektedir. Sitotoksikite deneyleri için bu dozlar, 96 kuyucuklu steril plaklara 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde bir gün önceden bölünen hücrelere uygulandı ve 24, 48 ve 72. saatlerdeki sonuçlar değerlendirildi. Her bir deney beş tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız olarak en az iki kez tekrarlandı. Etoposide A549 hücre hattı üzerinde her bir inkübasyon süresi için farklı dozlarda sitotoksik etkiler sergiledi.

E1-E4 dozları uygulanan kuyucuklardan elde edilen 24. saatteki ortalama absorbans değerleri Şekil 4.7'de verildi. Aynı deney için yüzde canlılık değerleri hesaplanarak, Etoposide'nin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi değerlendirildi. Buna göre; 24. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri E1 için $78,6 \pm 5,222$; E2 için $71,2 \pm 4,346$; E3 için $67,9 \pm 3,752$ ve E4 için $99,6 \pm 5,177$ olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda 24. saatte kontrole oranla en fazla sitotoksik etki E2 ($p<0,01$) ve E3 ($p<0,001$) dozlarında görüldü (Şekil 4.8).

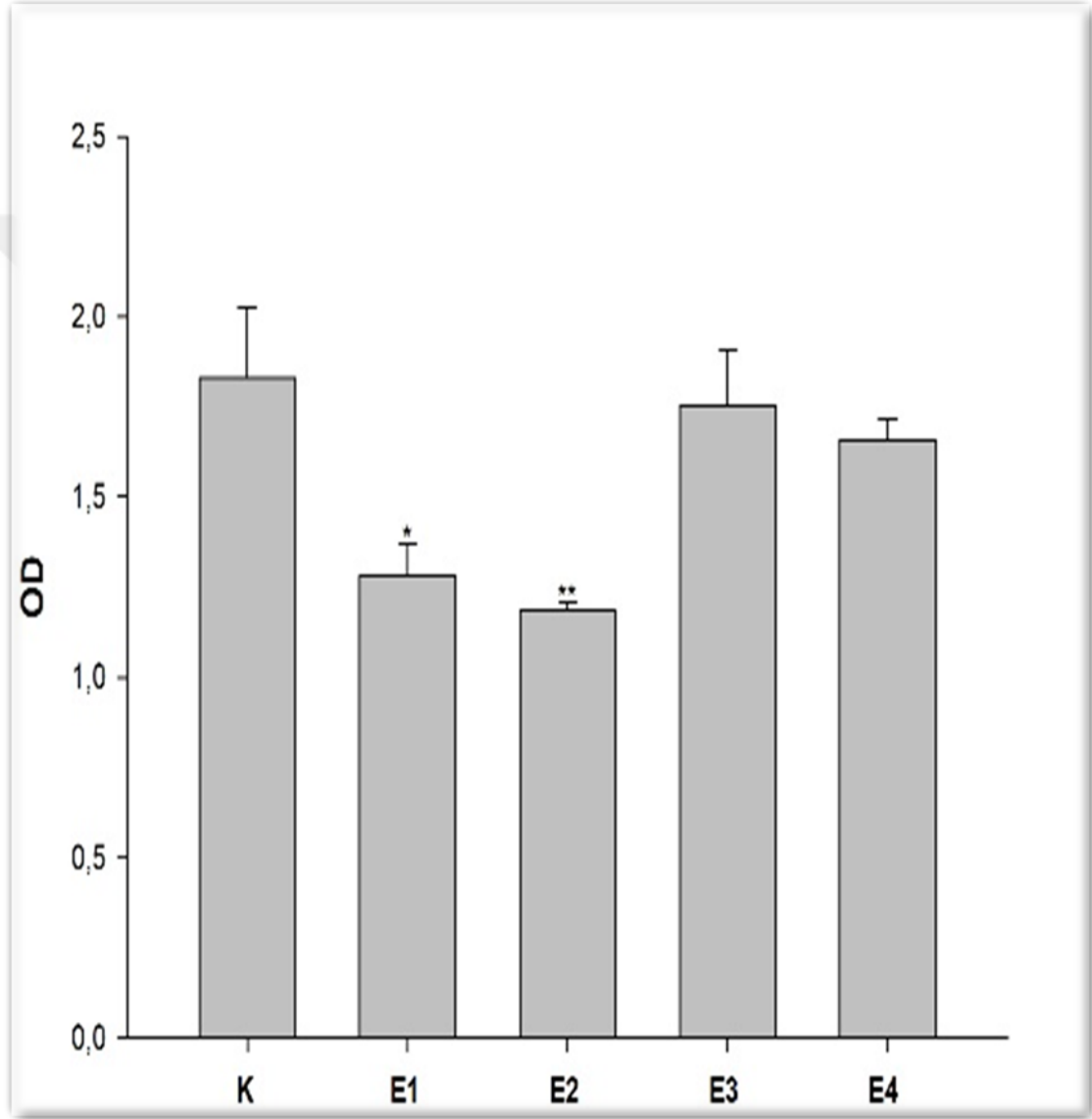


Şekil 4.7. Etoposide'nin 24. saatteki absorbans değerleri (*: $p < 0,05$ ve **: $p < 0,01$)

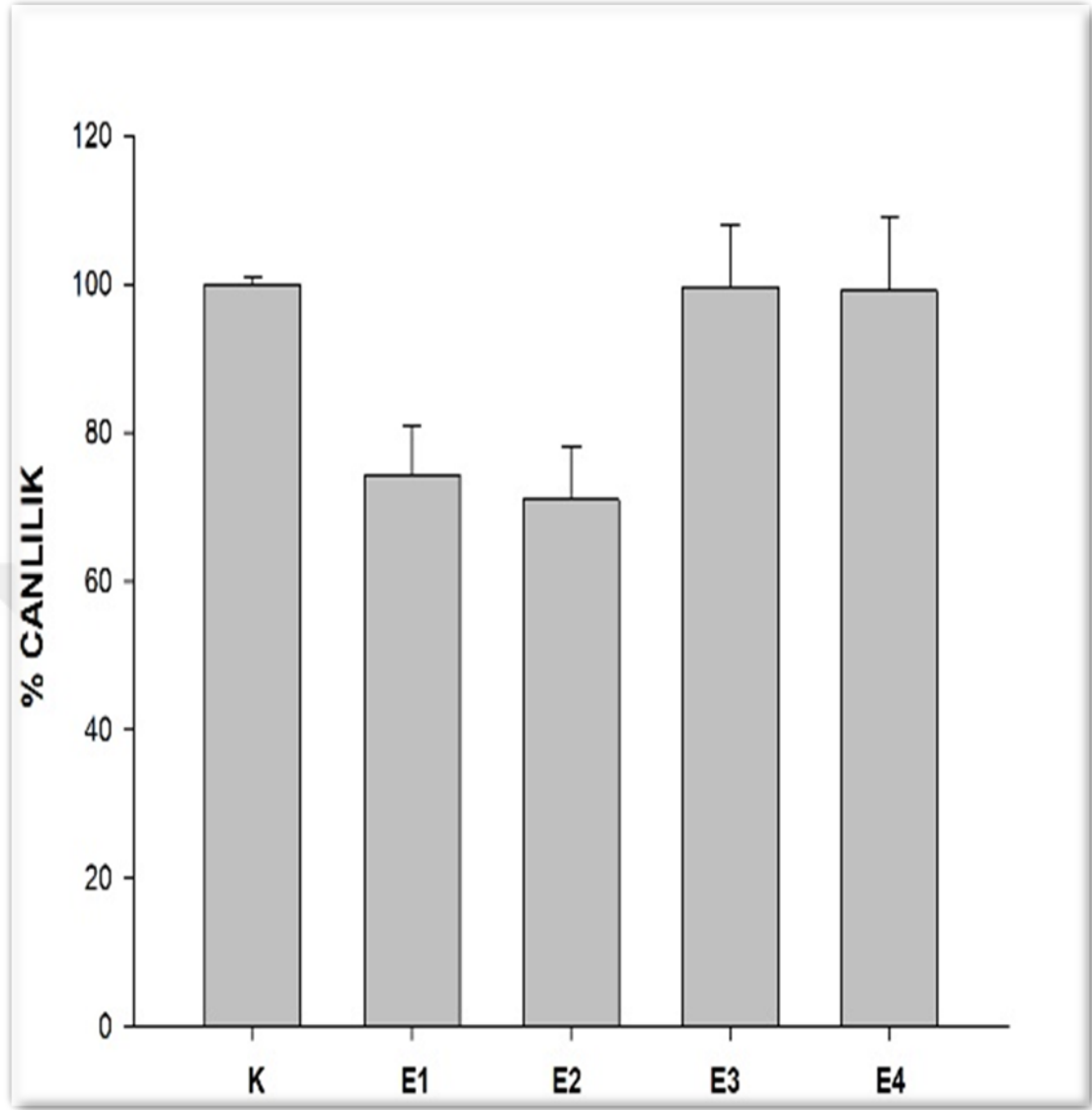


Şekil 4.8. Etoposide'nin 24. saatteki hücre canlılığına etkisi (**: $p < 0,01$ ve ***: $p < 0,001$)

48 saatlik inkübasyon sonunda; E1-E4 dozları uygulanan kuyucuklardan elde edilen ortalama absorbans değerleri Şekil 4.9’da verildi. Etoposide’nin 48. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri E1 için $74,2 \pm 6,656$; E2 için $71 \pm 7,022$; E3 için $99,6 \pm 8,292$ ve E4 için $99,1 \pm 9,987$ olarak bulundu. Etoposide’nin 48. saatteki sitotoksik etkisine bakıldığında, kontrol grubu ile uygulanan dozlar arasında anlamlı derecede bir fark görülmedi (Şekil 4.10).

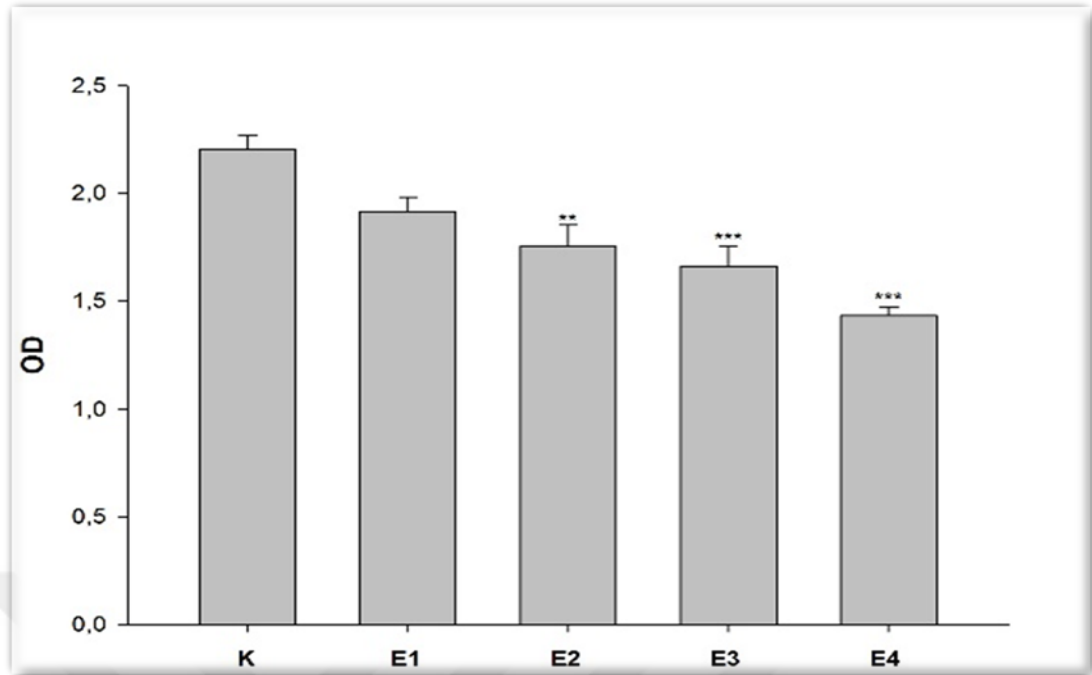


Şekil 4.9. Etoposide’nin 48. saatteki absorbans değerleri (*: $p < 0,05$ ve **: $p < 0,01$)

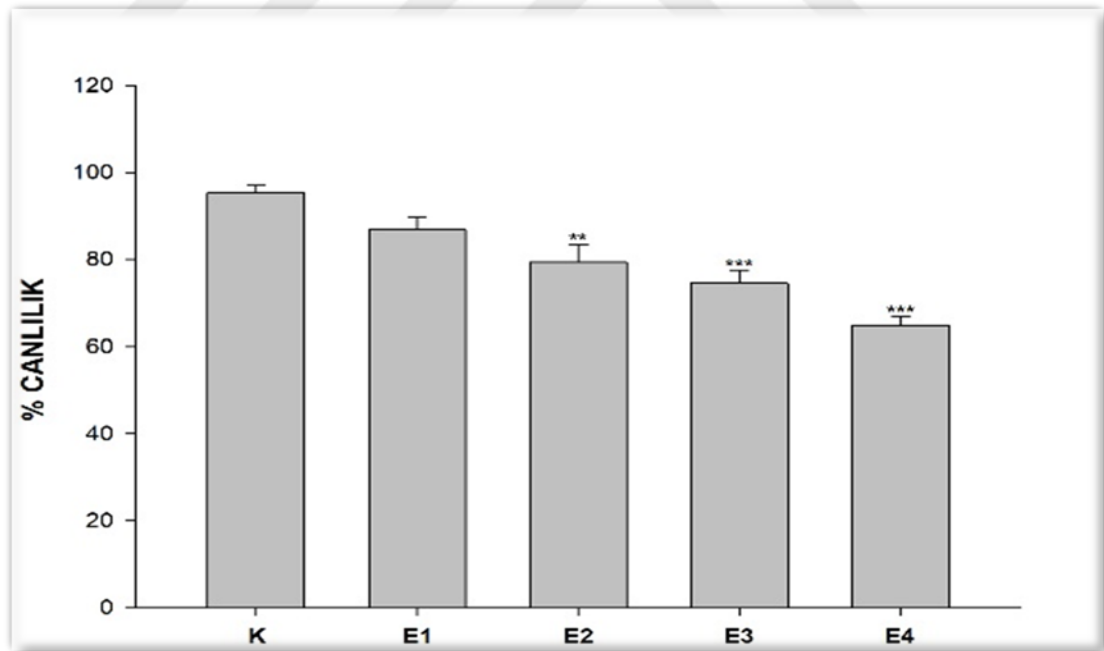


Şekil 4.10. Etoposide'nin 48. saatteki hücre canlılığına etkisi

E1-E4 dozları uygulanan kuyucuklardan elde edilen 72. saatteki ortalama absorbans değerleri Şekil 4.11'de verildi. Aynı deney için yüzde canlılık değerleri hesaplanarak, Etoposide'nin A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi değerlendirildi. Buna göre; 72. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri E1 için $86,8 \pm 2,898$; E2 için $79,3 \pm 4,039$; E3 için $74,5 \pm 2,994$ ve E4 için $64,7 \pm 2,181$ olarak bulundu. Etoposide'nin 72. saatteki sitotoksik etkisinde doza bağımlı bir artış tespit edildi. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda kontrole oranla en fazla sitotoksik etki E2 ($p < 0,01$) dozu ile E3 ve E4 ($p < 0,001$) dozlarında görüldü (Şekil 4.12).



Şekil 4.11. Etoposide'nin 72. saatteki absorbans değerleri (**: $p<0,01$ ve ***: $p<0,001$)



Şekil 4.12. Etoposide'nin 72. saatteki hücre canlılığına etkisi (**: $p<0,01$ ve ***: $p<0,001$)

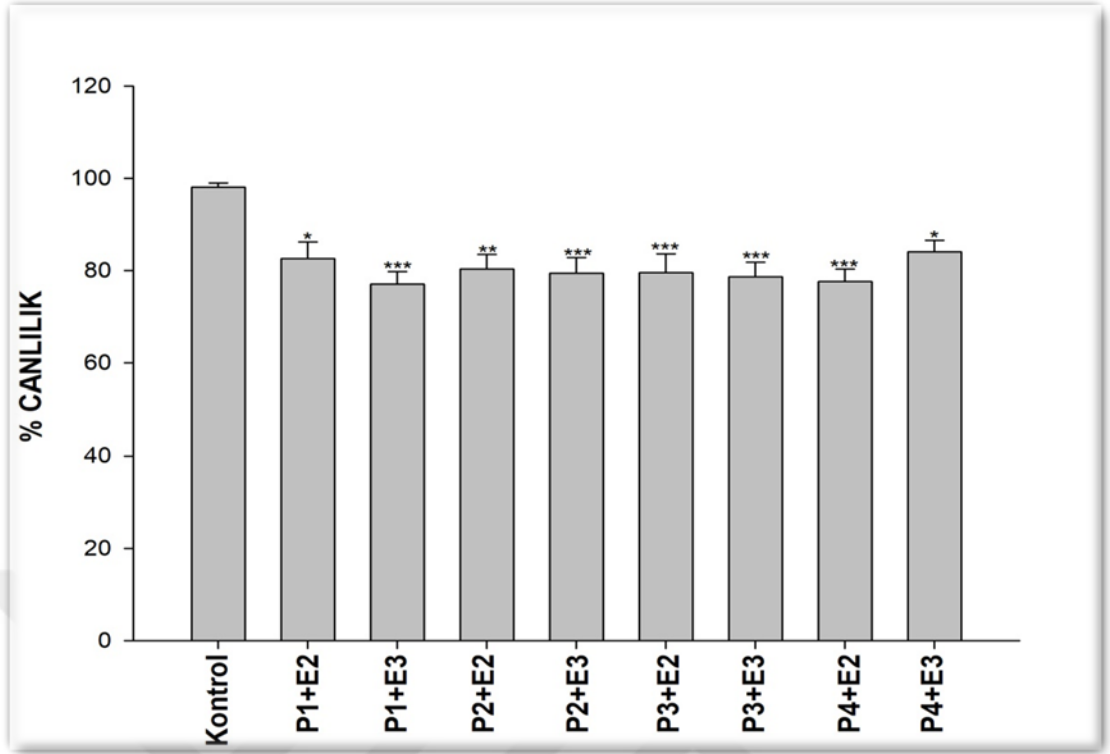
4.3. PRİMA-1^{met} ve Etoposide Kombinasyonunun A549 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisine İlişkin Bulgular

PRİMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının A549 hücreleri üzerindeki sitotoksikite denemeleri için önceki deney sonuçlarından elde edilen veriler doğrultusunda; PRİMA-1^{met} için P1 (5 µM) dozu, Etoposide için E2 (20 µM) ve E3 (40 µM) dozu seçildi. Seçilen dozların kombinasyonları P1+E2, P1+E3, P2+E2, P2+E3, P3+E2, P3+E3, P4+E2 ve P4+E3 olarak isimlendirildi.

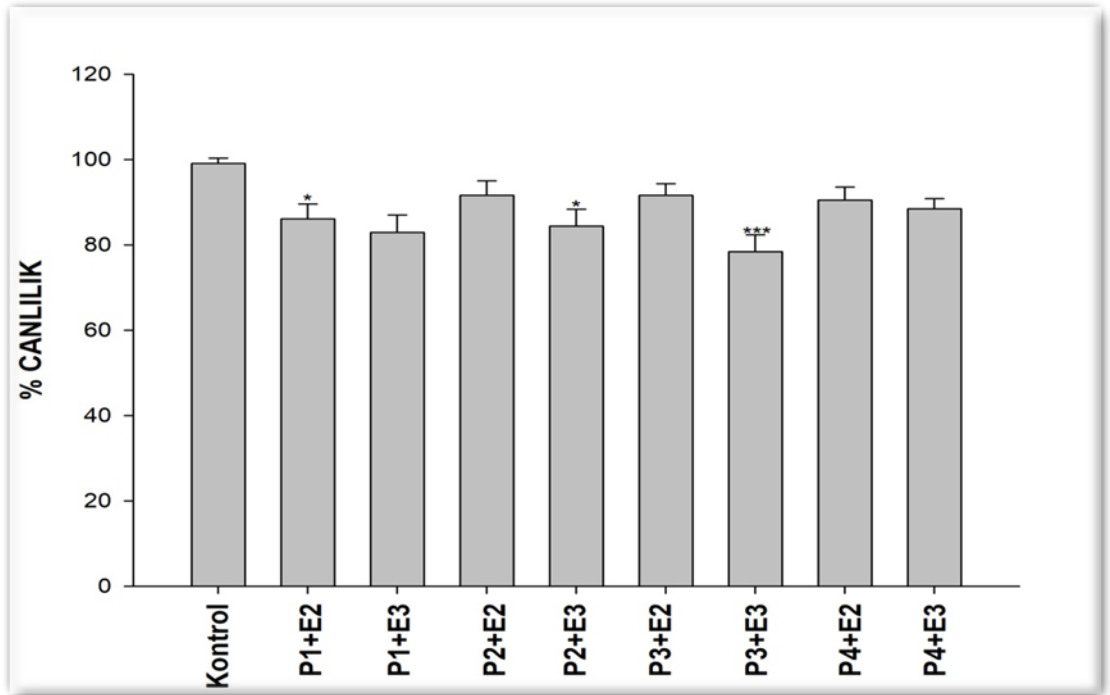
96 kuyucuklu steril plaklara 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde bir gün önceden bölünen hücrelere öncelikle Etoposide dozları uygulanıp, hücreler 24 saat inkübe edildikten sonra Etoposide dozları uzaklaştırılarak PRİMA-1^{met} dozları uygulandı. 24, 48 ve 72. Saatlerdeki sonuçlar değerlendirildi. Her bir deney sekiz tekrarlı olmak üzere birbirinden bağımsız olarak en az iki kez tekrarlandı. PRİMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonları A549 hücre hattı üzerinde zamana bağlı olarak anlamlı derecede sitotoksik etkiler gösterdi.

24 saatlik inkübasyon sonunda PRİMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının hücre canlılığına etkisi değerlendirildi. Buna göre; 24. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri P1+E2 için $82,6 \pm 3,567$; P1+E3 için $77,125 \pm 2,719$; P2+E2 için $80,4 \pm 3,154$; P2+E3 için $79,4 \pm 3,348$; P3+E2 için $79,6 \pm 3,982$; P3+E3 için $78,7 \pm 3,182$; P4+E2 için $77,6 \pm 2,719$ ve P4+E3 için $84,1 \pm 2,439$ olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda kontrole oranla tüm PRİMA-1^{met} ve Etoposide dozlarının kombinasyonlarında anlamlı derecede sitotoksik etki görüldü (Şekil 4.13)

48 saatlik inkübasyon sonunda PRİMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının hücre canlılığına etkisi değerlendirildiğinde 48. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri P1+E2 için $86,1 \pm 3,551$; P1+E3 için $82,9 \pm 4,088$; P2+E2 için $91,6 \pm 3,429$; P2+E3 için $84,4 \pm 3,972$; P3+E2 için $91,6 \pm 2,735$; P3+E3 için $78,4 \pm 3,995$; P4+E2 için $90,5 \pm 3,050$ ve P4+E3 için $88,5 \pm 2,424$ olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda kontrole oranla en fazla sitotoksik etki P3+E3 ($p < 0,001$) ile P1+E2 ve P2+E3 ($p < 0,05$) kombinasyonlarında görüldü (Şekil 4.14).

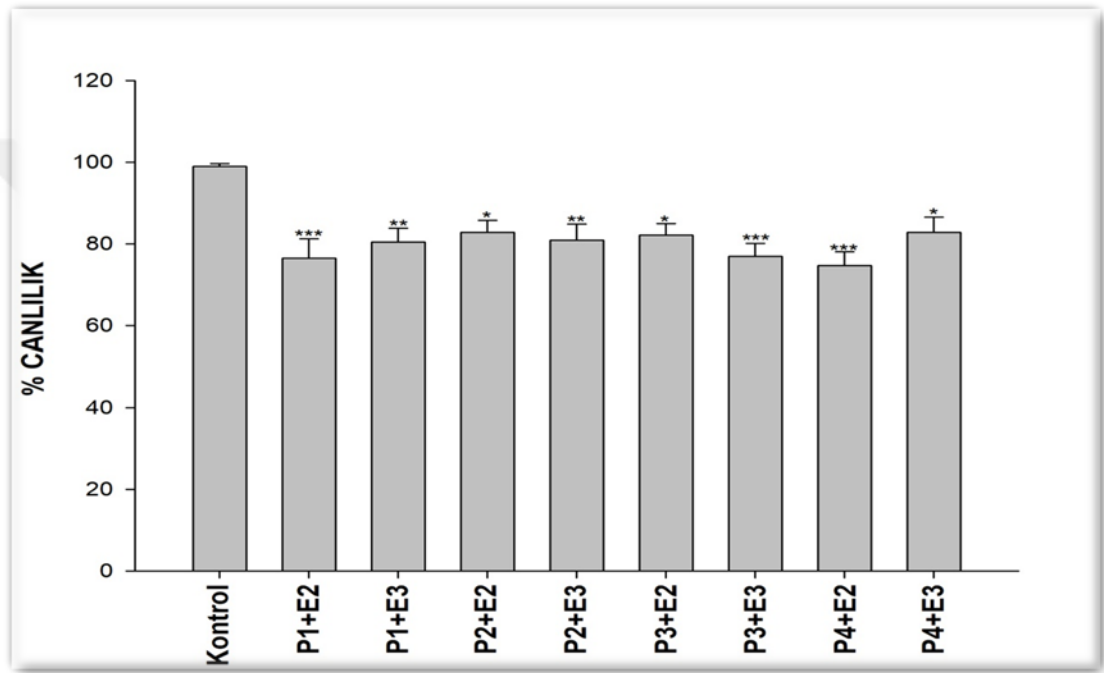


Şekil 4.13. PRIMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının 24. saatteki hücre canlılığına etkisi (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$ ve ***: $p<0,001$)



Şekil 4.14. PRIMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının 48. saatteki hücre canlılığına etkisi (*: $p<0,05$ ve ***: $p<0,001$)

72 saatlik inkübasyon sonunda PRİMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının hücre canlılığına etkisi değerlendirildi. Buna göre; 72. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri P1+E2 için 76,5±4,692; P1+E3 için 80,4±3,422; P2+E2 için 82,8±2,901; P2+E3 için 80,9±3,915; P3+E2 için 82,1±2,833; P3+E3 için 76,9±3,223; P4+E2 için 74,7±3,376 ve P4+E3 için 82,9±3,601 olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda kontrole oranla tüm kombinasyonlarda anlamlı derecede sitotoksik etki görülmekle beraber en fazla etki P1+E2, P3+E3 ve P4+E2 ($p<0,001$) kombinasyonlarında görüldü (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. PRİMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının 72. saatteki hücre canlılığına etkisi (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$ ve ***: $p<0,001$)

4.4. PRİMA-1^{met}'in NCI-H1975 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisine İlişkin Bulgular

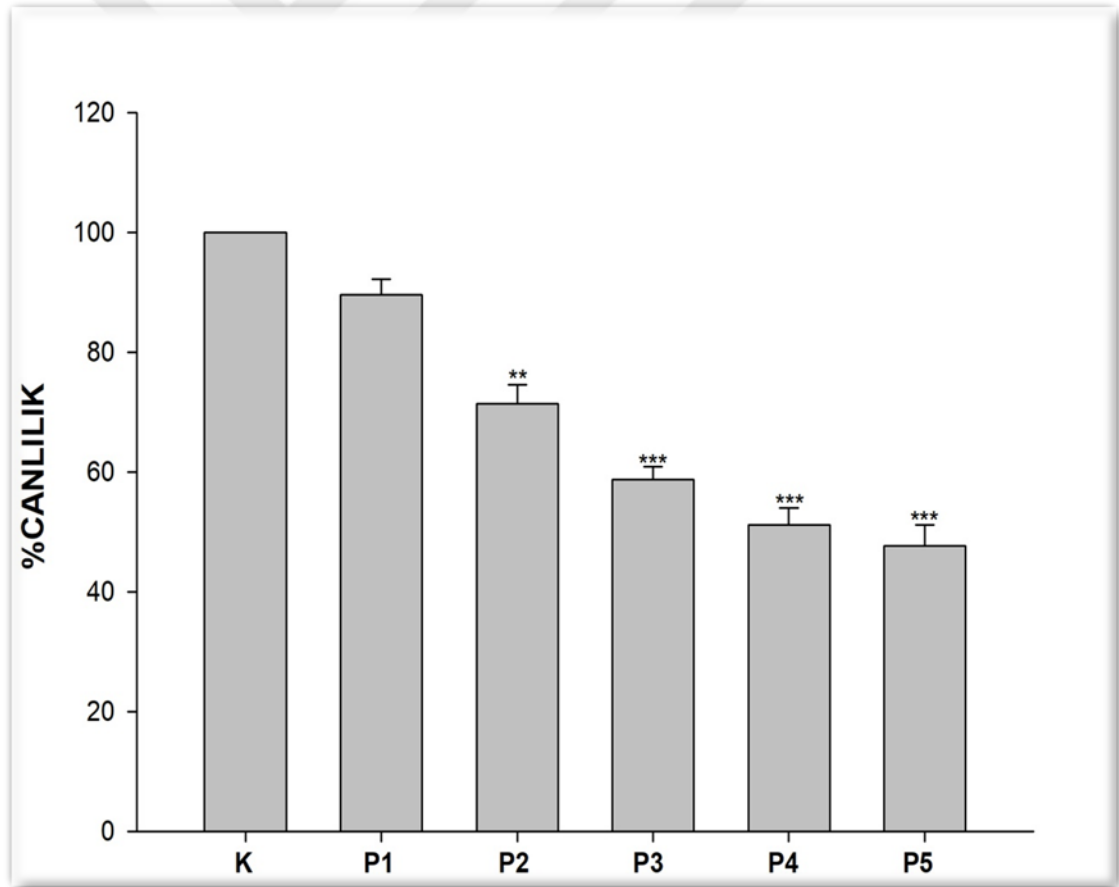
NCI-H1975 hücrelerinde sitotoksikite denemeleri için A549 hücrelerinde yapılan uygulamaların ve istatistiksel işlemlerin aynısı tekrarlandı. Uygulanan PRİMA-1^{met} dozlarının 24, 48 ve 72. saatlerdeki sonuçları değerlendirildi. PRİMA-1^{met} NCI-H1975 hücre hattı üzerinde her bir inkübasyon süresi için benzer ve çok güçlü sitotoksik etkiler sergilediği görüldü.

PRİMA-1^{met}'in 24. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri P1 için %89,6±2,563; P2 için %71,4±3,172; P3 için %58,7±2,195; P4 için %51,2±2,831 ve P5 için %47±3,425 olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda 24.

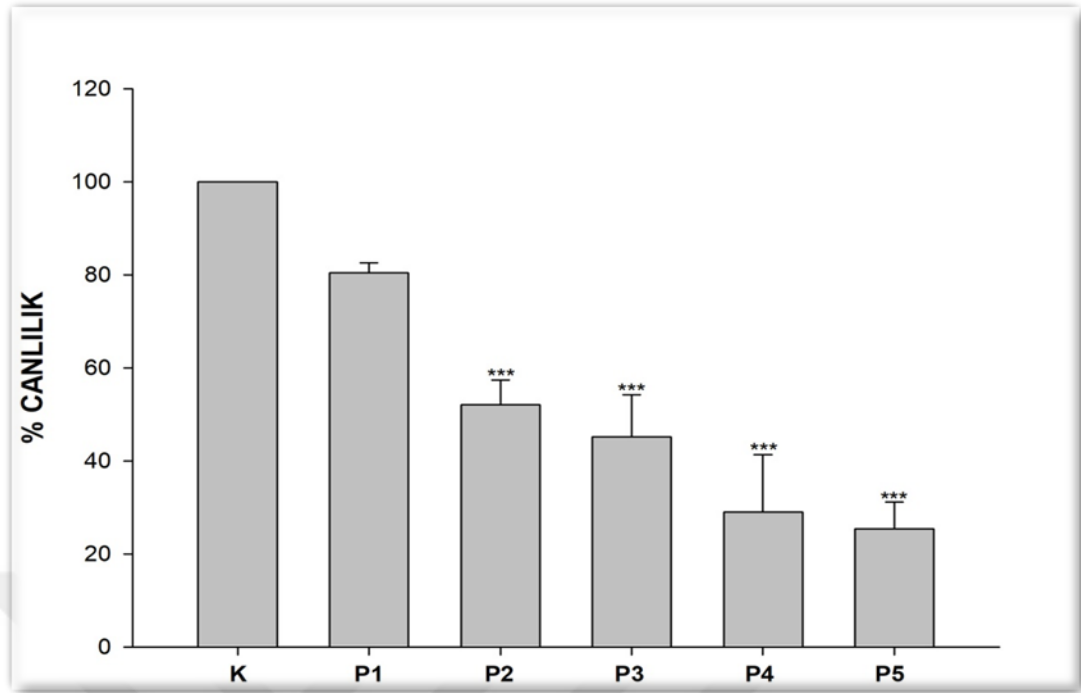
saatte P1 dozunda kontrole oranla anlamlı bir sitotoksik etki görülmezken ($p>0,05$); P2 dozunda güçlü ($p<0,01$), P3, P4 ve P5 dozlarında çok güçlü sitotoksik etki ($p<0,001$) görüldü (Şekil 4.16).

PRİMA-1^{met}'in 48. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri P1 için $80,4\pm2,118$; P2 için $52,1\pm5,288$; P3 için $45,2\pm9,041$; P4 için $29,0\pm12,32$ ve P5 için $25,4\pm5,731$ olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda 24. saatte P1 dozunda kontrole oranla anlamlı bir sitotoksik etki görülmezken ($p>0,05$); P2, P3, P4 ve P5 dozlarında çok güçlü sitotoksik etki ($p<0,001$) görüldü (Şekil 4.17).

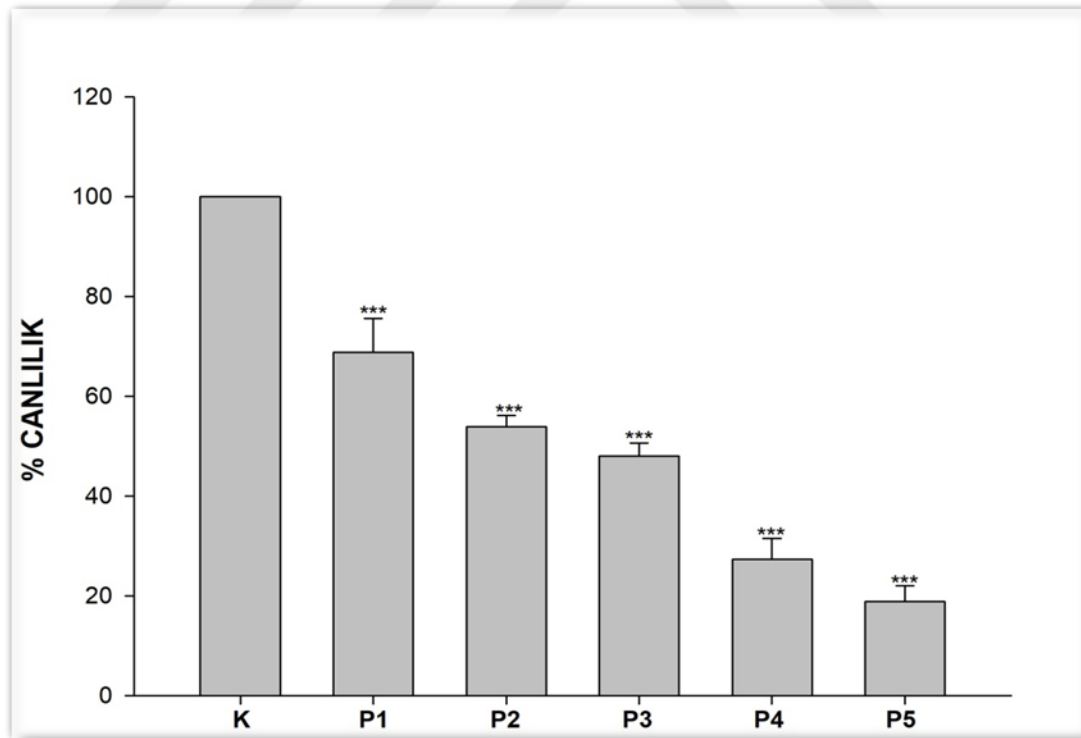
PRİMA-1^{met}'in 72. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri P1 için $68,8\pm6,737$; P2 için $53,9\pm2,219$; P3 için $48,0\pm2,578$; P4 için $27,3\pm4,218$ ve P5 için $18,8\pm3,229$ olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda 24. saatte tüm dozlarda hücre proliferasyonunda doza bağlı olarak azalma ve kontrole oranla çok güçlü ($p<0,001$) sitotoksik etki görüldü (Şekil 4.18).



Şekil 4.16. PRİMA-1^{met}'in 24. saatteki hücre canlılığına etkisi (**: $p<0,01$ ve ***: $p<0,001$)



Şekil 4.17. PRİMA-1^{met}, in 48. saatteki hücre canlılığına etkisi (***: p<0,001)



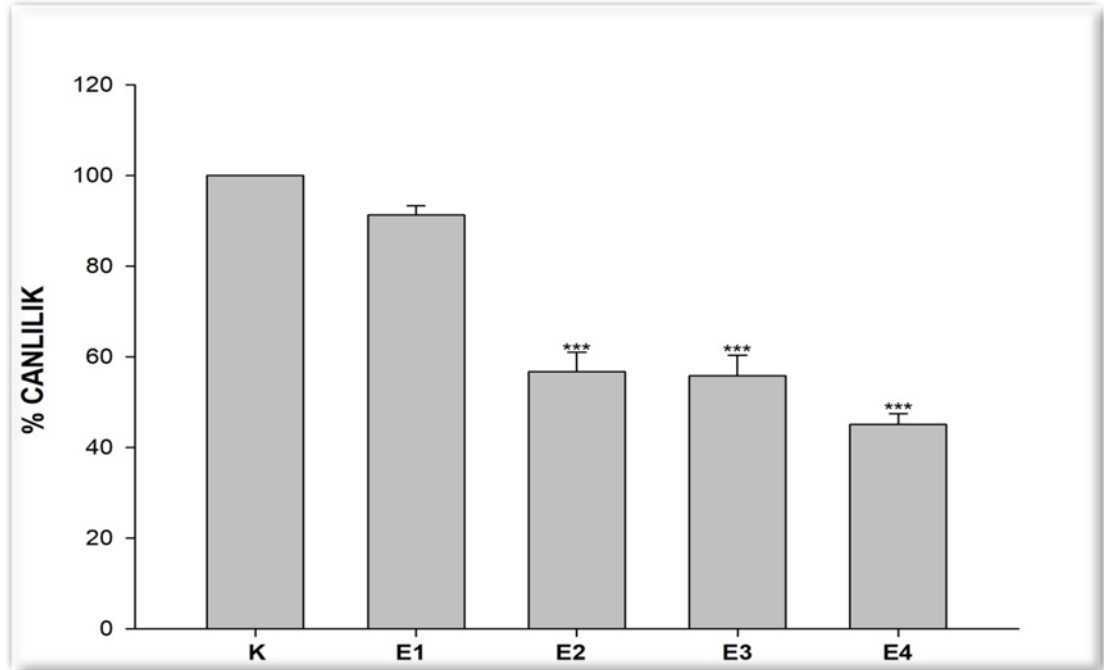
Şekil 4.18. PRİMA-1^{met}, in 72. saatteki hücre canlılığına etkisi (***: p<0,001)

4.5. Etoposide'nin NCI-H1975 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisine İlişkin Bulgular

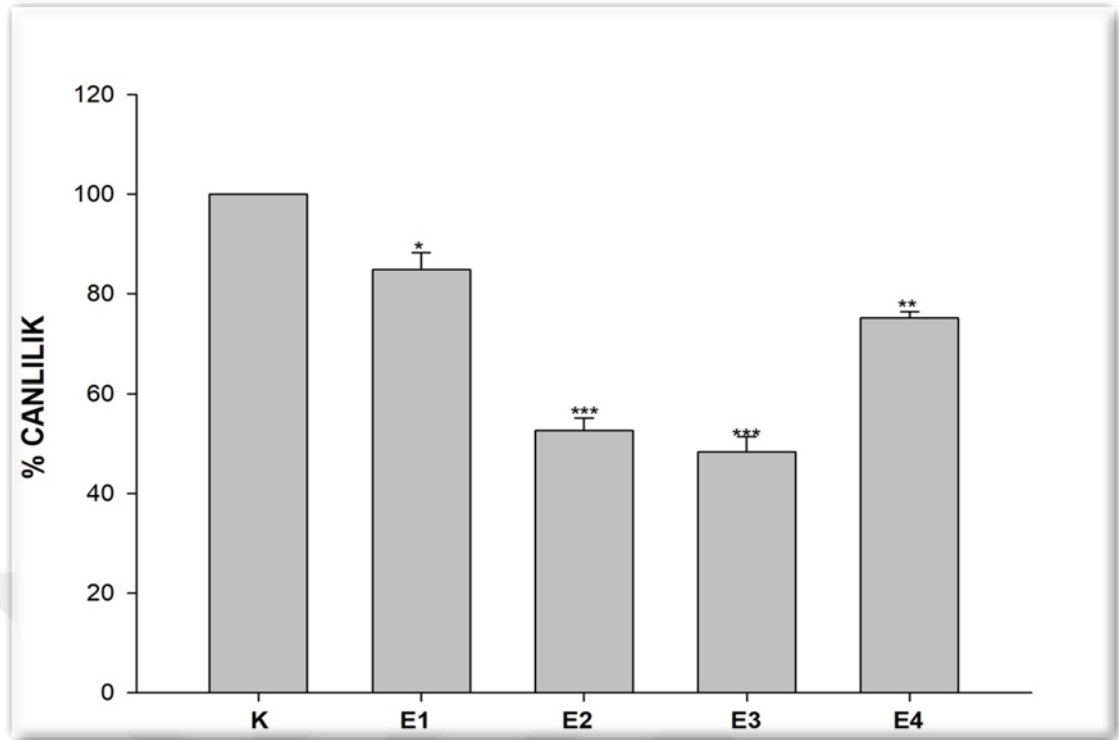
NCI-H1975 hücrelerinde Etoposide ile sitotoksikite denemeleri için A549 hücrelerinde yapılan uygulamaların ve istatistiksel işlemlerin aynısı tekrarlandı. Uygulanan Etoposide dozlarının NCI-H1975 hücrelerinde 24, 48 ve 72. saatlerdeki yüzde canlılık değerleri hesaplanarak hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri değerlendirildi. Buna göre; 24. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri E1 için $91,3 \pm 2,059$; E2 için $56,7 \pm 4,248$; E3 için $55,8 \pm 4,499$ ve E4 için $45,1 \pm 2,373$ olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda 24. saatte kontrole oranla en düşük E1 dozunda herhangi anlamlı etki ($p > 0,05$) görülmezken diğer tüm dozlarda dozla orantılı olarak çok güçlü sitotoksik etki ($p < 0,001$) görüldü (Şekil 4.18).

48. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri E1 için $84,8 \pm 3,461$; E2 için $52,6 \pm 2,479$; E3 için $48,3 \pm 3,066$ ve E4 için $75,1 \pm 1,235$ olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda tüm dozlarda anlamlı derecede sitotoksik etki görülürken en yüksek etki ($p < 0,001$) E2 ve E3 dozlarında görüldü (Şekil 4.19).

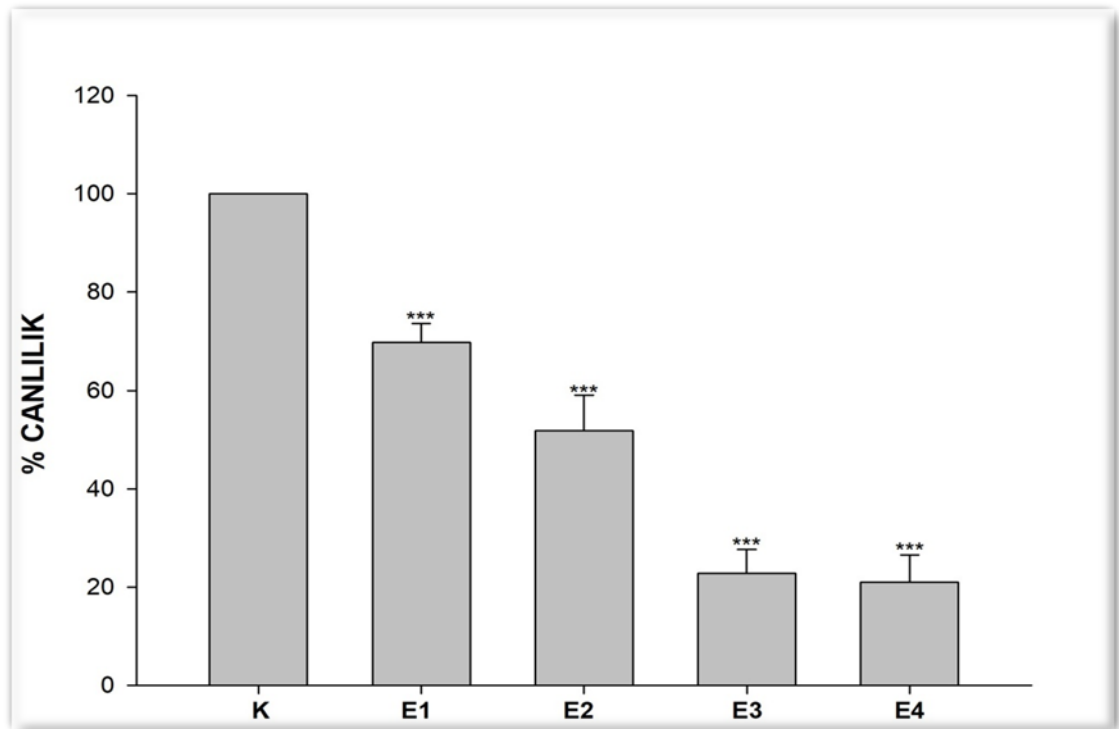
72. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri E1 için $69,7 \pm 3,819$; E2 için $51,8 \pm 7,270$; E3 için $22,8 \pm 4,807$ ve E4 için $21,0 \pm 5,541$ olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda tüm dozlarda kontrole oranla doza bağlı olarak artan çok güçlü sitotoksik etki ($p < 0,001$) görüldü (Şekil 4.20).



Şekil 4.19. Etoposide'nin 24. saatteki hücre canlılığına etkisi (***: $p < 0,001$)



Şekil 4.20. Etoposide'nin 48. saatteki hücre canlılığına etkisi (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$)



Şekil 4.21. Etoposide'nin 72. saatteki hücre canlılığına etkisi (***: $p<0,001$)

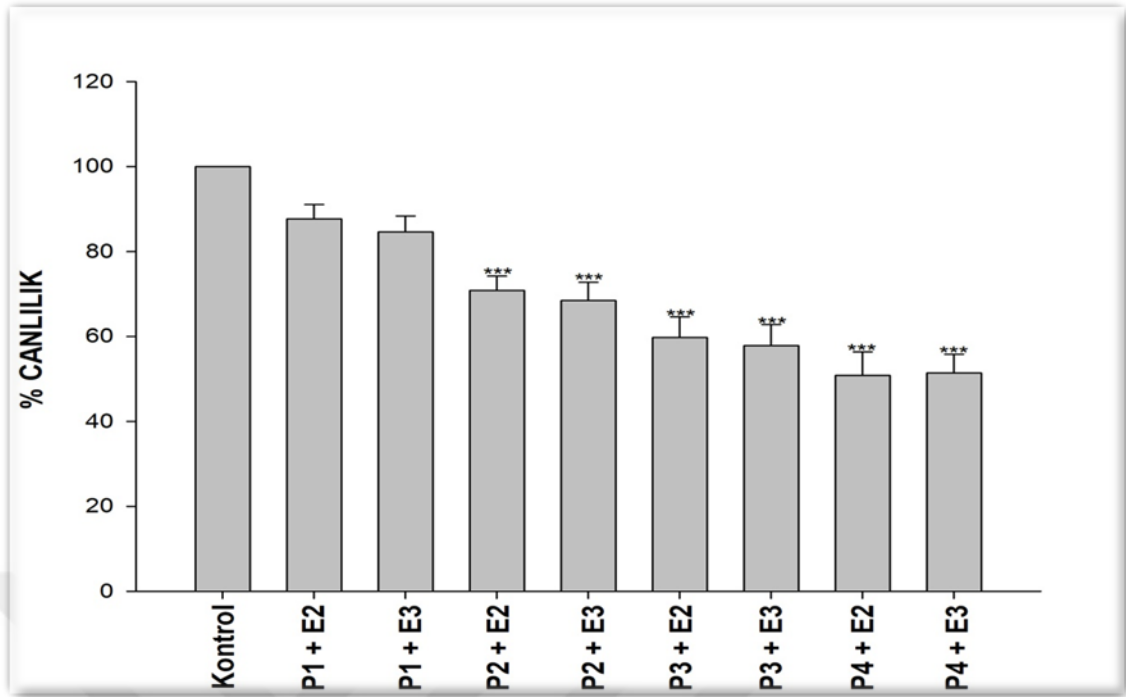
4.6. PRİMA-1^{met} ve Etoposide Kombinasyonunun NCI-H1975 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisine İlişkin Bulgular

PRİMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının NCI-H1975 hücreleri üzerindeki sitotoksikite denemeleri için, A549 hücreleri üzerindeki kombinasyon çalışmalarının ve istatistiksel işlemlerin aynısı tekrarlandı.

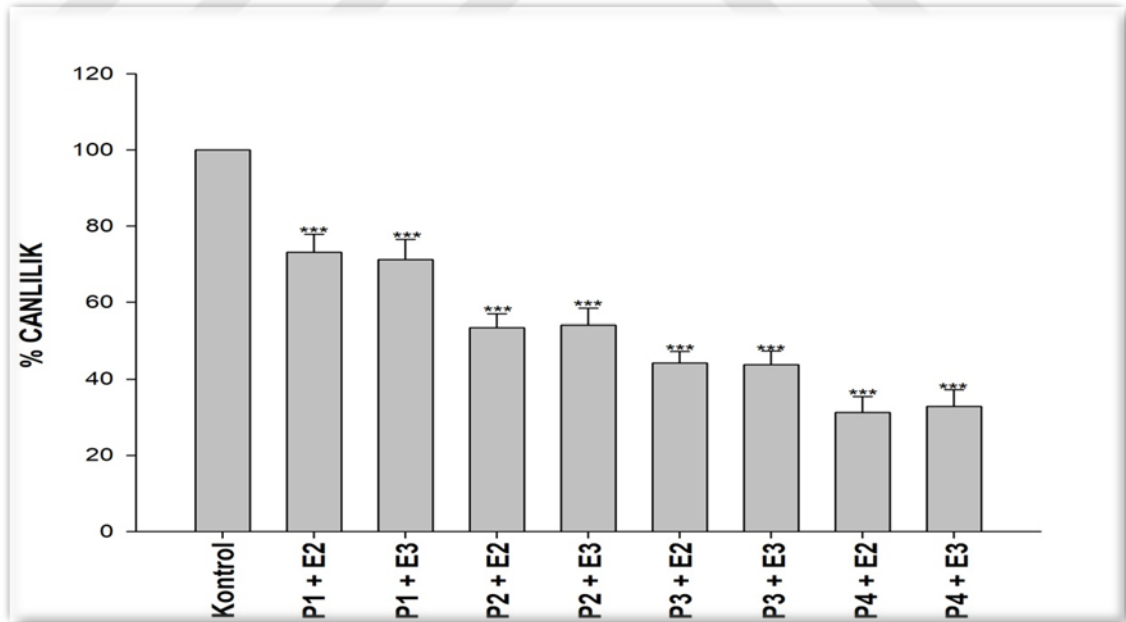
24 saatlik inkübasyon sonunda PRİMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının hücre canlılığına etkisi değerlendirildi. Buna göre; 24. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri P1+E2 için 87,6±3,387; P1+E3 için 84,6±3,686; P2+E2 için 70,8±3,344; P2+E3 için 68,4±4,296; P3+E2 için 59,7±4,864; P3+E3 için 57,8±5,009; P4+E2 için 50,8±5,568 ve P4+E3 için 51,4±4,381 olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda P1+E2 ve P1+E3 kombinasyonlarında herhangi bir etki gözlenmezken diğer tüm PRİMA-1^{met} ve Etoposide dozlarının kombinasyonlarında çok güçlü sitotoksik etki ($p<0,001$) görüldü (Şekil 4.21).

48 saatlik inkübasyon sonunda PRİMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının hücre canlılığına etkisi değerlendirildi. Buna göre; 48. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri P1+E2 için 73,1±4,801; P1+E3 için 71,2±5,256; P2+E2 için 53,5±3,505; P2+E3 için 54,2±4,241; P3+E2 için 44,2±3,101; P3+E3 için 43,8±3,561; P4+E2 için 31,2±4,210 ve P4+E3 için 32,8±4,426 olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda tüm PRİMA-1^{met} ve Etoposide dozlarının kombinasyonlarında hücre proliferasyonunda doz oranlarıyla artan bir azalma ve çok güçlü sitotoksik etkiler ($p<0,001$) görüldü (Şekil 4.22).

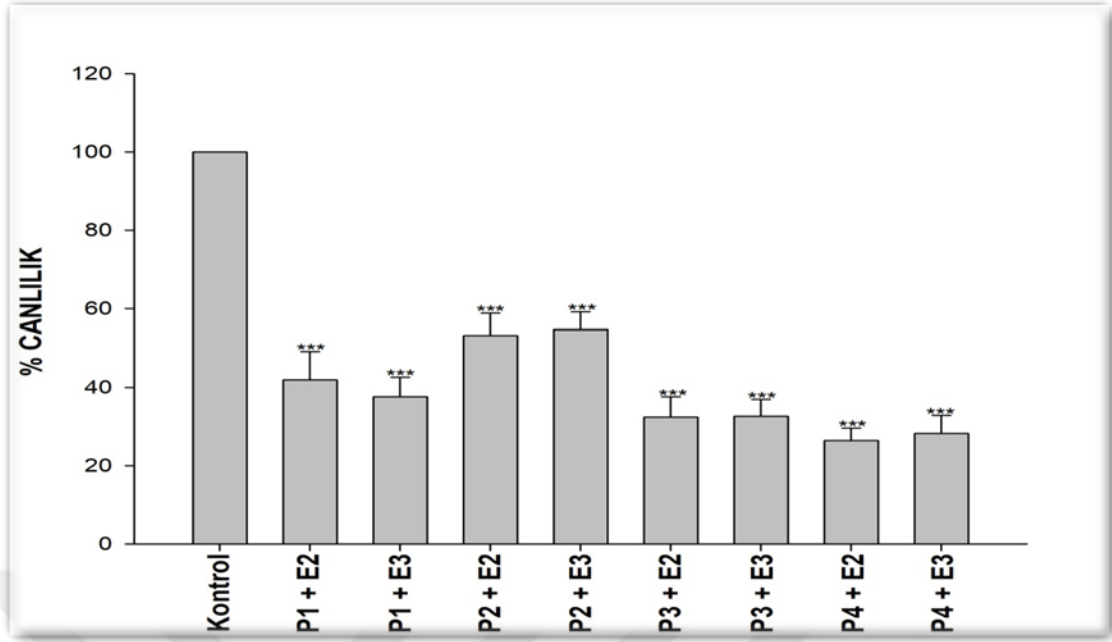
72 saatlik inkübasyon sonunda PRİMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının hücre canlılığına etkisi değerlendirildi. Buna göre; 72. saatteki ortalama yüzde canlılık değerleri P1+E2 için 41,9±7,200; P1+E3 için 37,6±5,000; P2+E2 için 53,2±5,655; P2+E3 için 54,7±4,550; P3+E2 için 32,4±5,285; P3+E3 için 32,7±4,305 P4+E2 için 26,4±3,198 ve P4+E3 için 28,3±4,563 olarak bulundu. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda tüm PRİMA-1^{met} ve Etoposide dozlarının kombinasyonlarında çok güçlü sitotoksik etki ($p<0,001$) görüldü (Şekil 4.23).



Şekil 4.22. PRIMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının 24. saatteki hücre canlılığına etkisi (***: p<0,001)



Şekil 4.23. PRIMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının 48. saatteki hücre canlılığına etkisi (***: p<0,001)



Şekil 4.24. PRİMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının 72. saatteki hücre canlılığına etkisi (***: p<0,001)

Ayrıca; PRİMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonlarının hücre canlılığına etkisi WST-1 test sonuçlarına ek olarak hücre canlılığını doğrudan mikroskopik olarak belirleyebilmeyi sağlayan Tripan Mavisi Testi ile de desteklendi ve benzer sonuçlar elde edildi. Ancak, Tripan mavisi ile yapılan deney sayısı istatistiksel değerlendirme için yeterli değildir.

5. TARTIŞMA

P53, hücrede bir hasar meydana geldiğinde hücre döngüsü durmasını sağlayarak ve apoptozu tetikleyerek hücreleri genetik saldırılara karşı korur. P53 yolunun inaktivasyonu, genellikle TP53'teki somatik missense mutasyonlar veya proteinin aşırı degradasyonu nedeniyle insan kanserlerinin büyük çoğunluğunda bulunur. Bu da p53 kaybının tümör büyümesinde bir ön koşul olduğunu gösterir. TP53'teki mutasyonlar, vahşi tip p53 (wt-p53) aktivitesinin kaybına, genom instabilitesinde artışa ve apoptoza direnç gibi onkojenik fonksiyonların kazanılmasına yol açar. Buna göre, p53'ün yeniden aktive edilmesi oldukça ümit verici bir farmakolojik yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. P53 reaktif eden çeşitli küçük moleküller tanımlanmıştır. Bunlardan en çok araştırılan bileşik PRİMA-1^{met} 'dir. Şu anda, yüksek dereceli seröz yumurtalık kanserinde bir faz II klinik denemede test edilmektedir. Yapılan çalışmalarda PRİMA-1^{met}'in DNA'ya zarar veren antineoplastik ilaçlarla güçlü bir sinerji gösterdiği gözlemlenmiştir. Kemoterapötik ajanların yalnızca malign hücreler üzerinde değil hayati organlar üzerindeki normal olan diğer hücreler üzerinde de toksik etkisi mevcuttur. Bu durum kemoterapötik ajanların, yan etkisi çok daha az olan hedefe yönelik antikanserojen ajanlarla kombine kullanılmasının önemini ortaya çıkarmaktadır.

Apoptozisin indüksiyonu, TP53 geninin tümör baskılayıcı aktivitesinin merkezindedir. p53'e bağımlı apoptoz, kanser tedavisinin etkinliği için önemlidir ancak insan kanserlerinde sıklıkla ortaya çıkan p53 mutasyonları (NSCLC'de yaklaşık %50) p53'e bağımlı apoptozu ciddi şekilde tehlikeye atabilir ve aslında insan tümör hücrelerinde yapılan birbirinden farklı çalışmalar, p53'ün inaktivasyonunun kemoterapiye verilen apoptotik yanıtı bozduğunu göstermiştir (Levine 1997; Soussi ve Lozano 2005; Hall ve McCluggage, 2006).

Mutant-p53 taşıyan tümörler, genellikle kemoterapiye dirençlidir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC) hücrelerinin genellikle birçok sitotoksik ilaçla tedaviyi takiben apoptoza direnç gösterdiği bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda yeni bir molekül olan PRİMA-1^{Met}'in mutasyona uğramış p53'ün transkripsiyonel aktivitesini geri getirerek insan tümör hücrelerini öldürdüğü görülmektedir (Magrini vd. 2008).

Literatür taramaları; PRİMA-1^{met}'in akciğer, over, meme, prostat gibi çeşitli kanser türlerinde kemoterapötik ajanlar ile sinerji veya güçlü sinerji oluşturduğunu göstermektedir (Bykov vd. 2005; Magrini vd. 2008; Ali vd. 2011; Mohell vd. 2015, 2016; Fransson vd. 2016; Synnott vd. 2017).

Magrini vd. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada; farklı p53 proteinleri taşıyan üç NSCLC hücre hattında PRİMA-1^{met}'in metillenmemiş türevi olan PRİMA-1'e yanıt olarak apoptozisin indüksiyonu araştırılmış; PRİMA-1 tek başına apoptozu tetiklememiş bununla birlikte hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı gözlemlenmiştir. Ancak buna rağmen adriamisin (doksorubisin) ile kombinasyon halinde, PRİMA-1

tedavisinin apoptozu indüklediği görülmüştür. Sonuç olarak bu veriler, NSCLC hücrelerinde, PRİMA-1'in apoptosis dışındaki yollarla hücre ölümüne neden olabileceğini ancak apoptotik bir yanıtı tetiklemek için adriamisin ile sinerji oluşturabileceğini göstermektedir.

İntravenöz yoldan kullanılan bir antineoplastik ajan olan Etoposide tek başına veya diğer sitotoksik ajanlarla kombine şekilde kullanılabilir. Mohell vd. (2016) tarafından yürütülen bir araştırma; Etoposide ile kombinasyon halinde PRİMA-1^{met} tedavi, akciğer kanserine özgü ve/veya sigarayla ilişkili TP53 mutasyonları taşıyan Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (SCLC) hücrelerinde sinerji veya güçlü sinerji ile sonuçlanmıştır. Bu da PRİMA-1^{met} ile standart kemoterapinin kombinasyon halinde uygulanmasının TP53-mutant SCLC'nin önemli ölçüde iyileştirilmiş tedavisini sağlayabileceğini göstermektedir.

Bu tez kapsamında daha önce araştırması yapılmamış olan Etoposide ile kombinasyon halinde PRİMA-1^{met} tedavisinin NSCLC hücrelerindeki sitotoksik etkisinin araştırılması yapıldı. Öncelikle PRİMA-1^{met}'in vahşi tip-p53 içeren A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliğine bakıldığında, en düşük 5µM dozu etkisini zamanla gösterirken, diğer tüm dozlarda genel olarak hücre proliferasyonuna güçlü bir toksik etki görüldü (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. PRİMA-1^{met}'in istatistiksel olarak elde edilen hücre canlılığına etkisindeki anlamlı değerleri (*; p<0,05, **; p<0,01 ve ***; p<0,001)

	5 µM (P1)	10 µM (P2)	20 µM (P3)	40 µM (P4)	50 µM (P5)
24 saat	-	***	***	-	-
48 saat	-	***	*	***	***
72 saat	**	-	*	***	***

Etoposide dozlarının vahşi tip-p53 içeren A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliğine bakıldığında özellikle 20 µM ve 40 µM dozlarının 24 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası hücre proliferasyonuna güçlü bir toksik etkisi görülürken ilginç bir şekilde 48 saatlik inkübasyon sonrası kontrol grubuna oranla hiçbir dozda herhangi bir etki gözlenmedi (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2. Etoposide'nin istatistiksel olarak elde edilen hücre canlılığına etkisindeki anlamlı değerleri (*; $p < 0,05$, **; $p < 0,01$ ve ***; $p < 0,001$)

	10 μ M (E1)	20 μ M (E2)	40 μ M (E3)	50 μ M (E4)
24 saat	-	**	***	-
48 saat	-	-	-	-
72 saat	-	**	***	***

Bu veriler doğrultusunda PRİMA-1^{met} ile Etoposide'nin en etkili dozlarının kombinasyonları oluşturuldu. PRİMA-1^{met}'in en az etkili olan en düşük dozu da bu uygulamaya dahil edildi. 40 μ M ve 50 μ M dozları birbirine çok yakın etkiye sahip olduğu için arasından daha düşük olan 40 μ M dozu seçildi ve kombinasyonları oluşturularak bu kombine tedavinin vahşi tip-53 içeren A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliğine bakıldı. Özellikle 24 ve 72 saatlik inkübasyonlar sonunda tüm kombine doz uygulamalarının kontrol grubuna oranla hücre proliferasyonuna güçlü ve/veya çok güçlü toksik etki ettiği gözlemlendi (Çizelge 5.3).

Çizelge 5.3. Kombine dozların istatistiksel olarak elde edilen hücre canlılığına etkisindeki anlamlı değerleri (*; $p < 0,05$, **; $p < 0,01$ ve ***; $p < 0,001$)

	P1+E2	P1+E3	P2+E2	P2+E3	P3+E2	P3+E3	P4+E2	P4+E3
24 saat	*	***	**	***	***	***	***	*
48 saat	*	-	-	*	-	***	-	-
72 saat	***	**	*	**	*	***	***	*

Ayrıca; Etoposide'nin 10 μ M dozunun vahşi tip-53 içeren A549 hücreleri üzerindeki 48 saat inkübasyonu sonucunda oluşan sitotoksik etkinliğine bakıldığında bu dozun kontrol grubuna oranla hücre proliferasyonuna anlamlı bir etkisi görülmemiştir. Yine aynı zamanda PRİMA-1^{met}'in 5 μ M dozunun vahşi tip-53 içeren A549 hücreleri üzerindeki 48 saat inkübasyonu sonucunda oluşan sitotoksik etkinliğine bakıldığında bu dozun kontrol grubuna oranla hücre proliferasyonuna anlamlı bir etkisi görülmemiştir. Ancak her ikisinin kombine uygulamasının 48 saat inkübasyonu sonucunda oluşan sitotoksik etkinliğine bakıldığında A549 hücreleri üzerinde kontrol grubuna oranla anlamlı bir sitotoksik etki gözlemlenmiştir. Bu da bu iki dozun kombine uygulamadaki sinerjik etkisi olabileceğini bize göstermiştir.

Yine aynı şekilde Etoposide'nin 40 µM dozunun A549 hücreleri üzerindeki 48 saat inkübasyonu sonucunda oluşan sitotoksik etkinliğine bakıldığında bu dozun kontrol grubuna oranla hücre proliferasyonuna anlamlı bir etkisi görülmemiştir. PRİMA-1^{met}'in 20 µM dozunun vahşi A549 hücreleri üzerindeki 48 saat inkübasyonu sonucunda oluşan sitotoksik etkinliğine bakıldığında bu dozun kontrol grubuna oranla hücre proliferasyonuna az da olsa anlamlı bir etkisi görülmüştür. Her iki dozun kombine uygulamasının 48 saat inkübasyonu sonucuna hücre canlılığına etkisine bakıldığında ise kontrol grubuna oranla istatistiksel anlamda çok daha güçlü bir sitotoksik etki gözlemlenmiştir. Bununla beraber tüm kombine uygulamalardaki sitotoksik etkiler PRİMA-1^{met}'in Etoposide ile sinerjistik etki gösteriyor olabileceğini de düşündürmektedir.

PRİMA-1^{met}, Etoposide ve kombinasyonlarının mutant-p53 içeren NCI-H1975 A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliğine bakıldığında ise; genel olarak PRİMA-1^{met}'in tüm dozlarında, Etoposide'nin özellikle 20 µM ve 40 µM dozlarında ve bunların tüm kombinasyonlarında doza ve zamana bağlı olarak çok güçlü bir sitotoksik etki ($p<0,001$) görülmüştür. NCI-H1975 hücreleri üzerindeki bu sitotoksik etkinin, vahşi tip-p53 içeren A549 hücreler üzerindeki sitotoksik etkiden istatistiksel olarak çok daha yüksek olması ise PRİMA-1^{met}'in TP53 mutasyonuna bağlı olarak çalıştığı fikrini desteklemiştir.

Bu bağlamda yaptığımız çalışma PRİMA-1^{met}'in diğer kanser türlerinde antineoplastik ajanlarla yapılan kombine çalışmalarını desteklemiş ve NSCLC'de Etoposide ile kombine tedavinin alternatif bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermiştir.

6. SONUÇLAR

1. A549 hücre hattında Prima-1^{met} dozlarının, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri sonunda, hücre canlılığına etkisi yapılan istatistiksel analizler sonucunda değerlendirildi. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda; kontrole oranla en fazla sitotoksik etki 10 μ M ve 20 μ M dozlarında görüldü ($p<0,001$). 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrole oranla en fazla sitotoksik etki 10 μ M, 40 μ M ve 50 μ M dozlarında görüldü ($p<0,001$). 72. saatte kontrole oranla en fazla sitotoksik etki 40 μ M ve 50 μ M dozlarında görüldü ($p<0,001$).

2. A549 hücre hattında Etoposide dozlarının 24, 48, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığına etkisi, yapılan istatistiksel analizler sonucunda değerlendirildi. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrole oranla en fazla sitotoksik etki 20 μ M ($p<0,01$) ve 40 μ M ($p<0,001$) dozlarında görüldü. 48 saatlik inkübasyon süresi sonundaki Etoposide dozlarının sitotoksik etkisine bakıldığında, kontrol grubu ile uygulanan dozlar arasında anlamlı derecede bir fark görülmedi. 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda Etoposide'nin sitotoksik etkisinde doza bağımlı bir artış tespit edildi. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda kontrole oranla en fazla sitotoksik etki 20 μ M ($p<0,01$) dozu ile 40 μ M ve 50 μ M ($p<0,001$) dozlarında görüldü.

3. PRIMA-1^{met}'in ve Etoposide'nin etkili dozları belirlenip bunların kombinasyonlarının A549 hücre hattında sitotoksik analizleri değerlendirildi. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrole oranla tüm kombinasyonlarda anlamlı derecede sitotoksik etki gözlemlenip en yüksek etki P1+E3 (5 μ M+40 μ M), P2+E3 (10 μ M+40 μ M), P3+E2 (20 μ M+20 μ M), P3+E3 (20 μ M+40 μ M), P4+E2 (40 μ M+20 μ M) kombinasyonlarında görüldü ($p<0,001$). 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrole oranla en fazla sitotoksik etki P3+E3 (20 μ M+40 μ M) kombinasyonunda görüldü ($p<0,001$). 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda kontrole oranla tüm kombinasyonlarda anlamlı derecede sitotoksik etki gözlemlenip en yüksek etki P1+E2 (5 μ M+20 μ M), P3+E3 (20 μ M+40 μ M) ve P4+E2 (40 μ M +20 μ M) kombinasyonlarında görüldü ($p<0,001$).

4. NCI-H1975 hücre hattında Prima-1^{met} dozlarının, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığına etkisi, yapılan istatistiksel analizler sonucunda değerlendirildi: PRIMA-1^{met} NCI-H1975 hücre hattı üzerinde her bir inkübasyon süresi için benzer sitotoksik etkiler sergiledi. En düşük P1 (5 μ M) dozu 24. ve 48. saatte anlamlı bir etki göstermezken ($p>0,05$) 72. saatte kontrol grubuna oranla güçlü bir sitotoksik etki ($p<0,001$) gösterdi. P2 (10 μ M) dozu 24. Saatte kontrole oranla güçlü bir sitotoksik etki ($p<0,01$) gösterirken 48. ve 72. Saatte çok daha güçlü bir sitotoksik etki ($p<0,001$) gösterdi. Diğer P3 (20 μ M), P4 (40 μ M) ve P5 (50 μ M) dozlarında ise tüm inkübasyon sürelerinde, hücre proliferasyonunda zamana ve doza bağımlı olarak azalma ve çok güçlü sitotoksik etkiler ($p<0,001$) görüldü.

5. NCI-H1975 hücre hattında Etoposide dozlarının, 24, 48, 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda, hücre canlılığına etkisi yapılan istatistiksel analizler sonucunda değerlendirildi: genel anlamda doza ve zamana bağlı olarak hücre proliferasyonunda azalma görülürken en yüksek sitotoksik etki E2 ve E3 dozlarında görüldü ($p<0,001$).

6. PRIMA-1^{met}'in ve Etoposide kombinasyonlarının NCI-H1975 hücre hattında sitotoksite analizleri değerlendirildi: PRIMA-1^{met} ve Etoposide kombinasyonları NCI-H1975 hücre hattı üzerinde genel anlamda benzer şekilde zamana bağlı olarak çok güçlü derecede sitotoksik etkiler gösterdi ($p<0,001$).

Bu tez çalışmasından çıkarılan sonuçları özetleyecek olursak, PRIMA-1^{met} ve Etoposide ajanları ile bunların kombinasyonlarının Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri hücre hatlarında sitotoksite analizleri yapılarak, hücre canlılığına etkileri değerlendirildi. Bunun neticesinde: PRIMA-1^{met}, Etoposide ve kombinasyonları A549 hücre hattı üzerinde her bir inkübasyon süresi için farklı oranlarda sitotoksik etkiler sergilerken NCI-H1975 hücre hattında çok daha güçlü ve benzer etkiler sergilediği görüldü.

Sonuç olarak PRIMA-1^{met}'in ve Etoposide ile kombine uygulamasının; vahşi tip-p53 içeren A549 hücre hattına oranla mutant-p53 içeren NCI-H1975 hücre hattında çok daha güçlü derecede sitotoksik etki göstermesi, PRIMA-1^{met}'in TP53 mutasyonu varlığında daha etkili olduğu fikrini desteklemiştir. Bu doğrultuda PRIMA-1^{met} ile standart kemoterapinin kombinasyon halinde uygulanmasının özellikle mutant-p53 içeren NSCLC'nin önemli ölçüde iyileştirilmiş tedavisini sağlayabileceğini göstermektedir. Bu durum PRIMA-1^{met}'in devam eden çalışmalarına katkı sağlamakla beraber bu konuda yapılacak yeni çalışmalar için de yol gösterici olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- Adkison, L.R. and Brown, M.D. (eds). 2007. Elsevier's integrated genetics- Cancer genetics. Mosby Elsevier; Philadelphia, 63-90.
- Ali, D., Jönsson-Videsäter, K., Deneberg, S., Bengtzén, S., Nahi, H., Paul, C., & Lehmann, S. 2011. APR-246 exhibits anti-leukemic activity and synergism with conventional chemotherapeutic drugs in acute myeloid leukemia cells. *European journal of haematology*, 86(3), 206-215.
- Ananiev, J., Tchernev, G., Patterson, J.W., Gulubova, M. and Ganchev, G. 2011. P53 – The guardian of genome. *Acta Medica Bulgarica*, 38(2):72-82.
- Aryee, D.N.T., Niedan, S., Ban, J., Schwentner, R., Muehlbacher, K., Kauer, M., Kofler, R., Kovar, H. 2013. Variability in functional p53 reactivation by PRIMA-1Met / APR-246 in ewing sarcoma. *British Journal of Cancer*, 109 (10), 2696-2704.
- Aryee, D. N. T., Niedan, S., Ban, J., Schwentner, R., Muehlbacher, K., Kauer, M., Kovar, H. et al. 2013. Variability in functional p53 reactivation by PRIMA-1 Met/APR-246 in Ewing sarcoma. *British journal of cancer*, 109(10), 2696.
- Bartek, J., Bartkova, J. and Lukas, J. 2007. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumor progression. *Oncogene*, 26: 7773–7779.
- Bartkova, J., Horejsi, Z., Koed, K., Krämer, A., Tort, F., Zieger, K. et al. 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, 434: 864–870.
- Bell, S., Klein, C., Müller, L., Hansen, S., Buchner, J. 2002. p53 Contains Large Unstructured Regions in its Native State. *J Mol Biol*, 322(5):917-927.
- Bertram, J. 2000. The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6),167-223.
- Besse, J. P., Latour, J. F. and Garric, J. 2012. Anticancer drugs in surface waters: what can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs?. *Environment International*, 39(1), 73-86.
- Bieging, K.T., Mello, S.S. and Attardi, L.D. 2014. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 14:359-370.
- Boeckler, F. M., Joerger, A.C., Jaggi, G., Rutherford, T.J., Veprintsev, D. B., and Fersht, A.R. 2008. Targeted rescue of a destabilized mutant of p53 by an in silico screened drug. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30), 10360-10365.
- Brosh, R. and Rotter, V. 2009. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature reviews cancer*, 9(10), 701.
- Bykov, V.J.N., Issaeva, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P., Bergman, J., Wiman, K.G., Selivanova, G. 2002. Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. *Nature Medicine* 8 (3), 282-288.

- Bykov, V. J.N., Issaeva, N., Zache, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Bergman, J., Wiman, K. G. et al. 2005. Reactivation of mutant p53 and induction of apoptosis in human tumor cells by maleimide analogs. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30384-30391.
- Bykov, V.J.N., Zache, N., Stridh, I.H., Westman, J., Bergman, J., Selivanova, G., Wiman, K.G. 2005. PRIMA-1(met) synergizes with cisplatin to induce tumor cell apoptosis. *Oncogene*, 24(21): 3484-91.
- Bykov, V.J.N., Zhang, Q., Zhang, M., Ceder, S., Abrahmsen, L., Wiman, K.G. 2016. Targeting of mutant p53 and the cellular redox balance by APR-246 as a strategy for efficient cancer therapy. *Frontier in Oncology. Journal of Ovarian Research*, 14;9(1):27.
- Carelle, N., Piotto, E., Bellanger, A., Germanaud, J., Thuillier, A. and Khayat, D. 2002. Changing patient perceptions of the side effects of cancer chemotherapy. *Cancer*, 95(1), 155-163.
- Cooper, G.M. 2000. *The Cell: A Molecular Approach*. ASM Press.
- Damadoğlu, E. 2007. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde tanı ve tedavi gecikmelerinin patolojik tümör evresine etkisi. Uzmanlık tezi, Süreyyapaşa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 50 s.
- Deben, C., Deschoolmeester, V., De Waele, J., Jacobs, J., Van Den Bossche, J., Wouters, A., Peeters, M., Rolfo, C., Smits, E., Lardon, F., Pauwels, P. 2018. Hypoxia-induced cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is mediated by HIF-1 α and mutant p53 and can be overcome by induction of oxidative stress. *Cancers (Basel)*, 21; 10(4):126.
- Dharap, S. S., Wang, Y., Chandna, P., Khandare, J. J., Qiu, B., Gunaseelan, S., Minko, T. et al. 2005. Tumor-specific targeting of an anticancer drug delivery system by LHRH peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(36), 12962-12967.
- Duffy, M.J., Synnott, N.C. and Crown, J. 2017. Mutant p53 as a target for cancer treatment. *European Journal of Cancer*, v 83: 258-265.
- Espinosa, E., Zamora, P., Feliu, J. and Barón, M. G. 2003. Classification of anticancer drugs—a new system based on therapeutic targets. *Cancer treatment reviews*, 29(6), 515-523.
- Fleming, R. A., Miller, A. A., and Stewart, C. F. 1989. Etoposide: an update. *Clinical pharmacy*, 8(4), 274-293.
- Folkman, J., Hahnfeltdt, P., Hlatky, L. 2000. Cancer: looking outside the genome. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1:76–9.
- Fransson, Å., Glaessgen, D., Alfredsson, J., Wiman, K. G., Bajalica-Lagercrantz, S., Mohell, N. 2016. Strong synergy with APR-246 and DNA-damaging drugs in primary cancer cells from patients with TP53 mutant High-Grade Serous ovarian cancer. *Journal of ovarian research*, 9(1), 27.
- Freed-Pastor, W.A. and Prives, C. 2012. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes & development*, 26(12), 1268-1286.

- Gaiddon, C., Lokshin, M., Ahn, J., Zhang, T., Prives, C. 2001. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol*, 21: 1874–1887.
- Garman, K.S., Nevins, J.R., Potti, A. 2007. Genomic strategies for personalized cancer therapy. *Hum Mol Genet*, 16:R226–32.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V.F., Karakaidos, P., Zacharators, P., Kotsinas, A., Liloğlu, T. *et al.* 2005. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, 434: 907–913.
- Green, D.R. and Kroemer, G. 2009. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*, 458: 1127–1130.
- Guillot, B., Bessis, D. and Dereure, O. 2004. Mucocutaneous side effects of antineoplastic chemotherapy. *Expert opinion on drug safety*, 3(6), 579–587.
- Hainaut, P. and Wiman, K.G. (eds). 2005. 25 Years of p53 Research. Springer: Dordrecht. ISBN 1-4020-2920-9.
- Hall, P. A. and McCluggage, W. G. 2006. Assessing p53 in clinical contexts: unlearned lessons and new perspectives. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 208(1), 1-6.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100:57–70.
- Hanahan, D. And Weinberg, R.A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 4;144(5):646-74.
- Hayden, E.C. 2009. Personalized cancer therapy gets closer. *Nature*, 458:131–2.
- Hong, B., van den Heuvel, P. J., V Prabhu, V., Zhang, S., and S El-Deiry, W. 2014. Targeting tumor suppressor p53 for cancer therapy: strategies, challenges and opportunities. *Current drug targets*, 15(1), 80-89.
- Hu, C.M.J. and Zhang, L. 2012. Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochemical pharmacology*, 83(8), 1104-111.
- Iacobuzio-Donahue, C.A. 2009. Epigenetic changes in cancer. *Annu Rev Pathol*, 4:229–49.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. and Ward, E. 2010. Cancer statistics, 2010. *CA: a cancer journal for clinicians*, 60(5), 277-300.
- Joseph, B., Ekedahl, J., Lewensohn, R., Marchetti, P., Formstecher, P., & Zhivotovsky, B. 2001. Defective caspase-3 relocalization in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene*, 20(23), 2877.
- Kaufmann, S.H. and Vaux, D.L. 2003. Alterations in the apoptotic machinery and their potential role in anticancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47):7414.
- Ko, J. C., Syu, J. J., Chen, J. C., Wang, T. J., Chang, P. Y., Chen, C. Y., Lin, Y. W. *et al.* 2015. Resveratrol Enhances Etoposide-Induced Cytotoxicity through Down-Regulating ERK 1/2 and AKT-Mediated X-ray Repair Cross-Complement Group 1 (XRCC 1) Protein Expression in Human Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Basic & clinical pharmacology &*

toxicology, 117(6), 383-391.

- Kobayashi, N., Abedini, M., Sakuragi, N., Tsang, B.K. 2013. PRIMA-1 increases cisplatin sensitivity in chemoresistant ovarian cancer cells with p53 mutation: a requirement for Akt down-regulation. *J Ovarian Res*, 6:7. doi:10.1186/1757-2215-6-7.
- Koçak Farma İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş. 2009. Etoposide prospektüsü. <http://kocakfarma.com/urun-aciklama.aspx?bolumSeo=kisabilgi&id=75&lang=> [Son erişim tarihi: 20.11.2019].
- Lambert, J. M.R., Gorzov, P., Veprintsev, D. B., Söderqvist, M., Segerbäck, D., Bergman, J., Bykov, V. J. 2009. PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. *Cancer cell*, 15(5), 376-388.
- Lambert, J.M.R., Moshfegh, A., Hainaut, P., Wiman, K.G., Bykov, V.J.N. 2010. Mutant p53 reactivation by PRIMA-1^{MET} induces multiple signalling pathways converging on apoptosis. *Oncogene* 29: 1329–1338.
- Lane, D. P. and Hupp, T. R. 2003. Drug discovery and p53. *Drug discovery today*, 8(8), 347-355.
- Levine, A. J. 1997. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *cell*, 88(3), 323-331.
- Levine, A.J. and Oren, M. 2009. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*, 9(10):749-758.
- Liu, D.S., Read, M., Cullinane, C., Azar, W.J., Fennell, C.M., Montgomery, K.G., Haupt, S., Haupt, Y., Wiman, K.G., Duong, C.P., Clemons N.J., Phillips W.A. 2015. APR-246 potently inhibits tumour growth and overcomes chemoresistance in preclinical models of oesophageal adenocarcinoma. *Gut*, 64(10):1506-16.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. 2000. Molecular Cell Biology. W. H. Freeman, 4th edition, New York, 1184 p.
- Lopez-Lazaro, M. 2010. A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. *Mol Med*, 16(3-4): 144–153.
- Reddy, E.P., Reynolds R.K., Santos, E., Barbacid, M. 1982. A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T24 human bladder carcinoma oncogene. *Nature*, 300:149–52.
- Robles, A.I., Jen, J., Harris, C.C. 2015. Clinical outcomes of TP53 mutations in cancers. *Cold Spring Harbor Perspective in Medicine*, 1;6(9). pii: a026294.
- Ma, W.W., Adjei, A.A. 2009. Novel agents on the horizon for cancer therapy. *CA Cancer J Clin*, 59:111–37.
- Magrini, R., Russo, D., Ottaggio, L., Fronza, G., Inga, A. and Menichini, P. 2008. PRIMA-1 synergizes with adriamycin to induce cell death in non-small cell lung cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*, 104(6), 2363-2373.
- Martins C.P., Brown-Swigart, L. and Evan, G.I. 2006. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell* 127: 1323–1334.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P. *et al.* 2003.

- p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, 11: 577–590.
- Mirza, A., Wu, Q., Wang, L., Mcclanahan, T., Bishop, W.R., Gheyas, F. *et al.* 2003. Global transcriptional program of p53 target genes during the process of apoptosis and cell cycle progression. *Oncogene*, 22: 3645–3654.
- Mogi, A. and Kuwano, H. 2011. TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011: 583929.
- Mohell, N., Alfredsson, J., Fransson, Å., Uustalu, M., Byström, S., Gullbo, J., Wiman, K. G. *et al.* 2015. APR-246 overcomes resistance to cisplatin and doxorubicin in ovarian cancer cells. *Cell Death Disease*, 6(6), e1794.
- Mohell, N., Fransson, A., Alfredsson, J., von Euler, M., Björklund, U., Abrahmsen, L. 2016. Synergistic effect with Apr-246 and standard chemotherapy in small cell lung cancer cells carrying smoking-associated TP53 mutations. Proceedings: AACR 107th Annual Meeting; April 16-20, 2016; New Orleans, LA.
- Mohell, N., Liljebris, C., Alfredsson, J., Lindman, Y., Uustalu, M., Uhlin, T. *et al.* 2010. Preclinical efficacy and toxicology studies of apr-246, a novel anticancer compound currently in clinical trials for refractory hematological malignancies and prostate cancer. *Blood*, 116:1806.
- Mukherjee, S. 2010. The emperor of all maladies: a biography of cancer. Simon and Schuster.
- Muller, P.A.J., Caswell, P.T., Doyle, B., Iwanicki, M.P., Tan, E.H., Karim, S. *et al.* 2009. Mutant p53 drives invasion by promoting integrin recycling. *Cell*, 139: 1327–1341.
- Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M.A., Harris, C.C., Hainaut, P. 2002. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat*, 19: 607–614.
- Ölmez, P. 2016. Kemoterapide sık kullanılan antineoplastik ilaçlar. *Acıbadem hemşirelik*, sayı:94.
- Poeta, M.L., Manola, J., Goldwasser, M. A., Forastiere, A., Benoit, N., Califano, J.A., Westra, W. *et al.* 2007. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine*, 357(25), 2552-2561.
- Rajagopalan, H. and Lengauer, C. 2004. Aneuploidy and cancer. *Nature*, 432:338–41.
- Rapp, E., Pater, J. L., Willan, A., Cormier, Y., Murray, N., Evans, W. K., Arnold, A. M. *et al.* 1988. Chemotherapy can prolong survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer--report of a Canadian multicenter randomized trial. *Journal of Clinical Oncology*, 6(4), 633-641.
- Reddy, N.L., Hill, J., Ye, L., Fernandes, P.B., and Stout, D.M. 2004. Identification and structure–activity relationship studies of 3-methylene-2-norbornanone as potent anti-proliferative agents presumably working through p53 mediated apoptosis. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 14(22), 5645-5649.
- Riedl, S.J. and Shi, Y. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(11):897-907.
- Rivlin, N., Brosh, R., Oren, M. and Rotter, V. 2011. Mutations in the p53 tumor

- suppressor gene: important milestones at the various steps of tumorigenesis. *Genes & cancer*, 2(4), 466-474.
- Robles, A.I. Jen, J., Harris, C.C. 2016. Clinical outcomes of tp53 mutations in cancers. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1;6(9).
- Selivanova, G. A. and Wiman, K. G. 2007. Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene*, 26(15), 2243.
- Service, R. F. 2016. Rescuing the guardian of the genome. *Science (New York, NY)*, 354(6308), 26.
- Shen, J., Vakifahmetoglu, H., Stridh, H., Zhivotovsky, B. and Wiman, K.G . 2008. PRIMA-1MET induces mitochondrial apoptosis via activation of caspase-2. *Oncogene* 27: 6571–6580.
- Sherr, C.J. and Weber, J.D . 2000. The ARF/p53 pathway. *Curr Opin Genet Dev*, 10: 94–99.
- Sigal, A. and Rotter, V. 2000. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res*, 60: 6788–6793.
- Soussi, T. and Lozano, G. 2005. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochemical and biophysical research communications*, 331(3), 834-842.
- Soussi, T. and Wiman, K.G . 2007. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell*,12: 303–312.
- Spira, A. and Ettinger, D. S. 2004. Multidisciplinary management of lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 350(4), 379-392.
- Stanbridge, E.J. 1990. Identifying tumor suppressor genes in human colorectal cancer. *Science*, 247:12–3.
- Stoler, D.L., Chen, N., Basik, M., Kahlenberg, M.S., Rodriguez-Bigas, M.A., Petrelli, N. J., Anderson, G.R. 1999. The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(26), 15121-15126.
- Suehisa, H. and Toyooka, S. 2009. Adjuvant chemotherapy in completely resected non-small-cell lung cancer. *Acta Med Okayama*, 63(5):223-30.
- Synnott, N. C., Madden, S. F., Bykov, V. J., Crown, J., Wiman, K. G., and Duffy, M. J. 2018. The mutant p53-targeting compound APR-246 induces ROS-modulating genes in breast cancer cells. *Translational oncology*, 11(6), 1343-1349.
- Synnott, N.C., Murray, A.M., O'Donovan, N., Duffy, M.J., Crown, J. 2017. Combined treatment using the anti-p53 drug, APR-246 and eribulin: Synergistic growth inhibition in p53-mutated breast cancer cells.
- Travis, W.D., Brambilla, E., Muller-Mermelink, H.K. and Harris, C.C. 2004. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Volume 10, IARC Pres: 1-344.
- Ventura, A., Kirsch, D.G., Mclaughlin, M.E., Tuveson, D.A., Grimm, J., Lintault, L. *et al.* 2007. Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo*. *Nature* 445: 661–665.

- Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 10:789–99.
- Vousden, K.H. and Lu, X. 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*, 2: 594–604.
- Vousden, K.H. and Prives, C. 2009. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*, 137: 413–431.
- Walerych, D., Lisek, K. and Del Sal, G. 2015. Mutant p53: one, no one, and one hundred thousand. *Frontiers in oncology*, 5, 289.
- Wassman, C. D., Baronio, R., Demir, Ö., Wallentine, B. D., Chen, C. K., Hall, L. V., Chamberlin, A. R. 2013. Computational identification of a transiently open L1/S3 pocket for reactivation of mutant p53. *Nature communications*, 4, 1407.
- Weir, B., Zhao, X., Meyerson, M. 2004.. Somatic alterations in the human cancer genome. *Cancer Cell*, 6(5):433-8.
- Wiman, K.G. 2006. Strategies for therapeutic targeting of the 53 pathway in cancer. *Cell Death Differ*, 13: 921–926.
- Wiman, K. G. 2010. Pharmacological reactivation of mutant p53: from protein structure to the cancer patient. *Oncogene*, 29(30), 29(30), 4245.
- World Health Organization. 2019. Estimated number of new cases in 2018, worldwide, all cancer, both sexes, all ages. Grapph Production: Global Cancer Observatory. <http://gco.iarc.fr/>. [Son erişim tarihi: 30.09.2019].
- Xu, D., Qian, W., Gruber, A., Björkholm, M., Chen, Z., Zaid, A. *et al.* 2000. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild type p53 in human tumor cells. *Oncogene*, 19: 5123–5133.
- Xue, W., Zender, L., Miething, C., Dickins, R.A., Hernando, E., Krizhanovsky, V. *et al.* 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* 445: 656–660.
- Zhou, X., Hao, Q. And Lu, H. 2019. Mutant p53 in cancer therapy-the barrier. *Journal of Molecular Cell Biology*, 1;11(4):293-305.

ÖZGEÇMİŞ

FATMA T. KAHRAMAN

fturkkahraman@akdeniz.edu.tr



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans (2017-2020)	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya
Lisans (2004-2008)	Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği Anabilim Dalı ve İlköğretim Matematik Öğretmenliği Yandalı Programı, Konya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Bilgisayar İşletmeni (2012-Devam Ediyor)	Akdeniz Üniversitesi Öğrenci İşleri Daire Başkanlığı - Kurumsal İlişkiler Koordinatörlüğü, Antalya
Memur (2010-2012)	Kastamonu Üniversitesi Basın ve Halkla İlişkiler Koordinatörlüğü - Kastamonu
Öğretmen (2009-2010)	Seviye Dergisi Dershaneleri – Ankara
Öğretmen (2008-2009)	M.E.B - Yavuz Selim İlköğretim Okulu - Kahramanmaraş
Öğretmen (2006-2008)	Konya Büyükşehir Belediyesi - Şehit ve Gazi Yakınlarına Gönüllü Öğretmenlik Projesi- Konya