

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .

← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**RENAL KANSER HÜCRE SOYLARINDA SÜKSİNİK
ASİTİN ANTİKANSER ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

GÖKSU KAŞARCI

**DANIŞMAN
PROF. DR. BEDİA ÇAKMAKOĞLU**

**MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İ.Ü. Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Moleküler Tıp Programında Yüksek Lisans öğrencisi **Göksu KAŞARCI**'nin tarafından **Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU**'nun danışmanlığında hazırlanan "**Renal Kansere Hücre Soylarında Süksinik Asitin Antikanser Etkinliğinin Araştırılması**" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 29/04/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. İlhan YAYLIM
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri**(Danışman)**

Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Arzu ERGEN
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Elif ÖZKÖK
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE Sinirbilim
Anabilim Dalı

Jüri

Prof. Dr. Ebru Işık EMEKLİ
ALTURFAN
Marmara Üni. Diş. Hekimliği Fak
Temel Tıp Bil. Böl.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

**Göksu KAŞARCI**

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince daima yanımda olup bana her konuda anlayış ve yol gösteren İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi çok saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Bedia ÇAKMAKOĞLU'na teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen ikinci tez danışmanım Dr. Öğretim Üyesi E. Sinem İPLİK'e,

Tüm yardım ve destekleri için Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hayriye Arzu ERGEN'e ve tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve çalışanlarına,

Deney sürecindeki yardımlarından dolayı MSc. Barış ERTUĞRUL, Bio. Merve Nur ATAŞ ve MOLGEN çalışanlarına,

Tez dönemim boyunca her türlü konuda yanımda olan ve beni yalnız bırakmayan Alper KAVSARA'ya ve canım kardeşim Aliye ÜNAL'a,

Ve bu süreç boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok sevgili ailem Bekir ÜNAL, Ayşe ÜNAL ve Ada ÜNAL'a içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 32550

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Renal Kanser	3
2.1.1. Epidemiyoloji ve İnsidans.....	3
2.1.2. Renal Karsinoma Sınıflandırılması.....	4
2.1.3. Renal Karsinoma Evrelemesi.....	7
2.1.4. Renal Hücreli Karsinoma Etiyolojisi ve Risk Faktörleri	9
2.1.4.1. Sigara Kullanımı	9
2.1.4.2. Obezite	10
2.1.4.3. Fiziksel aktivite	11
2.1.4.4. Analjezik İlaçların Kullanımı.....	11
2.1.4.5. Mesleki ve Çevresel Risk Faktörleri	11
2.1.4.6. Genetik Faktörler	12
2.1.5. Renal Hücreli Karsinoma Patogenezi	13
2.1.5.1. Renal Hücreli Karsinomaların Apoptoz ile İlişkisi.....	16
2.1.6. Tedavi Yöntemleri	17
2.2. Süksinik Asit.....	18
2.2.1. Süksinik Asitin TCA Siklusu ve Kanser ile İlişkisi.....	19
2.2.2. Süksinik Asitin Antikanser Etkinliğine Yönelik Yapılan Çalışmalar.....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. Kullanılan Materyaller	22

3.1.1. Kimyasal Malzemeler	22
3.1.2. Cihazlar	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. CAKI-2 Hücre Hattı.....	23
3.2.2. ACHN Hücre Hattı.....	24
3.2.3. MRC-5 Hücre Hattı.....	24
3.2.4. Hücre Ekimi	24
3.2.5. Hücrelerin Pasajlanması.....	25
3.2.6. Hücrelerin Dondurulması.....	25
3.2.7. Süksinik Asit Solüsyonu Hazırlanması.....	25
3.2.8. WST-1 Yöntemi ile Hücre Canlılık Tayini	26
3.2.9. Apoptoz Ölçümleri.....	26
3.2.9.1. Annexin V-FITC ile Apoptoz/Nekroz Tayini	26
3.2.9.2. Cell Death Detection ELISA Yöntemi ile Hücre Ölüm Tipi Tayini- Apoptoz/Nekroz Analizi	28
3.2.10. Deney Verilerinin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Süksinik Asitin Doz ve Zamana Bağlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkinliği	31
4.2. Apoptotik Değerlendirmeler	33
4.2.1. Akış Sitometrik Annexin V-FITC Analizi.....	33
4.2.2. ELISA Kiti ile Hücre Ölümü Tayini.....	35
5. TARTIŞMA	37
KAYNAKLAR	42
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	51
ÖZGEÇMİŞ	52

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: WHO 2016 Verilerine Göre Renal Hücreli Karsinomalar	5
Tablo 2-2: Renal Hücreli Karsinomaların TNM Evreleme Sistemine Göre Değerlendirilmesi.....	8
Tablo 2-3: Renal Hücreli Karsinomaların Fuhrman Evreleme Sistemine Göre Histolojik Derecelendirilmesi	9
Tablo 3-1: Çalışmada Kullanılan Hücreler ve Besi Ortamları	22



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: WHO 2018 Verilerine Göre Renal Kanser 5 Yıllık Tahmini Prevalansı	4
Şekil 2-2: Renal hücreli karsinoma alt tipleri..	6
Şekil 2-3: TNM evrelemesinin şematik gösterimi.	7
Şekil 2-4: 3. Kromozom Kısa Kolunda Yer Alan Genler ve Renal Karsinoma ile İlişkileri.....	13
Şekil 2-5: HIF1 α ve β genlerinin yapısal görüntüsü	14
Şekil 2-6: Normoksi, hipoksi ve mutant <i>VHL</i> geni durumunda pVHL aracılı HIF regülasyonu	15
Şekil 2-7: HIF-1'in mitokondriyal aktivite ve apoptoz üzerindeki etkinliği	17
Şekil 2-8: Normal Hücre ve Tümör Hücresinde Hücre Enerji Metabolizması Farklılıkları	19
Şekil 2-9: TCA siklusu	20
Şekil 4-1: CAKI-2 Renal Karsinoma Hücre Hattı Üzerinde Süksinik Asitin Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Sitotoksik Etkinliğinin % Canlılık Üzerinde Analizi.....	31
Şekil 4-2: ACHN Renal Adenokarsinoma Hücre Hattı Üzerinde Süksinik Asitin Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Sitotoksik Etkinliği Sonucu Hücre Canlılığı.....	32
Şekil 4-3: CAKI-2, ACHN ve MRC-5 Hücre Hatlarının Artan Dozlarda Süksinik Asit ile 24 Saatlik İnkübasyonu Sonucunda Hücrelerin Canlılık Yüzdesi.....	33
Şekil 4-4: CAKI-2 hücre hattı üzerinde 25 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlarında uygulanan süksinik asitin Apoptoz/Nekroz tayini.....	34
Şekil 4-5: ACHN hücre hattı üzerinde 25 μ M ve 50 μ M konsantrasyonlarında uygulanan süksinik asitin Apoptoz/Nekroz tayini.....	35
Şekil 4-6: Süksinik Asitin Değişen Dozlarının CAKI-2, ACHN ve MRC-5 Hücre Hatlarında DNA Fragmentasyonuna Etkisi	36

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ATP: Adenozin Trifosfat

TCA: Trikarboksilik Asit

WHO: World Health Organisation (Dünya Sağlık Örgütü)

TCGA: Kanser Genom Atlası

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

RNA: Ribonükleik Asit

AJCC: American Joint Committee on Cancer (Amerikan Kanser Komitesi)

TNM: Tümör-Nod-Metastaz Sistemi

IARC: International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırmaları Derneği)

BPDE: Benzo[α]piren diol epoxide

VKİ: Vücut Kitle İndeksi

TCE: Trikloro Etilen

BAP1: BRCA-associated protein-1

FLCN: Folikulin

FH: Fumarat Hidrataz

SDH: Süksinat Dehidrogenaz

TSC: Tüberklozis Sklerozis

VHL: von Hippel Lindau

SNP: Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotid Polimorfizmi)

HIF α : Hypoxia Inducible Factor α (Hipoksi İndüklenebilir Faktör α)

PHD: Prolil Hidroksilaz enzimi

HRE: Hypoxia Response Element

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endoteliyal Büyüme Faktörü)

PDGF: Platelet-derived Growth Factor (Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü)

TGF α : Transforming Growth Factor α (Transforme Edici Büyüme Faktörü α)

LDH: Laktat Dehidrogenaz enzimi

GLUT1: Glukoz Transporter-1

E. coli: *Escherichia coli*

ETS: Elektron Transport Sistemi

NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotid

FAD: Flavin Adenin Dinükleotid

α -TOS: α -Tokoferol süksinat

IAP: Inhibitor of Apoptosis (Apoptozu İnhibe Edici Protein)

FBS: Fetal Bovine Serum

ATCC: American Type Culture Collection, LGC Standart



ÖZET

Kaşarcı, G. (2019). Renal Kanser Hücre Soylarında Süksinik Asitin Antikanser Etkinliğinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp AD, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Renal kanserler, tüm kanser türleri arasında görülme sıklığı açısından 14. sırada yer alan, özellikle kemoterapi ve radyoterapi türevli tedavi yöntemlerine karşı dirençli bir kanser türüdür. Bu nedenle renal kansere yönelik etkin alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılması önem teşkil etmektedir. Yakın zamanda yapılan çeşitli çalışmalarda farklı kanser türleri üzerinde süksinik asitin hücre ölümünü uyarmada etkin rol aldığı görülmüştür. Süksinik asit canlı organizmalarda ATP yapımında rol oynayan trikarboksilik asit siklusunda yer alan bir ara metabolittir. Metabolizmada yer alması dolayısıyla sağlıklı hücreler üzerinde bilinen bir yan etkisi yoktur.

Tez çalışmamız kapsamında süksinik asit uygulamasının renal kanser üzerinde antikanser etkinliğini ölçmeyi amaçladık. Renal kanser hücre hatları (CAKI-2 ve ACHN) ve sağlıklı akciğer hücre hattı (MRC-5) artan konsantrasyon ve artan sürelerde süksinik asit ile inkübe edilmiştir. Süksinik asit uygulaması sonrasında hücrelerdeki canlılık yüzdesi WST-1 Sitotoksisite Testi ile ölçülmüş olup; tetiklenen hücre ölümünün apoptoz/nekroz analizleri Akış Sitometrik Annexin V ve Hücre Ölümü Tayin yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Süksinik asitin, beklediğimiz üzere, sağlıklı hücrelerde hücre ölümü uyarıcı etkisi tespit edilmemiştir. Bununla birlikte CAKI-2 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliği 25µM ve 50µM konsantrasyonları için sırasıyla %89 ve %91 iken ACHN hücreleri üzerinde aynı dozlardaki etkinliği sırasıyla %59 ve %61 olarak ölçülmüştür.

Sonuç olarak, çalışmamızda süksinik asitin renal kanser hücre soyları üzerinde apoptotik etkinliği literatürde ilk kez çalışılmış olup potansiyel bir antikanser ajan olarak kullanılabileceğine dair izlenim elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Renal hücreli karsinoma, süksinik asit, apoptoz, antikanser, hücre kültürü.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 32550

ABSTRACT

Kaşarcı, G. (2019). Investigation of Succinic Acid for its Anticancer Activity on Renal Cancer Cell Lines. Istanbul University, Institute of Health Science, Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine. Master Thesis. Istanbul.

Renal cancers are the 14th most common cancer among all types of cancer. Mostly, it is observed that it develops resistance to chemotherapy and radiotherapy-derived treatment methods. For this reason, it is important to investigate new effective alternative treatment methods for renal cancer. Recently, several studies have shown that succinic acid plays a significant role via inducing apoptosis on different types of cancers. Succinic acid is an intermediate metabolite in the tricarboxylic acid cycle that play a role in production of ATP in living organisms. Because of its involvement in metabolism naturally, there is no known side effect on healthy cells.

In our thesis, we aimed to determine/investigate the anticancer activity of succinic acid administration on renal cancer cell lines (CAKI-2 and ACHN). The percentage of vitality in the cells after succinic acid administration was measured by WST-1 Cytotoxicity Test, following this, apoptosis / necrosis analyzes were performed by using Flow Cytometric Annexin V and Cell Death Detection ELISA methods. As we expected, the cytotoxic effect of succinic acid on healthy cells was not detected. However, the cytotoxic activity on CAKI-2 cells was determined/investigated as 89% and 91% for the concentrations of 25 μ M and 50 μ M, respectively, and the efficacy at the same doses on ACHN cells was 59% and 61%, respectively.

In conclusion, in our research, apoptotic activity of succinic acid on renal cancer cell lines was studied for the first time in our research and we obtained that it could be used as a potential anticancer agent.

Key words: renal cell carcinoma, succinic acid, apoptosis, anticancer, cell culture.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 32550

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Genitoüriner kanserler içerisinde en yaygın gözlenen ve en yüksek ölüm oranına sahip kanserlerden biri olan renal kanserler tüm kanserlerin %2-4'ünü oluşturmaktadır[1]. Renal kanserler morfolojik, histolojik ve genetik farklılıkları sebebiyle birçok farklı alt birime ayrılmakta ve bu alt birimlerin her birinin klinik seyri, patogenezi ve uygulanan tedavilere verdikleri yanıt farklılık göstermektedir. Renal kanserlerin en sık rastlanan alt tipi renal hücreli karsinoma olmakla birlikte tüm renal kanserlerin %80'ini oluşturmaktadır[2]. Yapılan epidemiyolojik çalışmalara göre obezite, diyabet, hipertansiyon gibi metabolik hastalıklar, sigara kullanımı ve genetik yatkınlık renal kanser riskini artıran önemli faktörlerdir[1], [3], [4]. Tedavi edilmediği takdirde lenf bezlerine ve bunu takiben yakındaki organlara metastaz yapma olasılığının yüksek olması, kanser hücrelerinin kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç geliştirilebilmesi ve en yaygın tedavi seçeneği olan cerrahi müdahaleden sonra sağ kalımın 5 yıldan az bir süre olması dolayısıyla hastanın yaşam süresinin ve kalitesinin artırılması için alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılması önem teşkil etmektedir.

Son yıllarda, yüksek yan etkiye sahip radyoterapi, kemoterapi gibi tedavilere alternatif olarak sağlıklı hücreler üzerinde toksik etki göstermeyen maddelerin kanser profilaksisi üzerindeki etkilerine dair çalışmalar değer kazanmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda birtakım kanser türleri üzerinde antikanser etkinliği gösterilmiş olan süksinik asitin renal kanser üzerinde apoptotik etkinliğine dair daha önce yapılmış bir çalışma bulunamamıştır.

Tarımsal karbonhidratların fermantasyonu ile elde edilen süksinik asit ($C_4H_6O_4$) gıda ve eczacılık ürünleri, yüzey aktif cisimleri ve deterjanlar, yeşil çözücüler ve biyolojik olarak çözünebilir plastik üretim endüstrilerinde veya kozmetik ve kimya endüstrilerinde yaygın kullanım alanına sahip olup günlük kullanım için kolay elde edilebilirdir[5]. Hücresel süreçlerde, süksinik asit, ATP yapımında rol oynayan trikarboksilik asit (TCA) siklusunda süksinat dehidrogenaz aracılığı ile fumarata dönüştürülen bir ara metabolittir[6]. Pek çok canlının metabolik süreçlerinde doğal olarak yer alması dolayısıyla hücrelerin fizyolojik durumu üzerinde bilinen bir olumsuz etkisi bulunmamaktadır.

Daha önceden süksinik asitin endometrium[7] ve akut T hücreli lenfoblastik lösemi hücre hatlarında antiproliferatif etkisinin gösterilmiş olması ve çalışmalarda

sağlıklı hücreler üzerinde herhangi bir toksik etki saptanmamış olması ve kozmetik, gıda, kimya alanlarında gündelik olarak yaygın kullanım alanına sahip olması çalışmamız için önemli bir kaynak oluşturmaktadır[8].

Tez çalışmamız kapsamında süksinik asitin renal kanser hücre hatları üzerindeki antiproliferatif ve apoptotik etkisi ilk kez çalışılacak olması dolayısıyla hem literatüre katkı sağlayacağı hem de daha ileri çalışmalarla desteklenerek kişiye özel tedavi yaklaşımları için potansiyel bir antikanser molekül olarak alternatif tedavi seçeneği oluşturabileceği kanısındayız.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Renal Kanser

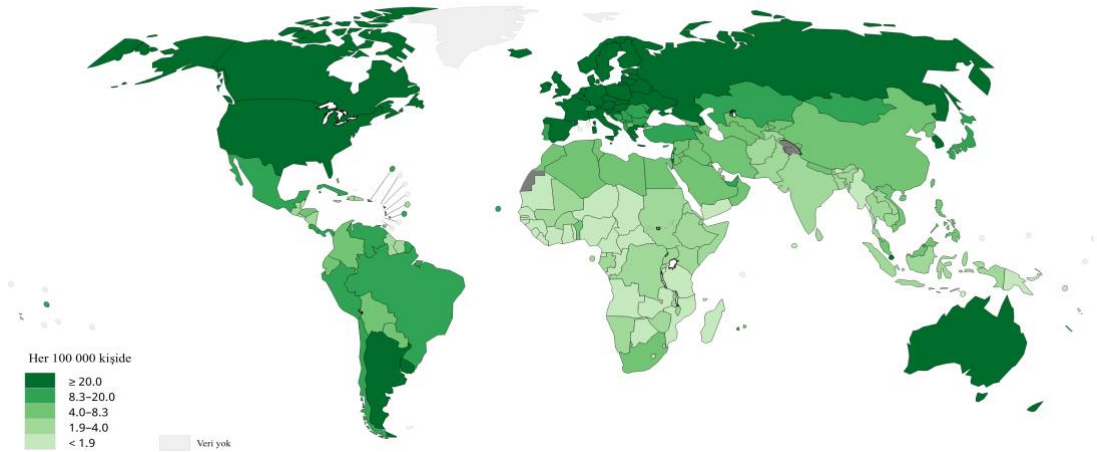
Böbrekler retroperitonda yer alan iyi korunmuş bir çift organdır. Anatomik olarak korteks ve medulladan oluşan bir parankim doku ile onu çevreleyen yağ dokusundan oluşmaktadır. Böbrekler işlevsel açıdan bakıldığında hormonal düzenlemeden elektrolit dengesine kadar organizmanın sağlığı açısından önemli pek çok olayda görev alarak homeostasinin korunmasını sağlarlar.

Renal kanser (böbrek kanseri) yetişkinlerde renal parankima ve renal pelvisten köken alan malignant tümörleri içermektedir[3]. Yetişkin böbrek kanserlerinin en yaygın gözlenen formu olan renal hücreli karsinoma tüm malignant tümörlerin %3'ünü oluşturmaktadır. Renal hücreli karsinoma olgularının yaklaşık %96'sı sporadik olarak gelişirken %4'lük bir kısmının kalıtsal olarak geçiş gösterdiği kaydedilmiştir[9]. Sporadik gelişen olgularda tek lezyon gözlenirken kalıtsal geçiş gösteren renal hücreli karsinomalar bilateral ve multifokal olma eğilimindedir[10].

2.1.1. Epidemiyoloji ve İnsidans

Renal hücreli karsinoma, tüm kanser türleri içinde dünya genelinde ölüm nedenleri açısından 14. sırada yer almaktadır ve insidansı her geçen yıl artmaktadır. 2018 yılı verilerine göre dünya genelinde 403 262 yeni renal karsinoma vakası gözlenirken bunların 175 098'i ölümle sonuçlanmıştır[11].

Renal hücreli karsinoma; başta Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika olmak üzere gelişmiş ülkelerde daha yüksek insidans oranına sahiptir[12]. Erkeklerde kadınlara göre daha yaygın olarak karşılaşılmakta olup ilerleyen yaşlarda maruz kalınan risk faktörlerinin etkisiyle birlikte hastalığın gözlenme ihtimali giderek artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organisation, WHO) 2018 yılı verilerine göre dünya genelinde her iki cinsiyet için renal kanserin 5 yıllık tahmini prevalansı Şekil 2-1'de yer almaktadır. Buna göre haritada koyu yeşil ile gösterilen bölgelerde (Kuzey Amerika, Kanada, Rusya ve Avustralya) 100 000 kişide renal kanser görülme oranı >20,0 olup daha az gelişmiş ülkelerde bu oran 1,9'dan daha küçüktür. Ülkemizde ise bu oran her 100 000 kişide 13,0 olarak kaydedilmiştir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar ışığında hastalığın insidansı ve mortalite oranları ile sosyo-ekonomik durum arasında bir ilişki bulunduğu dikkat çekilmektedir[13].



Şekil 2-1: WHO 2018 Verilerine Göre Renal Kansere 5 Yıllık Tahmini Prevalansı[14]

2.1.2. Renal Karsinoma Sınıflandırılması

Renal kanser; böbrekte meydana gelen bir dizi farklı özellikteki tümörlerden oluşmaktadır. Bu tümörlerin her biri farklı bir histolojiye ve farklı klinik seyre sahip olup uygulanan tedavilere farklı yanıtlar vermektedir. Renal kanserlerin en güncel sınıflandırması WHO tarafından 2016 yılında revize edilen ve tüm renal tümörlerin patoloji, epidemiyoloji ve genetik temellerine göre ayrıldığı sınıflandırmadır. Bu sınıflandırmaya göre renal tümörler temel olarak; renal hücreli tümörler, metanefrik tümörler, genellikle çocuklarda meydana gelen nefroblastik ve sistik tümörler, mezenkimal tümörler (çocuklarda ve yetişkinlerde ayrı olarak gruplandırılmış), karışık epitelial ve stromal tümör ailesi, nöroendokrin tümörler, metastatik tümörler ve diğer sınıflandırılmamış tümörler şeklinde ayrılmıştır[15].

Dünya üzerinde en yaygın gözlenen renal kanser türü insidansı her geçen yıl artan renal hücreli karsinomadır. Tüm böbrek kanseri vakalarının yaklaşık olarak %70-75'inden sorumludur[16], [17].

Renal hücreli karsinomalar sahip oldukları histolojik ve sitolojik özelliklere göre farklı alt tiplere ayrılırlar. Berrak hücreli renal hücre karsinoması renal hücreli karsinomaların en yaygın gözlenen şeklidir. Renal hücreli karsinoma vakalarının ortalama %75'inden sorumludur. Berrak hücreli renal hücre karsinoması dışında papiller renal karsinoma (%5-10) ve kromofob renal karsinoma (%5) da diğer türlere göre daha yaygın gözlenen tiplerdir[10], [16].

Tablo 2-1: WHO 2016 Verilerine Göre Renal Hücreli Karsinomalar[16]

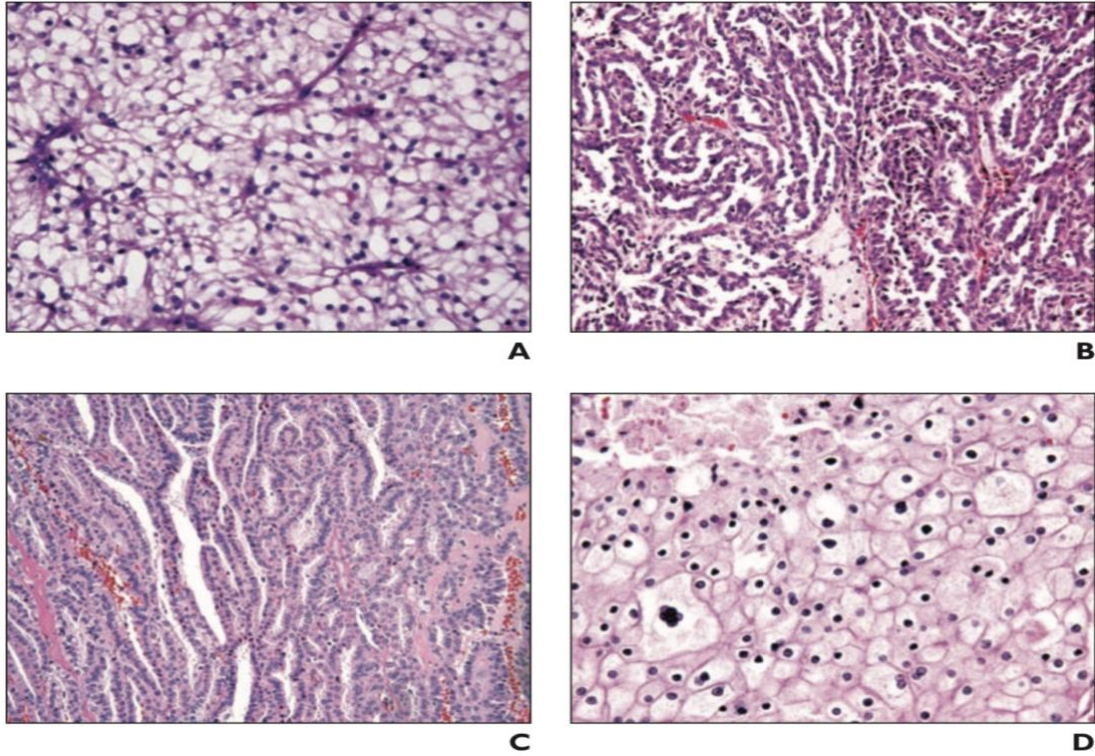
Renal Hücreli Karsinoma	
Berrak hücreli renal hücreli karsinoma	Malignite potansiyeli düşük olan multiloküler kistik böbrek neoplazmı
Papiller renal hücreli karsinoma (TipI ve II)	Tübülökist renal hücreli karsinoma
Kromofob renal hücreli karsinoma	Renal hücreli karsinomaa ile ilişkili kazanılmış kistik hastalık
Toplayıcı ductus (kanal) karsinoması	Berrak hücreli papiller karsinoma
Renal medullar karsinoması	SDH eksikliği ile ilişkili renal hücreli karsinoma
Musinöz tübüler ve iç hücreli karsinoma	Kalıtsal leiomatosis ile ilişkili
Papiller adenoma	MiT ailesi translokasyonu ile ilişkili renal hücreli karsinoma
Onkositoma	

Tablo 2-1’de WHO 2016 yılı verilerine göre revize edilen renal hücreli karsinoma sınıflaması yer almaktadır[16]. Hücrelerin sahip oldukları farklı histolojik ve sitolojik özelliklere göre ayrılmaları hastalığın ilerleyişi ve uygulanacak doğru tedavinin seçilmesi açısından büyük önem arz etmektedir. Kanser Genom Atlası (TCGA) çalışmalarına göre; berrak hücreli, kromofob ve papiller renal hücreli karsinoma dahil olmak üzere farklı histolojik renal hücreli karsinoma türleri üzerinde bir dizi kapsamlı moleküler araştırma yapılmıştır. Bu çalışma kapsamında renal hücreli karsinomaların somatik değişimleri, DNA metilasyon profilleri ve RNA ekspresyon seviyeleri üzerinde çalışılmış olup elde edilen bulgular sağ kalım ile ilişkilendirilmiştir[18].

Renal karsinomalarda hücresel ve genetik yapı ile hücrelerin histopatolojik özellikleri arasında güçlü korelasyonlar vardır[19]. Karsinogenez sürecinde; gen mutasyonları, anormal DNA metilasyonları, kromozom delesyonları, genomik instabilite ve kromozomal yapısal anomaliler şeklinde genetik değişimler oluşabilmektedir[20].

Berrak hücreli karsinoma nefronun proksimal tübül hücrelerinden köken alır ve glikojen ve lipid bakımından zengin berrak bir sitoplazmaya sahip bol miktarda üniform hücreler içerir. Makroskopik olarak bu karsinomalar, hücrelerin yüksek lipid içeriğinden

dolayı tipik bir sarı yüzeye sahiptir. Histolojik olarak ise, vasküler ağ içinde bulunan saydam veya eozinofilik sitoplazmaya sahip hücrelerden oluşmaktadır[21], [22] (Şekil 2-2, A). Genetik temelinde en yaygın olarak kromozom 3p'de delesyon bulunduğu tespit edilmiş olup özellikle 3. kromozomun kısa kolunda yer alan ve bir tümör süpresör gen olan von Hippel Lindau geninin inaktive olduğu gözlenmiştir[10], [20].



Şekil 2-2: Renal hücreli karsinoma alt tipleri. A: Berrak hücreli renal karsinoma, B ve C: Papiller renal karsinoma Tip I ve II (sırasıyla), D: Kromofob renal karsinoma[21].

Papiller renal hücreli karsinomalar, kromozomal anomalilere ve alel dengesizliklerine sahip, genetik olarak heterojen tümörlerdir. Morfolojik farklılıkları nedeniyle Tip I ve Tip II şeklinde 2 alt tipte gruplandırılır. Tip I papiller renal hücreli karsinoma, soluk sitoplazmalı, tek katmanlı küçük hücrelerden ve yuvarlak uçlu ovoid çekirdeklerle kaplı papillalardan oluşurken, tip II karsinomalar nispeten bol eozinofilik sitoplazmaya sahip, yalancı çok katlı ve büyük hücrelere sahiptir (Şekil 2-2, B ve C). Papiller renal hücreli karsinomalar yalnızca morfolojik olarak değil aynı zamanda genetik temelleri, hastalığın seyri ve sağ kalım oranları açısından da birbirlerinden farklılık göstermektedirler. 2001 yılında papiller renal hücreli karsinomaların alt

tiplerinin hasta sağ kalımıyla ilişkisi üzerine yapılan bir çalışmada Tip I karsinomaların Tip II'den daha iyi prognoz ve daha iyi sağ kalım gösterdiğini rapor etmişlerdir[23].

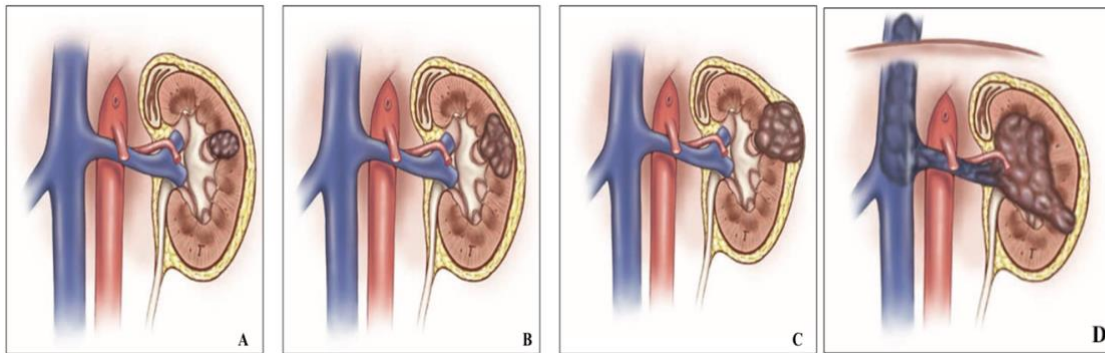
Kromofob renal hücre karsinoması ise yetişkin renal hücre tümörlerinin %5'ini oluşturmaktadır. Bu hücreler mikroskopik olarak, belirgin hücre zarlarına sahip olup, perinükleer haleler içeren düzensiz çekirdekler ve soluk eozinofilik sitoplazma ile karakterize edilir (Şekil 2-2, D). Mitokondriyal DNA'larında somatik mutasyonlar yaygın olup sıklıkla *TP53* ve *PTEN* genlerinin mutant olduğu görülmektedir[24]. Bununla birlikte kromozomal düzeyde incelendiğinde 1., 2., 6., 10., 13. ve 17. kromozom kayıpları da gözlenmiştir[16].

WHO tarafından 2016 yılında revize edilerek sınıflandırmaya dahil edilen ve popülasyonda daha nadir rastlanan farklı alt tipler de mevcuttur[16] (Tablo 2-1, sağ kolon).

2.1.3. Renal Karsinoma Evrelemesi

Evreleme sistemleri tümörün yayılma derecelerini yansıtacak şekilde tasarlanmış olup tedavi seçenekleri, hastalığın prognozu ve sağ kalım süreci hakkında bilgi edinebilmek için kullanılmaktadır. Kanserin doğru evrelenmesi hastalığın prognozunun ve en uygun tedavi yönteminin belirlenebilmesi için önemlidir[25]. Renal karsinomaların evrelenmesinde tümörün boyutu, yayılımı ve hastalığın prognozu temel alınan noktalardır[21].

Renal karsinomaların evrelenmesinde en güncel olarak kullanılan ve hastalığın prognozu ile en iyi korelasyonu yakalamış olan Amerikan Kanser Komitesi (American Joint Committee on Cancer, AJCC) tarafından oluşturulan klinik evreleme metodu TNM (Tümör Metastaz Nod) sistemidir[26].



Şekil 2-3: TNM evrelemesinin şematik gösterimi[21].

TNM evrelemesinde tümörün boyutu, sahip olduğu lenf nodu miktarı ve tümörün uzak mesafe metastaz durumları değerlendirilmektedir (Tablo 2-2). T3a ve daha üzeri evrelerdeki karsinomalarda hastalığın prognozu tümörün renal fasya dışına ve retroperitona yayılmasından belirgin şekilde etkilenir[21]. Şekil 2-3'te gösterildiğine göre A: T1 evresinde, böbrek içi ile sınırlı ve boyutu 7cm'den daha küçük olan tümör, B: Yine böbrek içi ile sınırlı olup boyutu 7cm'yi aşmış olan T2 evresi tümörünü göstermektedir. C: T3 evresinde bulunan tümör büyük damarlara uzanmış ancak henüz Gerota Fasyasını aşmamış durumdadır. D: T3c evresi, alt ana toplardamarı geçerek diyaframa ulaşmış olan tümörü ifade etmektedir[21]. Daha düşük evreli karsinomalar daha uzun sağ kalım oranları ile ilişkilendirilmiştir[27].

Tablo 2-2: Renal Hücreli Karsinomaların TNM Evreleme Sistemine Göre Değerlendirilmesi[21]

Evreler	Patolojik Süreçleri
T0	Primer tümöre ait bulgunun elde edilemediği evre
T1	Tümör boyutunun 7cm'den küçük olduğu böbrekle sınırlı
T1a	Tümör boyutu <4cm
T1b	Tümör boyutu >4cm, ancak henüz 7cm büyüklüğe ulaşmamış
T2	Tümör böbrek ile sınırlı ancak 7cm boyutunu aşmış durumda
T3	Gerota Fasyasını aşmadan büyük damarlara ulaşmış halde
T3a	Gerota Fasyasının ötesine geçmeden adrenal bez veya perinefrik dokuları işgal etmiş halde
T3b	Tümör renal venlere ve diyaframın altındaki ana toplardamara uzanır
T3c	Diyaframı aşarak daha üst toplardamara ulaşır
T4	Tümör Gerota Fasyasını aşar
N0	Bölgesel lenf nodu yok
N1	Tek bir lenf nodu oluşumu
N2	Birden fazla lenf nodu bölgesi tespit edilmiş
M0	Uzak mesafeye metastaz bulgusu yok
M1	Uzak mesafeye metastaz yapılmış

Bunun yanı sıra renal hücreli karsinomalar histopatolojik olarak farklı özellikte nükleer yapı bulundurmalarından dolayı histolojik çekirdek yapılarının temel alındığı Fuhman evreleme sistemi de kullanılmaktadır (Tablo 2-3). Fuhman çekirdek yapısına göre 1. derece tümörlerde metastaz yeteneği açısından 2., 3. ve 4. derece tümörlere göre çok ciddi farklılık bulunmaktadır. Buna göre nükleer derecelendirme ile metastatik potansiyel ve sağ kalım açısından değerlendirme yapılabilmektedir[28].

Tablo 2-3: Renal Hücreli Karsinomaların Fuhman Evreleme Sistemine Göre Histolojik Derecelendirilmesi [28]

Fuhman Çekirdek Derecesi	Nükleer Çap	Nükleer Çeper Yapısı	Çekirdekçik Yapısı
1	10µm	Yuvarlak	Yok ya da çok küçük
2	>15µm	Düzensiz	Küçük
3	20 µm	Belirgin sınırlı	Belirgin
4	>20 µm	Çok çekirdekli	Kromatin kümelenmesi halinde

2.1.4. Renal Hücreli Karsinoma Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Böbreklerde kanser oluşumuna neden olan mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemesine rağmen renal hücre karsinomasını tetikleyen çeşitli risk faktörleri olduğu bilinmektedir. Renal hücreli karsinoma için obezite, sigara kullanımı, genetik yatkınlık ve hipertansiyon gibi iyi çalışılmış risk faktörlerinin yanı sıra beslenme alışkanlıkları, yetersiz fiziksel aktivite, kimyasal maruziyeti ve hemodiyaliz uygulaması gibi çevresel etmenlerin de hastalığın etiyolojisinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir[3]. Bu faktörlerin renal hücreli karsinoma oluşumundaki etkileri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

2.1.4.1. Sigara Kullanımı

Tütün ürünleri farklı tip kanserlere etken olabileceği düşünülen nikotin, karbon monoksit, benzen, nitrozamin gibi pek çok bileşen içermektedir[29].

Renal hücreli karsinoma ile tütün ürünleri kullanımı arasında direkt bir ilişki kurulamamasına karşın ‘International Agency for Research on Cancer’ (IARC) tarafından sigara kullanımı renal hücre karsinoması için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir[30], [31]. Literatürde sigara dumanının içerdiği bileşenlerin, renal

kanser başta olmak üzere farklı kanser türleri üzerindeki etkilerine dair çalışmalar yer almaktadır.

Sigara, içerdiği bileşenler nedeniyle doku hipoksisini indükleyerek Crohn Hastalığı ve KOAH (Kronik Akciğer Atardamar Hastalığı) gibi hastalıkların birincil nedeni olarak değerlendirilmektedir[32]. Hipoksik bozulmaların renal hücreli karsinoma oluşumunda etkili olduğu göz önünde bulundurulduğunda, sigara kullanımının KOAH ve karbon monoksit maruziyetine bağlı gelişebilen doku hipoksisi nedeniyle renal hücreli karsinoma için bir risk etmeni olabileceği düşünülmektedir.

Tütün ürünleri kullanımı ile renal hücreli karsinoma ilişkisine dair yapılan bir çalışmada daha önce hiç tütün ürünü kullanmamış bireylerle karşılaştırıldığında sigara kullanımının renal kanser gelişimini erkeklerde %50, kadınlarda ise %20 oranında artırdığı gösterilmiştir[33].

Clague ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, sigara dumanının içerdiği N-nitrozamin ile indüklenen DNA hasarının renal hücreli karsinoma hastalarının periferik kan lenfositlerinde, kontrol örneklerine göre daha yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir[34].

Buna ek olarak, sigara dumanının ana bileşenlerinden biri olan benzo[α]piren diol epoxide'in (BPDE) çeşitli kanserlerde kromozom 3p delesyonunu indüklediği bilinmektedir. Zhu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada renal hücreli karsinomada yaygın gözlenen bir genetik değişiklik olan kromozom 3p delesyonunun BPDE ile indüklenbildiği ve ayrıca kromozom 3p'deki BPDE'ye duyarlılığın, bireyin renal hücreli karsinomaya duyarlılığını yansıtabileceği ortaya koyulmuştur.[35]

2.1.4.2. Obezite

Obezite her ne kadar tip-2 diyabet, kardiyovasküler, böbrek, kas-iskelet sistemi hastalıkları ve psikolojik rahatsızlıklar da dahil olmak üzere sayısız hastalık için neden ve risk faktörü olarak tanımlanmış olsa da, obezitenin kanser riskleri ve sağ kalımla olan ilişkisi son yirmi yılda büyük ilgi kazanmıştır[36].

Vücut kütle indeksinin (VKİ) artması bireylerde çeşitli kanser türlerinin oluşumunu tetikleyebilmektedir. Dünya genelinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda aşırı kilolu ve obez bireylerde ilerleyen yıllarda renal hücreli kanser riskinin VKİ'ye göre arttığı kaydedilmiştir[37].

Macleod ve arkadaşlarının 2013 yılında Amerika'da yaşayan 50-76 yaşları arasındaki 77 260 kişi ile yaptıkları geniş kapsamlı kohort çalışmasında obezitenin renal

hücreli karsinoma ile anlamlı bir şekilde ilişkili olduğu rapor edilmiştir[38]. Bu ve bunu destekleyen farklı çalışmalara göre artan VKİ erkeklerde %25, kadınlarda ise %35 oranında renal hücreli karsinoma gelişim riskini artırmaktadır[38], [39].

Obezitenin karsinogenez sürecinde nasıl bir rol oynadığı tam olarak bilinmemekle birlikte, VKİ'deki artışın; oksidatif stres[40], adipokin üretimi[41] veya östrojen ve diğer steroid hormonların dolaşımdaki konsantrasyonlarının değişmesi[42] gibi çeşitli mekanizmalarla böbrekte hasar oluşumuna neden olduğu ve bu durumun da renal hücreli karsinoma gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir.

2.1.4.3. Fiziksel aktivite

Fiziksel aktivite ile renal hücreli karsinoma gelişiminin incelendiği çoğu çalışmada aralarında ters bir ilişki olduğu rapor edilmiştir[43]. Fiziksel aktivitenin vücut ağırlığını ve kan basıncını düşürücü, insülin duyarlılığını artırıcı, kronik inflamasyon ve oksidatif stresi azaltıcı yöndeki etkileri sayesinde renal hücreli karsinoma gelişim riskini azaltabileceği varsayılmaktadır[4].

Kapsamlı bir meta-analiz çalışmasında, yüksek ve düşük fiziksel aktivite düzeyi ile ilişkilendirilen renal karsinoma riskinde istatistiksel olarak anlamlı %12 azalma olduğu ortaya koyulmuştur[44].

2.1.4.4. Analjezik İlaçların Kullanımı

Analjezikler, dünya çapında en çok kullanılan reçetesiz ilaçlar olup çeşitli çalışmalarda analjezik ilaç kullanımının renal hücreli karsinoma riskini arttırdığını gösteren epidemiyolojik veriler yer almaktadır. Cho ve arkadaşlarının 2011 tarihli çalışmalarında aspirin ve asetaminofen kullanımının renal hücreli karsinoma ile direkt bir ilişkisi gösterilememiş ancak bununla birlikte düzenli olarak, aspirin dışında, parasetamol ve salisilat gibi nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçların alımının renal karsinoma riskini anlamlı bir şekilde artırabileceği gösterilmiştir[45]:[46].

2.1.4.5. Mesleki ve Çevresel Risk Faktörleri

Renal hücreli karsinoma genellikle bir meslek hastalığı olarak kabul edilmemekle birlikte çeşitli meslek gruplarında birtakım endüstriyel ajanlara maruz kalınmasının hastalığın oluşumu açısından risk oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu duruma istinaden en çok çalışılmış ve renal hücreli karsinomayla ilişkilendirilmiş olan kimyasal Trikloroetilen (TCE)'dir[47]. Metal yağ çözücü ve kimyasal katkı maddesi olarak yaygın kullanım alanına sahip olan TCE, ortak bir çevresel kirleticisi haline gelmiştir. TCE'yi renal hücreli karsinoma gelişimi riski ile ilişkilendiren çeşitli

epidemiyolojik çalışmalar yapılmış olup elde edilen bulgulara göre artan maruziyet düzeyleri ile birlikte renal hücreli karsinoma riskinde orantılı bir artış olduğu kaydedilmiştir[48]. Bunun yanı sıra insan böbrek korteksindeki yarılanma ömrü 10-30 yıl arasında olan kadmiyumun etkilediği proto-onkogen aktivasyonu, tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu, hücre adhezyon bozukluğu ve hasarlı DNA onarımının inhibisyonu gibi farklı moleküler mekanizmalar aynı zamanda kanser gelişiminde de rol oynamaktadır[49], [50]. Bu açıdan ele alındığında uzun süreli kadmiyum maruziyetinin de renal hücreli karsinoma gelişim riskini artırabileceği söylenebilir.

2.1.4.6. Genetik Faktörler

Ailesinde daha önceden renal hücreli karsinoma öyküsü bulunan kişilerde hastalığın gelişim riskinin 2 kat arttığı tespit edilmiştir[51].

Ailesel renal hücreli karsinomaya yönelik yapılan çalışmalar sonucunda sporadik renal karsinoma gelişimi ile de ilişkili olabileceği öne sürülen 11 gen (*BAP1*, *FLCN*, *FH*, *MET*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TSC1*, *TSC2* ve *VHL*) tespit edilmiştir[52], [53].

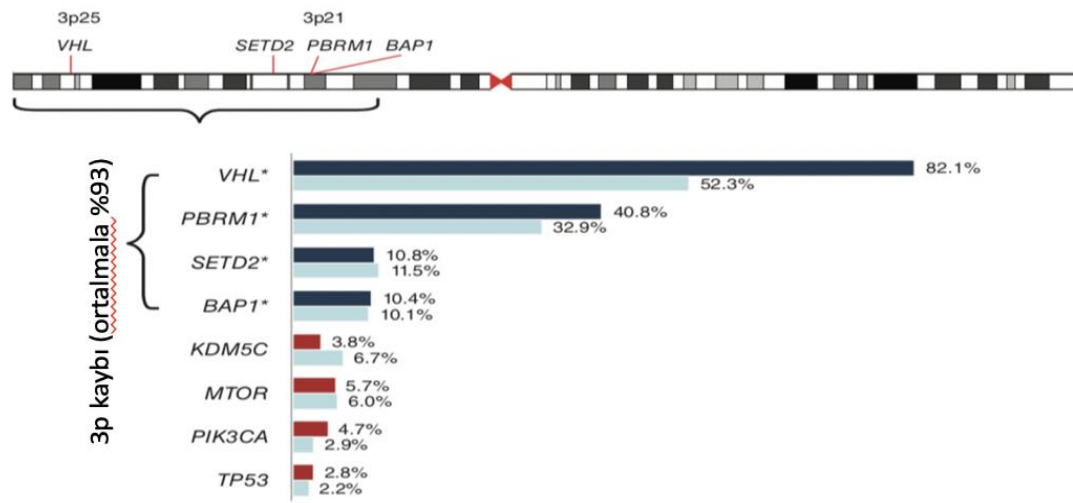
Bu genler arasında en çok çalışılmış olanı bir tümör süpresör gen olan *VHL* genidir. Berrak hücreli renal hücre karsinoma gelişiminde yüksek risk etmeni olarak değerlendirilen von Hippel Lindau sendromunun moleküler temelinde *VHL* tümör süpresör geninin mutasyona uğrayarak baskılanması yatmaktadır. *VHL* geninin baskılanması sonucunda inaktive olan *VHL* proteini (pVHL) sporadik berrak hücreli karsinomalarda moleküler belirteç olarak değerlendirilmektedir[54].

Pek çok çalışmada yukarıda belirtilmiş olan aday genlerle ilgili tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) taraması yapılmış ve renal hücreli karsinomaya neden olabilecek birkaç SNP belirlenmiştir ancak bunlarla ilgili elde edilen bilgiler kısıtlıdır[55].

Bunların dışında yaş, ırk ve cinsiyet faktörleri de renal hücreli karsinoma için önemli risk etmenleri arasında değerlendirilmektedir. Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen bulgulara göre renal hücreli karsinoma insidansı erkeklerde kadınlara göre daha yüksek olmakla beraber ilerleyen yaşla birlikte hastalığın oluşum riski de artmaktadır. Bunun yanı sıra gerek görüntüleme ve tanı tekniklerindeki gelişmeler gerekse organizmaya zararlı olan kimyasallara daha fazla maruz kalma açısından ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde renal hücreli karsinoma riskinin daha yüksek olduğu gözlenmektedir[4].

2.1.5. Renal Hücreli Karsinoma Patogenezi

Renal hücreli karsinomanın en yaygın gözlenen formu olan berrak hücreli karsinomalar sıklıkla VHL sendromu ile ilişkilendirilmektedir[16], [56]–[58]. VHL sendromu, etkilenen bireylerin böbrek de dahil olmak üzere birçok organda tümör gelişimi riski taşıdığı kalıtsal bir hastalıktır[10]. Bu sendroma sahip olan hastalarda ortalama 37 yaş civarında böbrek kistleri ve çoklu bilateral berrak hücreli renal karsinoma tespit edilmiştir[59]. *VHL* geni 3. kromozomun kısa kolunda yer alan tümör baskılayıcı bir gendir (Şekil 2-4)[60].



Şekil 2-4: 3. Kromozom Kısa Kolunda Yer Alan Genler ve Renal Karsinoma ile İlişkileri[60]

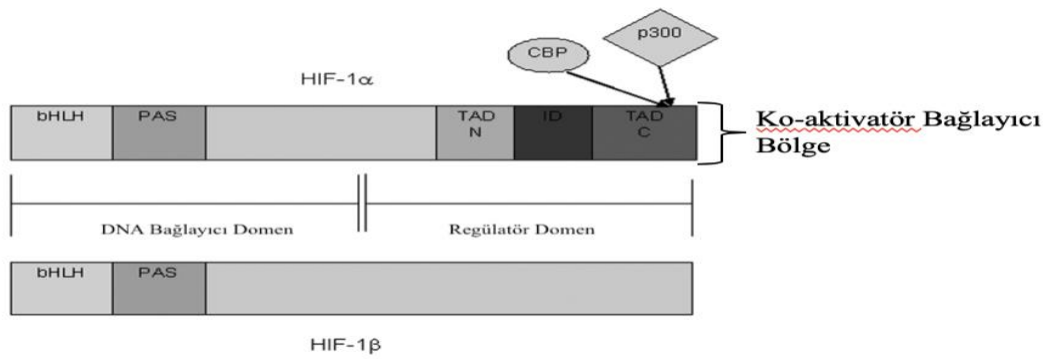
TCGA tarafından 2013 yılında 400 berrak hücreli renal hücre karsinoma hastası üzerinde yapılan tüm genom ve transkriptom analizleri ışığında kromozom 3p kaybının berrak hücreli renal karsinoma hastalığının temel bileşeni olduğu ortaya konulmuştur[18]. VHL proteinini (pVHL) kodlayan *VHL* geninde meydana gelen kopya sayısı delesyonları, inaktive edici mutasyonlar veya genin epigenetik olarak susturulması bu hastalıkta yaygın olarak karşılaşılan genetik değişikliklerdir[61]. Neredeyse tüm ailesel geçişli berrak hücreli renal karsinoma hastalarında bu gende kalıtsal bir mutasyon olduğu tespit edilmiştir[1].

pVHL, farklı efektör proteinleri farklı hedef proteinlere bağlamak için işaretleyici bir adaptör molekül görevi görür. Bu işlevi dolayısıyla bir dizi farklı biyokimyasal aktiviteyi düzenler ve çeşitli hücresel süreçleri kontrol eder. Bu süreçler arasında hipoksi indüklenebilir faktör α (HIF α)'yı oksijen bağımlı ubiquitin aracılı proteolitik degradasyon için hedefleme, mikrotübül stabilizasyonunu regüle etme, p53

aktivasyonu, nöronal apoptoz kontrolü, epitelyal-mezenkimal hücre değişimini baskılama ve nükleer faktör NF κ B'nin regülasyonu yer almaktadır. Sporadik ve kalıtsal geçişli berrak hücreli renal hücre karsinomalarında, pVHL'nin farklı aktiviteleri üzerinde farklı etkilere sahip olduğu gösterilen çok sayıda somatik VHL mutasyonu tanımlanmıştır[22].

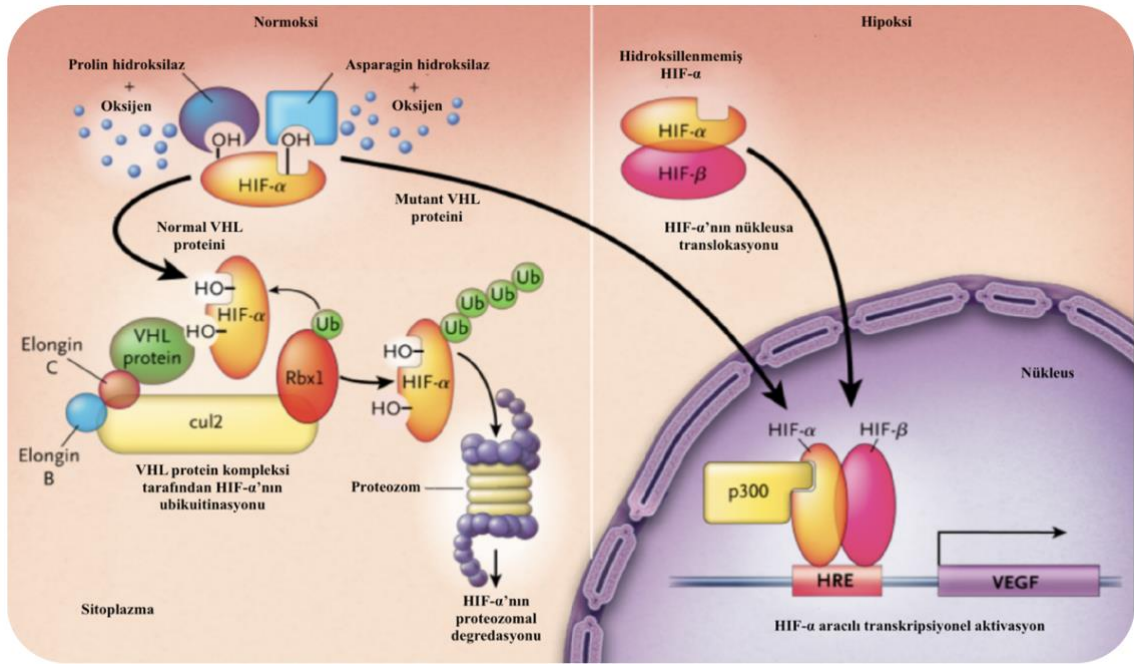
pVHL'nin görev aldığı hücresel olaylardan biri de hücrede oksijen seviyesinin normal şartların altına inmesi (hipoksi) ile uyarılan HIF α 1 ve 2'nin normal oksijen varlığı (normoksi) durumunda proteozomal olarak yıkımının sağlanmasıdır[62].

VHL'nin her iki allelinin kaybı berrak hücreli renal karsinoma patogeneğinde kritik rol oynayan pro-anjiyogenik genlerin ekspresyonunu regüle eden HIF'in sürekli olarak aktivasyonuna neden olmaktadır[63].



Şekil 2-5: HIF1 α ve β genlerinin yapısal görüntüsü[64].

HIF α ve β alt birimlerinden oluşan heterodimerik yapılı bir proteindir (Şekil 2-5)[64]. Yapısal olarak her iki alt birim de dimerizasyon ile DNA'ya bağlanmalarını sağlayacak olan temel heliks-loop-heliks motifi (bHLH) ve PAS domeni içermektedirler. Buna ek olarak HIF α karboksi terminal ucunda aktivitelerini düzenleyici regülatör domen içerir[64]. HIF α , çok hücreli organizmalarda hipoksiye karşı oluşturulan hipoksik yanıtın anahtar molekülü olup ortamda hücre için yeterli oksijenin bulunmadığı durumlarda sekans spesifik şekilde DNA'ya bağlanarak hedef aldığı genlerin ekspresyonlarını düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür[65].



Şekil 2-6: Normoksi, hipoksi ve mutant VHL geni durumunda pVHL aracılı HIF regülasyonu[65].

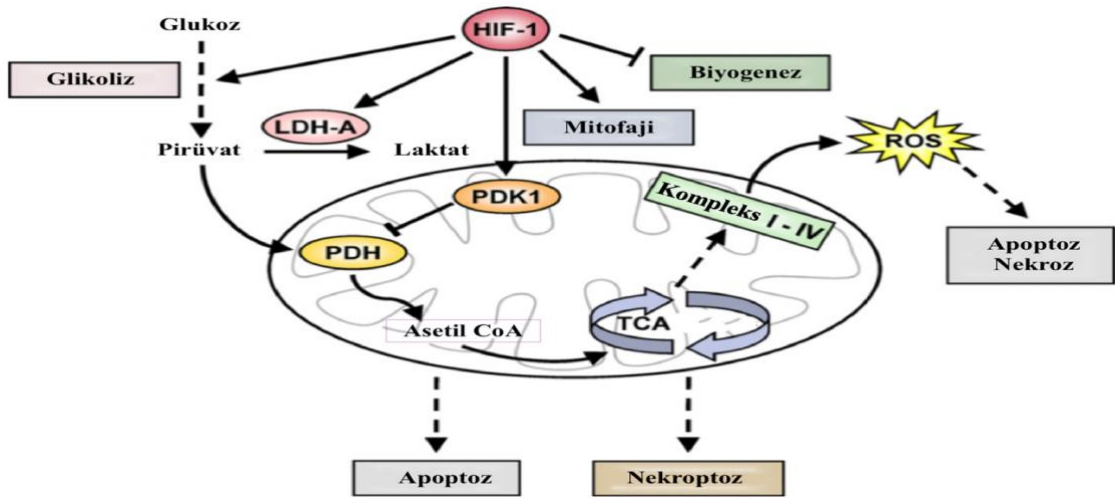
Normoksik şartlar altında HIF α alt birimi prolin-4-hidroksilaz (PHD1-3) tarafından 2 adet prolin kalıntısından, asparagin hidroksilaz tarafından ise bir asparagin kalıntısından oksijen bağımlı olarak hidroksillenir bu sayede pVHL'nin yer aldığı E3 ubikuitin ligaz kompleks tarafından tanınır ve ubikuitinasyon ve proteolitik degradasyon için hedeflenir[66]. Ancak hücrede gelişen hipoksik koşullar mevcudiyetinde HIF α proteolitik yıkımdan kaçarak nükleusa transloke olur ve nükleus içerisinde HIF β alt birimi ile etkileşerek aktif hale gelir. İki alt biriminin birleşmesi sonucu aktifleşen HIF molekülü p300 ve CBP ko-aktivatörleri ile de birleşerek DNA üzerinde '*Hypoxia Response Element (HRE)*' olarak adlandırılan DNA sekansına spesifik olarak bağlanır böylece hipoksiya ile indüklenebilen 60'tan fazla genin dahil olduğu çeşitli yolları stimüle eder[2] (Şekil 2-6)[65].

pVHL'nin işlevini kaybetmesi sonucu normoksik şartlarda baskılanması gereken HIF1 stabilize halde kalır ve hedef genleri olan VEGF, PDGF, TGF α gibi anjiyogenik genlerin ve büyüme faktörlerinin sürekli anlatımına neden olur[67]. Bununla birlikte HIF-1 farklı glikolitik enzimlerin aktivasyonunu değiştirerek ve glikolizin son ürünü olan piruvattan laktat oluşumunu indüklemeye yoluyla piruvatın TCA siklusuna katılımını engelleyerek hücrenin temel enerji kaynaklarını glikoliz ile sınırlı tutar[68].

2.1.5.1. Renal Hücreli Karsinomaların Apoptoz ile İlişkisi

Tek hücreli bir organizma için, hasar görmüş DNA'nın onarılması, hayatta kalmayı sağlayan tek geçerli yoldur. Bununla birlikte çok hücreli organizmalarda ise hasarlı DNA'ya sahip hücrelerin uygulayacağı strateji bu kadar kesin değildir. Çünkü DNA'da hasara neden olan bazı mutasyonlar hücre proliferasyonunu, hücreler arası bağlantıları veya hücrenin programlı ölümünü regüle eden proteinleri kodlayan genlerde meydana gelebilmektedir. Bu durum ise hücre için hayati önem taşıyan mekanizmaların aksamasına, hücre büyümesinin ve çoğalmasının kontrolden çıkmasına neden olmaktadır. Bu olasılık göz önünde bulundurulduğunda hücrenin neoplastik karakter kazanma riskinden ziyade hasarlı DNA'ya sahip olan hücreyi kontrollü bir şekilde ortadan kaldırması bir bütün olarak daha güvenli olacaktır. Hasarlı yapıya sahip hücrenin çevre hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılması programlı hücre ölümü 'apoptoz' olarak adlandırılmaktadır[69]. Apoptoz çok hücreli organizmalarda homeostaziye koruyan en temel mekanizmadır. Bu mekanizma embriyogenez, organ atrofisi, immün yanıt, inflamasyon ve yaralanma sonrası hücre veya dokuların ortadan kaldırılması gibi fizyolojik ve patofizyolojik işlemlerin düzenlenmesinde etkilidir[70].

HIF tarafından kontrol edilen hücresel yollar ve bu yollarla görevli proteinler arasında glukoz metabolizmasında görev alan enzimler ve transportunda işlev gören proteinler (LDH ve GLUT1 gibi), anti-apoptotik proteinler (Bcl-xl), büyüme faktörleri ve anjiyogenik proteinler (VEGF, PDGF, TGF α) yer almaktadır. Tümör hücrelerinin büyük çoğunluğunda, HIF1 α , apoptozun güçlü bir baskılayıcısı olarak işlev görür (Şekil 2-7)[68]. Yapılan çeşitli çalışmalarda HIF'in neoplastik hücrelerde geniş çaplı ilaç direncine katkı sağladığı gösterilmiştir[71]. Farklı araştırmacılar tarafından solid tümörlerde hipoksik mikroçevrenin kullanılan kemoterapötik ilaçların aktivitelerini baskılaması yoluyla tedavi amaçlı uygulanan kemoterapi ajanlarına karşı direnç geliştirebildikleri gösterilmiştir[68], [72]–[74].



Şekil 2-7: HIF-1'in mitokondriyal aktivite ve apoptoz üzerindeki etkinliği[68]

2.1.6. Tedavi Yöntemleri

Renal hücreli karsinomaya yönelik uygulanacak olan tedavi şekli tümörün yapısına, özelliklerine ve hastalığın evresine göre değişiklik göstermektedir. Genellikle rastlantısal olarak tanı koyulan bu hastalıkta tümörün henüz lokalize halde olduğu ve T3a evresine kadar olan düzeylerde uygulanan tedavilerde başarılı sonuç elde edilebilmektedir.

Boyutları 4cm'den daha küçük olan tümörler için genellikle nefrektomi yöntemi uygulanmaktadır. Bu yöntemde tümörün konumuna bağlı olarak radikal veya kısmi (nefron koruyucu) nefrektomi yöntemleri tercih edilmektedir[21].

Daha büyük boyutlu, lokalize halde olmayan ve çevre organlara metastazı saptanan vakalarda kemoterapi, radyoterapi, immunoterapi yöntemleri veya hastalığın patogeneğinde yer alan moleküllerin hedeflenmesi temelli tedavi yöntemleri de uygulanabilmektedir.

Sıklıkla gözlenen *VHL* mutasyonu durumunda; HIF1 tarafından kontrol edilen proliferasyonu ve anjiyogenezi uyaran genlerin (VEGF, PDGF) hedef alındığı ve klinik olarak metastatik renal karsinoma vakalarında kullanılmakta olan çeşitli hedefleyici ajanlar yer almaktadır[75], [76]. Bunlardan bir tanesi olan ve aynı zamanda metastatik renal hücreli karsinoma için bir belirteç olarak kabul edilen VEGF ve mTOR inhibitörleridir[77], [78].

Hastalığın moleküler temelinde yatan yolların, kanser hücrelerinin çeşitli tedavi yöntemlerine karşı direnç geliştirmesi veya çevre organlara metastaz yapması

olasılıkları bu hastalık için toksik etki oluşturmayacak ve kanser proliferasyonunu baskılamada daha etkin sonuç verebilecek alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılması önem arz etmektedir.

2.2. Süksinik Asit

Pek çok canlı organizmada doğal olarak bulunan bir dikarboksilik asit olan süksinik asit ($C_4H_6O_4$) gıda ve kimya endüstrileri başta olmak üzere farklı alanlarda yaygın kullanım alanına sahiptir[6], [79].

Biyoteknolojik olarak fermentasyon kökenli üretilen süksinik asit farklı endüstriyel alanlar için birçok önemli ara ve temel kimyasal madde olarak kullanılma potansiyeline sahiptir[5]. Özellikle petrokimya endüstrisinde yüksek çevre kirliliği oluşturan benzen veya başka petrokimyasallara dayanan farklı ürünlerin yerini alabileceği öngörülmektedir[80], [81].

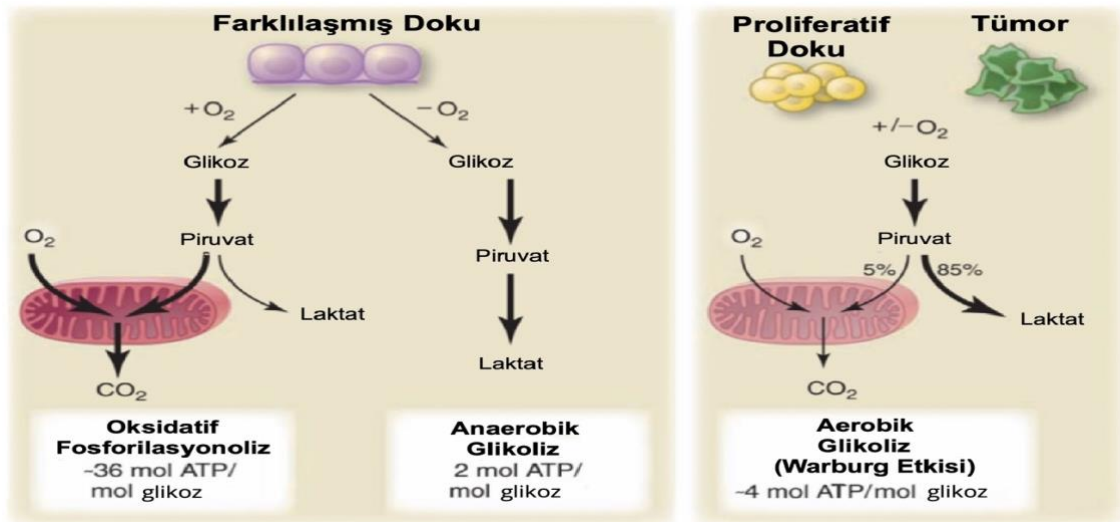
Çeşitli bakteri türleri[82]–[84] tarafından doğal olarak üretilen ve bakterilerin virülans faktörü olarak değerlendirilen süksinik asitin *E. coli*'yi insan nötrofil hücrelerinin fagositik etkinliğinden koruduğu[85] buna ek olarak bir başka çalışmada fare kemik iliği kökenli nötrofillerin baktersistal aktiviteleri üzerinde yüksek konsantrasyonda süksinik asitin düşük pH varlığında nötrofil etkinliğini inhibe ettiği gösterilmiştir[86].

Süksinik asit fermentasyonu sırasında CO_2 'nin özümsemesinin çevresel bir avantaj olarak kullanılabileceği göz önünde bulundurularak süksinik asitin biyoteknolojik olarak üretiminde özellikle yenilenebilir biyokütlenin hammadde olarak kullanılmasına dayanan mikrobiyal dönüşümlere odaklanılmıştır[6], [87]. Günümüzde süksinik asitin en çok kullanıldığı 4 endüstriyel alan bulunmaktadır: deterjan ve sürfaktanların yapısı, iyon şelatörü, gıda endüstrisi (asidite edici veya tatlandırıcı olarak) ve farmasötik üretimidir. Buna ek olarak en ikinci bir süksinik asit türevi molekül grubu çoğunlukla çözücü ve polimer endüstrilerinde bulunan pirolidonlardır[88]. Endüstriyel olarak yaygın kullanım alanına sahip olan süksinik asit aynı zamanda birçok canlı organizmada enerji metabolizmasında temel işlev gören TCA siklusunda ara metabolit olarak görev almaktadır[83], [89]. Hücre metabolizmasında doğal olarak bulunması dolayısıyla sağlıklı hücreler üzerinde bilinen bir yan etkisi yoktur.

2.2.1. Süksinik Asitin TCA Siklusu ve Kanser ile İlişkisi

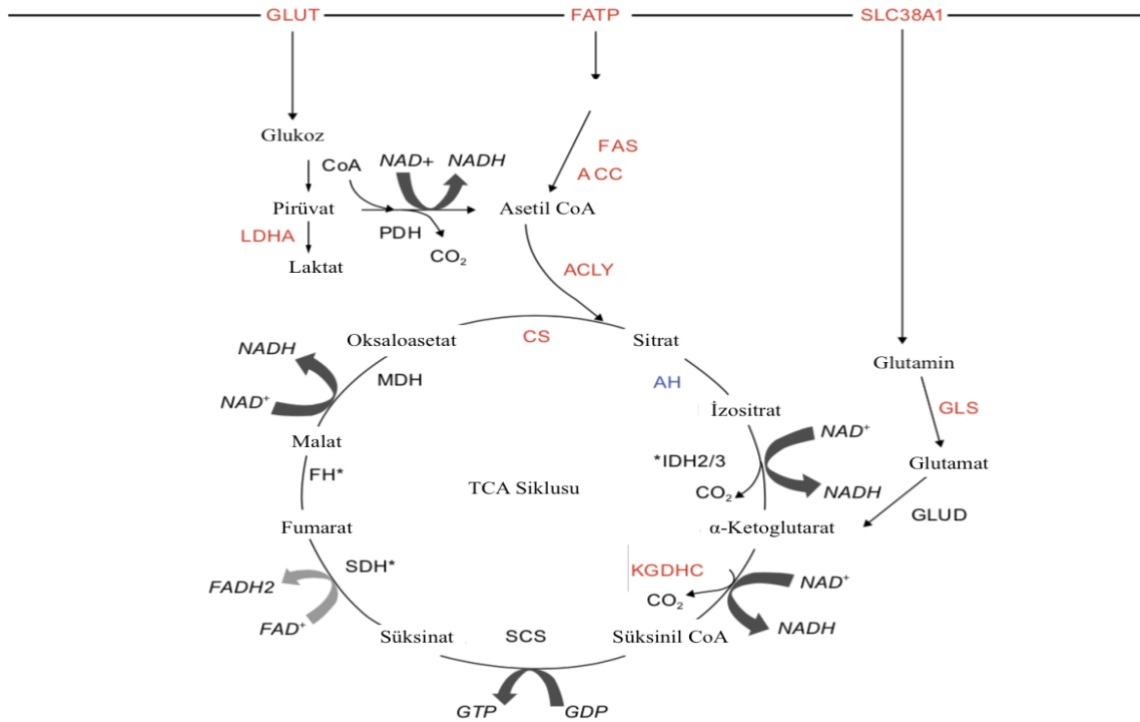
TCA, aerobik şartlar altında, hücrelerdeki oksidatif fosforilasyon için merkezi yoldur ve hücrenin biyoenerjetik, biyosentetik ve redoks dengesi gereksinimlerini karşılamaktadır[66]. Kanser hücrelerinde çeşitli genlerin aktivasyonu ve/veya inaktivasyonu yoluyla artan enerji ihtiyaçlarını karşılamak için hücrelerin enerji üretimini ve makromolekül sentezini artırdığı bilinmektedir[90]. Bu durum da bir süre sonra hücrelerde metabolik stres oluşumuna neden olmaktadır.

Artan metabolik stres ile baş edebilmek amacıyla, kanser hücreleri sıklıkla besinlerin hızlı bir şekilde alımını ve sindirimini sağlamak için ilgili biyokimyasal yolları yeniden programlayarak tümör oluşumunun ilerlemesine katkıda bulunurlar[91]. Kanser hücrelerinde değişen metabolik yolların araştırılması Otto Warburg'un kanser hücrelerinin büyümeleri için glikolize olan yoğun bağımlılığını belirtmesiyle başlamıştır[92]. Warburg ve arkadaşlarının çalışmasına göre tümör dokusunda oksijenin az, glukozun ise fazla olduğu durumda anaerobik glikoliz aracılığıyla yüksek miktarda piruvattan laktat oluşumu gerçekleştirilir. Normalde aerobik şartlarda glikolizi takiben TCA siklusu ve Elektron Transport Sistemi (ETS) ile total 38 ATP'lik enerji üretilirken kanser hücrelerinde aynı miktarda glukozdan yaklaşık olarak 4 ATP'lik enerji üretimi gerçekleştirilmiş olur (Şekil 2-8)[93]. Bu durumda hücreler artan enerji ihtiyacını karşılamak için daha fazla besine ihtiyaç duyar buna bağlı olarak da kanser hücrelerinde besin alımı ve enerji metabolizması değiştirilmiş olur[66], [91].



Şekil 2-8: Normal Hücre ve Tümör Hücresinde Hücre Enerji Metabolizması Farklılıkları[93]

TCA siklusu tipik olarak glikolizin son ürünü olan pirüvattan köken alan asetil CoA'nın döngüye girmesiyle başlar. Bir dizi redoks reaksiyonu aracılığıyla kimyasal bağ enerjisi asetil CoA'dan nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+) ve flavin adenin dinükleotit (FAD) ile daha yüksek enerjili elektronların üretilmesi için ETS'ye taşınır. TCA siklusunda süksinat, süksinil-CoA dönüşümünden oluşturulan bir ara metabolit olarak üretilir ve süksinat dehidrogenaz (SDH) enzimi tarafından fumarata dönüştürülür (Şekil 2-9)[66].



Şekil 2-9: TCA siklusu[66]

Renal hücreli karsinomanın aerobik glikolize olan bağımlılığı fumarat hidrataz (FH) ve SDH eksikliği durumlarında daha net gözlenmektedir. FH ve SDH enzimleri mitokondriyal TCA döngüsü yoluyla oksidatif fosforilasyonla enerji üretiminde kilit rol oynamaktadır[94].

Vanharanta ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, kalıtsal renal karsinomaya sahip olan hastaların SDH enzimini kodlayan *SDHB*, *SDHC* ve *SDHD* genlerinde heterozigot kalıtsal mutasyon taşıdıkları gösterilmiştir[95].

2.2.2. Süksinik Asitin Antikanser Etkinliğine Yönelik Yapılan Çalışmalar

Geçtiğimiz yıllarda, süksinik asitin farklı formlarının bazı antikanser ilaçlarla birlikte veya vitamin analogları şeklinde antioksidan veya apoptotik etkinliği artırmak amacıyla çeşitli kanser türleri üzerinde kullanıldığı bildirilmiştir[96]–[99].

E vitamininin çeşitli uygulamalar sırasında sağlıklı hücreler üzerinde oluşan toksik etkiyi azaltıcı yönünde sergilediği antioksidan aktivitesinin farklı çalışmalarda süksinat analogu ile artırılabilirdiği ortaya koyulmuş[100].

Patacsil ve arkadaşlarının pankreatik kanser hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, alfa tokoferolün bir analogu olan E vitamini-süksinat bileşiğinin PANC-1 pankreas kanseri hücre hattı üzerinde apoptozu indükleyerek hücre canlılığını azalttığını bununla birlikte antiapoptotik bir protein olan IAP (apoptoz inhibe edici protein) ekspresyonunu da baskıladığı rapor edilmiştir[101].

Bunun yanı sıra günümüzde sıklıkla tercih edilmekte olan ancak yüksek yan etkilerinden dolayı sınırlı dozlarda kullanılabilen doxorubicin, paclitaxel gibi kemoterapötik ajanların antikanser aktivitelerini artırma amaçlı olarak süksinat içerikli bileşiklerin kullanımı mevcuttur. Bu çalışmalardan birine göre paclitaxel ile birlikte kullanılan alfa-Tokoferol süksinat (α -TOS)'ın akciğer kanseri hücrelerinde farklı yollar aracılığı ile apoptozu indüklediği kaydedilmiştir[96].

Bu çalışmalara ek olarak, son yıllarda süksinik asitin farklı kanser türleri üzerindeki direkt etkinliğine yönelik çeşitli araştırmalar yapılmış olup bu çalışmalarda kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünün süksinik asit ile etkin bir şekilde indüklediği gözlenmiştir[7], [102].

Bu proje kapsamında, çeşitli kanser türleri üzerinde apoptotik etkinliği gözlenirken sağlıklı hücreler üzerinde toksik etkisinin bulunmaması nedeniyle süksinik asitin daha önce çalışılmamış olan renal kanser hücre hatları üzerindeki antikanser aktivitesini araştırmayı hedefledik.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Materyaller

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

Hücre kültürü çalışmalarına uygun olacak şekilde standardize edilen süksinik asit (S9512) Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan hücreler ve besi ortamları Tablo 3.1’de gösterilmiştir. Besi ortamları Fetal Bovin Serum (FBS, sıcaklık inaktif, Gibco, 10437028) ve penisilin-streptomisin (Gibco, 15140122) eklenmesi ile hücrelerin büyümeleri için uygun hale getirilmiştir.

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan hücreler ve besi ortamları

Hücre Hatları	Besi Ortamları
CAKI-2 (ATCC® HTB-47™)	McCoy’s 5A (ATCC)
ACHN (ATCC® CRL-1611™)	EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) (ATCC)
MRC-5 (ATCC® CCL-171™)	DMEM (Dulbeco's Minimum Essential Medium) (ATCC)

Hücre pasajlama ve dondurma işlemleri için DPBS (Gibco, 14190367), %25 Trypsin-EDTA (Gibco, 25200072) ve DMSO kullanılmıştır.

Hücre canlılığını tayin etmek amacıyla WST-1 (Roche, 11644807001, Almanya) kiti kullanılmış olup hücrelerde süksinik asitin indüklediği apoptotik aktivite ölçümü için Muse™ Annexin V Apoptoz/Nekroz Tayin kiti (Muse, 4700-1485, 100 tests/bottle, Amerika) ile Cell Death Detection ELISA kiti (Roche, 11 544 675 001, 96 tests/bottle, Almanya) kullanılmıştır.

3.1.2. Cihazlar

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları Tablo 3.2’de yer almaktadır.

Tablo 3.2: Deneyde kullanılan cihazlar

Cihazlar	Kullanım Amaçları
İnverted Mikroskop	Hücre morfolojilerinin incelenmesi ve görüntülenmesi
Laminar Flow Kabin- Class II BSC	Hücrelerin manipülasyonunda steril ortam sağlamak
Karbondiyoksit İnkübatörü	Hücrelerin büyütülmesi ve yaşatılması için ortam
Otomatik Hücre Sayım Cihazı	Hücre ekimlerinde belirli sayıda hücre ekiminin belirlenmesi için sayım işlemleri
Multiscan Spektrofotometre	Spektrofotometrik ölçümlerin yapılması
Su Banyosu	Solüsyonların ısıtılması
Yüksek Devirli Soğutmalı Santrifüj	Hücrelerin pasajlanması, deneylerin kurulmasında pelletlerin eldesi
Buzdolabı (+4 °C, -20 °C, -80 °C)	Gerekli solüsyonların, malzemelerin saklanması
Sıvı Azot Tankı	Hücrelerin uzun süreli saklanması
Otoklav	Deneyler sırasında kullanılacak gerekli malzemelerin sterilizasyonu
Muse Cytometer	Annexin V Apoptoz/Nekroz Analizi
Vortex	Solüsyonların hazırlanması

3.2. Yöntem

3.2.1. CAKI-2 Hücre Hattı

CAKI-2 hücre hattı berrak hücre karsinomasına sahip böbrek dokusundan izole edilmiş olup, hücre kültürü çalışmalarımız için ATCC (American Type Culture Collection, LGC Standart) firmasından sağlanmıştır. Hücreler besi ortamları olan McCoy's 5A (ATCC) medyuma %10 FBS ve %1 Penisilin-Streptomisin eklenerek 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşulları altında inkübe edilerek büyütülmüştür.

3.2.2. ACHN Hücre Hattı

ACHN hücre hattı 22 yaşında erkek bir hastadan derive edilmiş olan metastatik karakterli renal adenokarsinoma hücreleridir. Daha önceki çalışmalar kapsamında ATCC (American Type Culture Collection, LGC Standart) firmasından temin edilmiş olup alt kültürleme işlemleri ile büyütülmüş ve sıvı azotta dondurularak saklanmış pasajlardan kullanılmıştır. Hücreler %10 FBS ve %1 Penisilin-Streptomisin ilave edilmiş olan EMEM (ATCC) medyumda büyümeleri için uygun olan 37 °C sıcaklık ve %5 CO₂ koşulları altında inkübe edilmiştir. Süksinik asitin metastatik renal adenokarsinoma ve berrak hücreli renal karsinoma olmak üzere iki farklı karakterdeki renal hücre kanseri üzerindeki apoptotik etkinliğine dair karşılaştırma yapmamızı sağlayacaktır.

3.2.3. MRC-5 Hücre Hattı

MRC-5 hücre hattı, daha önce yapılan çalışmalar kapsamında ATCC (American Type Culture Collection, LGC Standart) firmasından temin edilmiş ve hücre pasajlama işlemleri sonrasında dondurularak saklanmış olan pasajlardan kullanılmıştır. Sağlıklı akciğer hücrelerinden elde edilmiş olan fibroblastik yapılı MRC-5 hücreleri süksinik asitin sağlıklı hücreler üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. MRC-5 hücreleri %1 Penisilin-Streptomisin antibiyotiklerinin ve %10 FBS'in ilavesiyle hazırlanmış olan DMEM besi ortamında, hücrelerin flaska tutunmaları ve büyümeleri için 37 °C, %5 CO₂ koşulları altında inkübe edilmiştir.

3.2.4. Hücre Ekimi

Sıvı azot tanklarında kryotüpler içerisinde saklanan hücrelerin, ekim işlemleri öncesinde aşamalı olarak -80°C ve -20°C'lerde bekletildikten sonra, 37 °C su banyosunda tutularak çözölmeleri sağlanmıştır. 1ml hacmindeki çözönen hücreler laminar kabin içerisine alınarak 5ml medyum bulunan falkonlara alınmış ve 1500rpm'de 5dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılarak pellet 1ml taze medyum ile homojenize edilmiştir. Bu aşamada hücrelerin sayımı için 1ml hücre çözöltisinden 10ul alınarak, 1:1 oranında Trypan Blue solüsyonu ile homojenize edilmiş ve Countless Cell Counter hücre sayım cihazında hücre ölçümü yapılmıştır. Sayım sonrasında hücreler 25cm² boyutlarındaki flasklara ekilerek 37 °C, %5 CO₂ koşulları altında inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.5. Hücrelerin Pasajlanması

Hücrelerin canlılıklarını koruyabilmeleri için 2-3 günde bir besi ortamları değiştirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan tüm hücre hatları adherent özellikte hücreler oldukları için besi ortamları değiştirilmesi sırasında eski medyum aspirasyonla atılmış olup aynı miktarda taze medyum eklenmiştir.

Hücreler büyüüp tüm flask yüzeyine yayıldıkları durumda artık hücrelerin gelişimi için flask yüzeyinde daha fazla yer kalmayacağından hücreler pasajlama işlemi ile alt kültürlerle alınırlar. Pasajlama işlemi için öncelikle hücrelerin bulunduğu besi ortamları aspirasyon ile uzaklaştırılmış olup ortamda medyum artıkları kalmaması amacıyla 3ml DPBS eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Flask yüzeyine tamamen tutunmuş halde bulunan canlı hücrelerin yıkama işleminden sonra, flask yüzeyi ile kurdukları protein bağlantılarını ortadan kaldırmak için 3ml Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek %5 CO₂ basıncında, 37 °C sıcaklıkta 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sona erdiğinde hücrelerin flask yüzeyi ile olan bağlantılarının kopup kopmadığı mikroskop ile kontrol edilmiştir. Yüzey ile ilişkileri kesilen hücreler 9ml taze medyum ile yıkanarak hücre sayımı ve santrifüj işlemleri için 15ml hacimli falkonlara alınmıştır. 1500rpm’de 5 dk santrifüj sonrasında pellet uygun sayıda flasklara bölünerek pasajlama işlemi tamamlanmıştır. Pasajlama işlemleri için üç hücre hattı için de aynı işlemler uygulanmıştır.

3.2.6. Hücrelerin Dondurulması

Hücreler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere pasajlama işlemlerindeki adımlar uygulanarak kaldırılıp ve santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tüpte kalan pellet, daha önceden %90 medyum (her hücre hattı için kendi medyumunu) %10 DMSO (Dimetil sülfoksit) eklenerek hazırlanmış olan dondurma solüsyonu ile homojenize edilerek ve karyotüpler içerisine 1ml hacimde alınmıştır. Hücrelerin dondurma işleminden zarar görmemeleri için öncelikle 1 saat -20°C ve 24 saat -80°C’de bekletilerek uzun süreli korunabilmeleri için hücre hatları daha sonrasında -196°C’deki azot tankına alınmıştır.

3.2.7. Süksinik Asit Solüsyonu Hazırlanması

Sigma Aldrich firmasından ticari olarak alınan süksinik asit DMSO içerisinde çözdürülerek 0,1M konsantrasyonda ana stok solüsyonu hazırlanmıştır. Bu stok

solüsyondan seyreltilerek, çalışmamız için seçmiş olduğumuz 5, 10, 25, 50 ve 100 μ M konsantrasyonlar hazır hale getirilmiştir.

3.2.8. WST-1 Yöntemi ile Hücre Canlılık Tayini

Renal kanser hücre hatları ACHN ve CAKI-2 ile sağlık hücre hattı MRC-5 hücreleri üzerinde süksinik asitin hücre canlılığı üzerindeki etkinliğini belirlemek için WST-1 testi uygulanmıştır. Canlı hücreler WST-1 eklendiğinde mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enzim aktivitesi ile hızlı bir şekilde formazan kristalleri oluşturur. Bu kristallerin absorbans yoğunluğu canlı hücre yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Hücre canlılığı ortadan kalktığında mitokondriyal aktivite azalacağından formazan kristalleri oluşumu da azalır. Bu farklılık absorbans yoğunluğunun ölçümü ile tespit edilir.

Hücreler yeterli sayıya ulaştıklarında 96'lık platelere ekimleri yapıp platelere yapışmaları için bir gecelik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında plate tabanına yapışan hücreler, artan doz (5, 10, 25, 50 ve 100 μ M) ve zamanda (24, 48 ve 72 saat) ticari olarak satın alınan süksinik asit ile muamele edilmiştir. Kontrol olarak kullanılacak olan kuyucuklara süksinik asit eklenmemiş olup aynı miktarda taze DMSO'lu medyum eklenmiştir.

Süksinik asitin renal kanser hücre hatları ACHN, CAKI-2 ve sağlıklı hücre hattı MRC-5 hücreleri üzerindeki doz ve zaman bağımlı canlılık etkisi ticari olarak satın alınmış olan WST-1 Hücre Canlılık Testi Kiti ile ölçülmüş olup, bu aşamada firmanın önermiş olduğu protokol uygulanmıştır. Kit protokolü uyarınca her bir kuyucuğa 10 μ l WST-1 çözeltisi ilave edilip 37°C'de 4 saat inkübe edildikten sonra hücre canlılığı ölçümü 96 kuyucuklu platelerin absorbans değerlerinin spektrofotometrede 440nm'de okunması ile tamamlanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda hücre grupları için uygun doz ve zaman seçilecektir.

3.2.9. Apoptoz Ölçümleri

3.2.9.1. Annexin V-FITC ile Apoptoz/Nekroz Tayini

Uygun doz ve zamanda süksinik asite maruz bırakılan ACHN ve CAKI-2 renal karsinoma hücre hatları ve sağlıklı kontrol grubu olan MRC-5 hücreleri üzerinde doz ve

zaman bağımlı olarak indüklenen apoptozun ve nekrozun Akış Sitometrik Annexin-V Apoptoz/Nekroz Analizi ile kantitatif tayini yapılmıştır.

Yöntemin temeli; hücre membranındaki fosfatidil serinlere bağlanabilen Annexin-V FITC ile nükleik asitlere bağlanabilen PI (Propidium iodide) boyaları aracılığıyla apoptoz ve nekrozun ayırt edilmesine dayanmaktadır. Normal hücrelerde sitoplazmik yüzeyde yerleşik olarak bulunan fosfatidil serin fosfolipidi hücrelerde apoptozun indüklenmesi ile hücre dışına transloke olur. Annexin-V apoptoz analizinde FITC ile konjuge Annexin-V lektini kullanılmaktadır. Annexin-V lektini apoptotik hücrelerin hücre membranının dış yüzeyine yerleşmiş olan fosfatidil serinlere bağlanır. Bu molekül ile konjuge olan FITC ise, bu bağlanma sonrasında hücrelerde flüoresan ışığa meydana getirir (FL1 dedektörü; eksitasyon= 488nm, emisyon=535nm) ve bu ışığa akış sitometrideki FL1 dedektörü ile belirlenir. Elde edilen ışığın şiddetine göre hücreler sınıflandırılır. Yöntemde kullanılan nükleik asitlere bağlanabilen PI flüoresan boya ile nekrotik hücreler belirlenmektedir. PI nekroza uğrayan hücrelerin, hasar görmüş membranlarından geçerek DNA'larını boyar. PI ile boyama sonrası hücrelerdeki flüoresan ışığa akış sitometrideki FL2 dedektörü (eksitasyon= 488nm, emisyon=562-588nm) ile ölçülür.

Işıma değerlerine göre; Annexin-V ve PI sinyalinin algılanmadığı hücreler canlı, sadece PI sinyalinin algılandığı hücreler nekrotik, sadece Annexin-V sinyalinin algılandığı hücreler apoptotik ve hem Annexin-V hem de PI sinyalinin algılandığı hücreler geç apoptotik olarak değerlendirilecektir. Diyagramdaki her bir bölgeye düşen hücre sayısının toplam hücre sayısına oranından yüzde değerler hesaplanacaktır.

WST-1 Testi ile süksinik asit uygulaması için uygun doz ve süre belirlendikten sonra üç hücre hattı da tripsinizasyon işlemi ile flasklardan kaldırılarak 1500rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Pellet 2ml medyum ile homojenize edilerek toplamda 1×10^5 sayıda hücrenin 6 kuyulu platelere ekimi yapılmıştır. Hücrelerin plate yüzeyine yapışmaları için %5 CO₂, 37 °C koşulları altında 24 saat inkübasyona bırakılmışlardır. Bunu takiben platelere belirlenen dozlarda süksinik asit uygulaması yapılmış ve her üç hücre hattı için uygun olarak seçilen 24 saatlik inkübasyon süresince %5 CO₂, 37 °C sıcaklık koşullarındaki inkübatörde bekletilmişlerdir. Inkübasyon sonrasında platelerdeki medyum ortamdan uzaklaştırılarak hücrelerin yıkaması yapılmış ve 1x bağlayıcı buffer ile homojenize edilmiştir. Bu işlem sonrasında 100'er µl hücre 5ml kültür tüpüne alınmış ve reaksiyon için 5µl FITC Annexin V ile 5µl PI eklenerek

vorteks ile homojen hale getirildikten sonra 15 dk karanlık ortamda ve oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon sonrasında ışıma ölçümleri akış sitometri cihazında yapılmıştır.

Canlılık tayini için hücreler boyaların yaptığı ışıma miktarlarına göre bir diyagrama yerleştirilmiş ve Annexin V ve PI boyalarının ışıma durumlarına göre canlılık, apoptoz ve nekroz oranı belirlenmiştir. Bu sisteme göre Annexin V ve PI sinyalinin alınmadığı hücreler canlı, sadece Annexin V sinyalinin algılandığı hücreler apoptotik, sadece PI sinyalinin algılandığı hücreler nekrotik, her iki sinyal de algılandığı hücreler ise geç apoptotik olarak sınıflandırılmış ve diyagramda her bir bölgedeki hücre miktarı total hücre miktarına oranlanarak yüzde değerler elde edilmiştir.

3.2.9.2. Cell Death Detection ELISA Yöntemi ile Hücre Ölüm Tipi Tayini-Apoptoz/Nekroz Analizi

Hücrelerde apoptoz veya nekroz gerçekleşmesi sırasında morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler oluşmaktadır. Nekroz sırasında plazma membranında artmış iyon geçirgenliği sebebiyle plazma membranı şişip dağılırken apoptoz esnasında endojen endonükleaz aktivasyonu ve sitoplazma kondensasyonu gibi olaylar gelişir. Apoptoz ökaryotik hücrelerde en yaygın gözlenen programlı hücre ölümüdür. Apoptoz sırasında aktive olan Ca^{2+} ve Mg^{2+} bağımlı endonükleazlar çift sarmallı DNA'da en kolay ulaşılabilen nükleozomal bölgelerde kırıklar oluşturarak oligo- ve mononükleozomlar ortaya çıkarır. Oluşan DNA parçacıkları 180bp ve katları şeklinde ayrılmış olan fragmentleridir. Apoptoza uğrayan hücrelerin sitoplazmalarında mono- ve oligonükleozomların fazla olması DNA yıkımının plazma yıkımından bir süre önce başlamasından kaynaklanmaktadır. DNA nükleozomal olarak histon proteinleri (H2A, H2B, H3 ve H4) ile kompakt bir yapı halinde korunmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız kit içeriğinde bulunan histonlara karşı yönlendirilmiş antikolar histon H1, H2A, H2B H3 ve H4 proteinleri ile reaksiyona girerken, Anti-DNA peroksidaz (POD) antikoru tek veya çift zincirli DNA'ya bağlanarak işlev göstermektedir. Bu sistem kullanılarak renal kanser ACHN ve CAKI-2 hücre hatları ve sağlıklı kontrol grubu olan MRC-5 hücre hattı üzerinde süksinik asitle uyarılan hücre ölümü sonrasında hücresel süpernatantta mono- ve oligonükleozom varlığı tayin edilmiş olup anti-histon antikoları ile hücre ölümü ölçülmüştür.

Testin temeli kit içeriğinde bulunan monoklonal antikorların sırasıyla DNA ve histonlara yönlendirilmesi ile kantitatif sandviç enzim immünoassay prensibine dayanmaktadır.

ACHN, CAKI-2 ve MRC-5 hücreleri 6 kuyulu well platelere ekilip tutunmaları için bir gece inkübatörde muhafaza edildikten sonra belirlenen dozda süksinik asit uygulaması yapıp 24 saatlik inkübasyon süresi için 37°C sıcaklıkta inkübatörde bekletilmiştir. Süksinik asit ile hücre ölümü uyarımı tamamlandıktan sonra hücreler platelerden tripsinizasyon işlemleri ile kaldırılarak 1500µl hacimli mikrosantrifüj tüplerine alınmıştır. 200Xg'de 5 dakikalık santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti 1ml medyum ile süspanse edilmiştir. Hücreler 1500Xg 5 dakika tekrar santrifüj edilmiş ve tüp başına 1×10^5 hücre gelecek şekilde 500µl inkübasyon buffer eklenerek yeniden süspanse hale getirilmiştir. Hücrelerin parçalanma işlemi için inkübasyon buffer içinde 30 dakikalık 15-25°C (oda sıcaklığında) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sona erdiğinde 20 000Xg'de 10 dakika santrifüj edilmiş olup santrifüj sonrası oluşan 400µl süpernatant ortamdaki dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Bu aşamada pellet yüksek moleküler ağırlıkta parçalanmış DNA içerdiği için mikrosantrifüj tüplerinin taşınması sırasında, pelletin dağılmamasına dikkat edilmiştir. Kalan 100µl süpernatant 1:10 oranında inkübasyon buffer ile sulandırılmıştır. Çalışmaya bir gün sonra devam edileceği için inkübasyon buffer ile sulandırılan örnekler gece boyu -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Hücre ölümü ölçüm deneylerine başlamadan önce kit içeriğinde bulunan Anti-histon ve Anti-DNA-POD antikorları 1 ml bidistile su ile sulandırılıp deneyler sırasında kullanılacak olan solüsyonlar (Kaplama, Yıkama, Numune, Konjugat ve Substrat solüsyonları) kitte belirtilen protokole göre hazır edilmiştir.

ELISA uygulaması öncesinde hücrelerin ekileceği platelerdeki her bir kuyucuğa 100µl kaplama solüsyonu eklenmiş ve 15-25°C (oda sıcaklığında) 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kaplama solüsyonu ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Her bir kuyucuğa 200µl inkübasyon buffer eklenerek plate üzeri ELISA yapıştırma bandıyla sıkıca kapatılıp oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Bunu takiben sıvı uzaklaştırılarak 250-300µl yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanarak solüsyon artıkları uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrasında kuyucukların her birine 100µl numune solüsyonu eklenmiş, immünassay uygulamasının geri planı- sapma miktarını belirlemek amacıyla

iki tane kuyuya kuyu başı 100µl inkübasyon buffer ilave edilmiş ve plate yapıştırma bandıyla sıkıca kapatılarak oda sıcaklığında 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Tekrar yıkama aşamalarını takiben kör kuyular hariç her bir kuyuya 100µl konjugat solüsyonu eklenerek tekrar oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Yeniden yıkama yapıldıktan sonra her bir kuyuya 100µl substrat solüsyonu eklenerek plate karıştırıcıda 250rpm’de renk değişimi gözleninceye kadar bekletilmiştir. 10-20 dakika sonrasında plateler 405nm dalga boyunda ELISA plate okuyucuda okunmuştur.

3.2.10. Deney Verilerinin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi

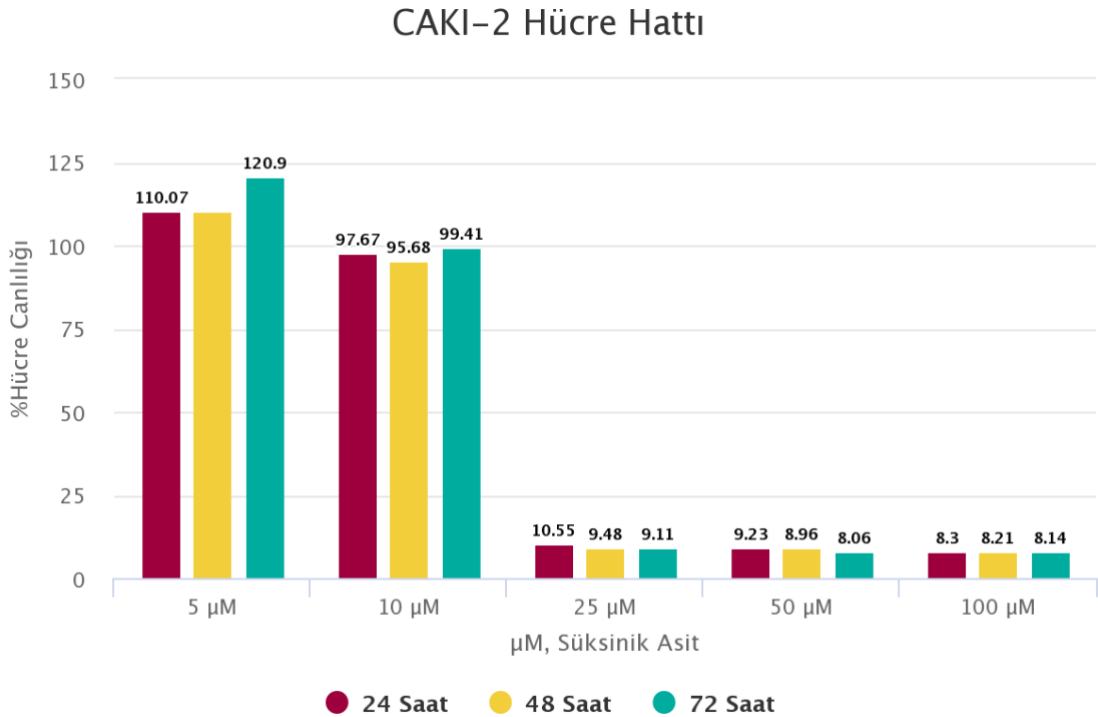
Deneylerin 3’er kez tekrarlanması ile elde edilen bulguların Mann-Whitney U SPSS 16.0 programı kullanılarak $p < 0,05$ anlamlılık seviyelerinin karşılaştırılması ile istatistiksel analizleri yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Süksinik Asitin Doz ve Zamana Bağlı Olarak Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkinliği

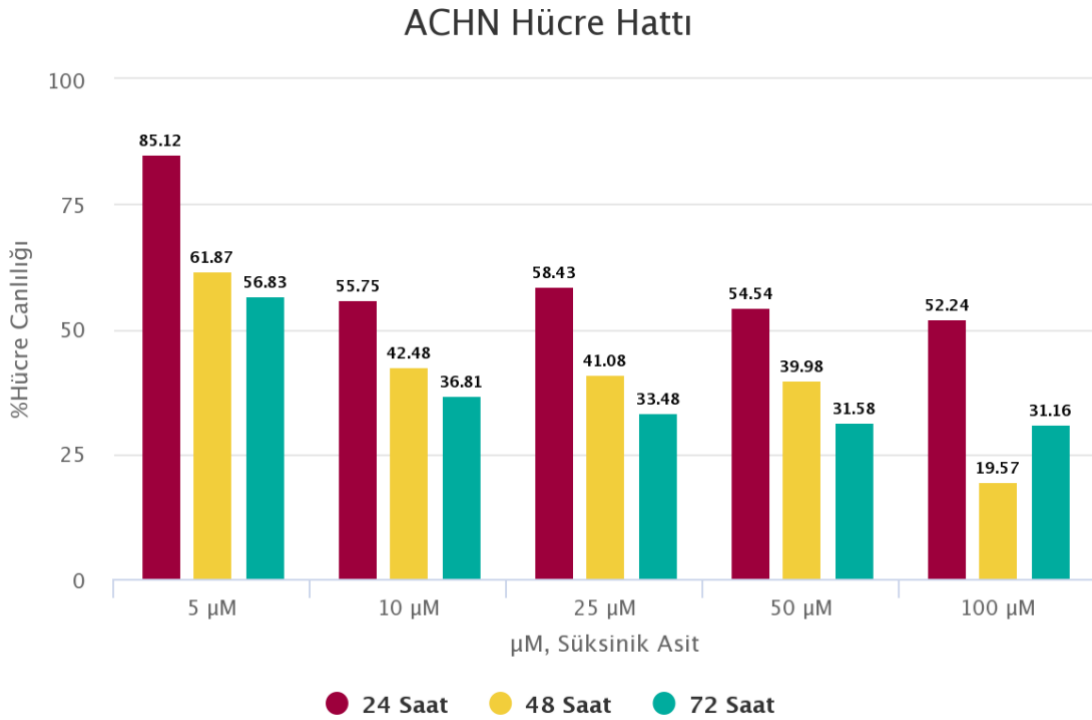
Renal karsinoma ACHN, CAKI-2 ve sağlıklı MRC-5 hücre hatları, hücre canlılığı üzerindeki etkinliğinin araştırılması ve uygun doz ve sürenin belirlenebilmesi için araştırmak üzere seçmiş olduğumuz farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 25, 50 ve 100 μM) hazırlanan süksinik asit ile 24, 48 ve 72 saat süre boyunca muamele edilmiştir. Her bir hücre hattı için 24., 48. ve 72. saatler için ayrı plateler hazırlanmış olup hücreler 96'lık platelere her bir kuyucukta 10^4 hücre olacak şekilde 3 tekrarlı olarak ekilmiştir.

Hücrelerin seçilen zaman dilimlerindeki inkübasyon süreleri sona erdiğinde spektrofotometrede 440nm'de okuma yapılarak absorbens değerleri belirlenmiştir. Her bir plate içerisindeki kontrol grubu olarak kabul edilen ve süksinik asitin ilave edilmediği kuyulardaki hücre canlılığı %100 alınarak farklı konsantrasyonlarda süksinik asit uygulanan kuyulardaki hücre canlılıkları bu değere göre oranlanarak tespit edilmiştir.



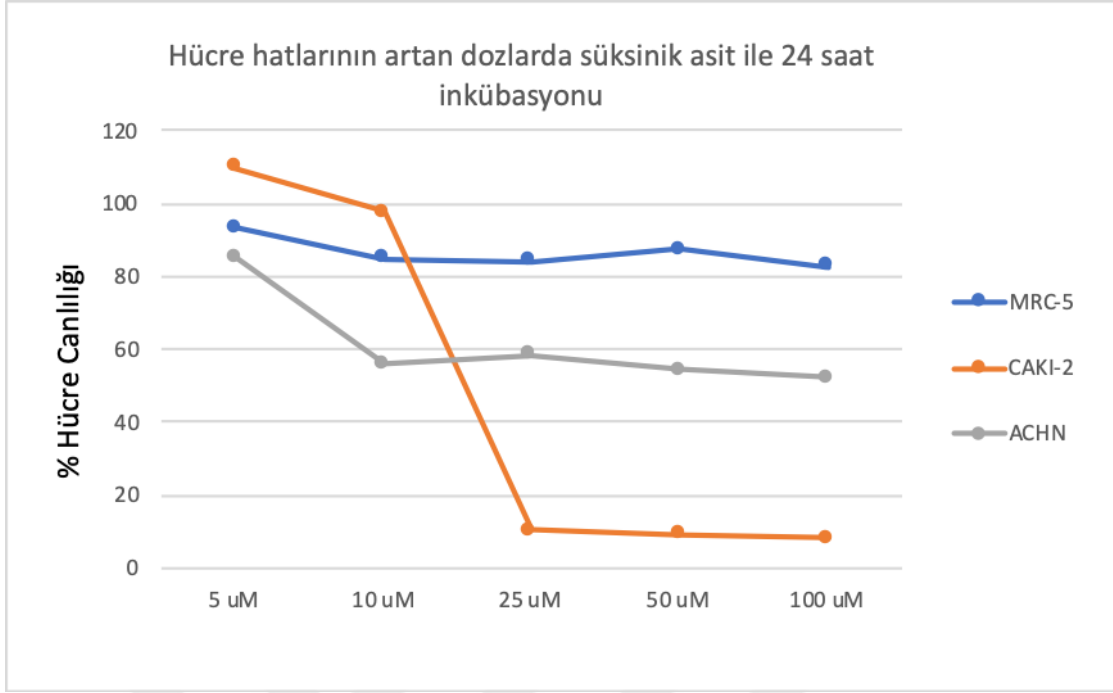
Şekil 4-1: CAKI-2 Renal Karsinoma Hücre Hattı Üzerinde Süksinik Asitin Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Sitotoksik Etkinliğinin % Canlılık Üzerinde Analizi

Süksinik asitin, farklı doz ve zamanlarda, CAKI-2 berrak hücreli renal karsinoma hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkinliği Şekil 4-1’de gösterilmiştir. Süksinik asitin değişen konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyon süresi sonrasında CAKI-2 hücrelerindeki canlılık yüzdesi 25µM ve 50µM konsantrasyonlarındaki süksinik asit uygulaması sonrasında sırasıyla %89 ve %91 oranında azalmıştır ($p<0,05$). Aynı konsantrasyonlarda ACHN renal adenokarsinoma hücre hattının 24 saatlik inkübasyonu sonucunda hücresel canlılığın %59 ve %61 oranında azaldığı gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4-2).



Şekil 4-2: ACHN Renal Adenokarsinoma Hücre Hattı Üzerinde Süksinik Asitin Doz ve Zaman Bağımlı Olarak Sitotoksik Etkinliği Sonucu Hücre Canlılığı

Değişen doz ve uygulama süresinin her iki renal kanser hücre hattı üzerinde de yüksek etkinlikte olup, sağlıklı kontrol grubu olarak kullandığımız MRC-5 akciğer hücreleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkinliğin olmaması beklenmektedir. Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda her üç hücre hattı için en uygun uygulama süresi 24 saat seçilmiş olup bu süre zarfı içerisinde üç hücre hattı üzerindeki süksinik asit uygulaması sonrası doza bağımlı olarak değişen canlılık yüzdeleri Şekil 4-3’te yer almaktadır.



Şekil 4-3: CAKI-2, ACHN ve MRC-5 Hücre Hatlarının Artan Dozlarda Süksinik Asit ile 24 Saatlik İnkübasyonu Sonucunda Hücrelerin Canlılık Yüzdesi

WST-1 Hücre Canlılık Testi ile süksinik asitin hücre hatları üzerindeki optimum sitotoksik etkinliği 25µM ve 50µM konsantrasyonları ile 24 saatlik inkübasyon süresi olarak belirlenmiş olup daha sonraki aşamalarda hücre ölümü tipinin ve apoptotik hücre ölümü oranlarının belirlenmesi için çalışılacak olan Annexin V-FITC ve Hücre Ölüm Tipi Tayini yöntemlerinde bu konsantrasyon ve inkübasyon süreleri kullanılmıştır.

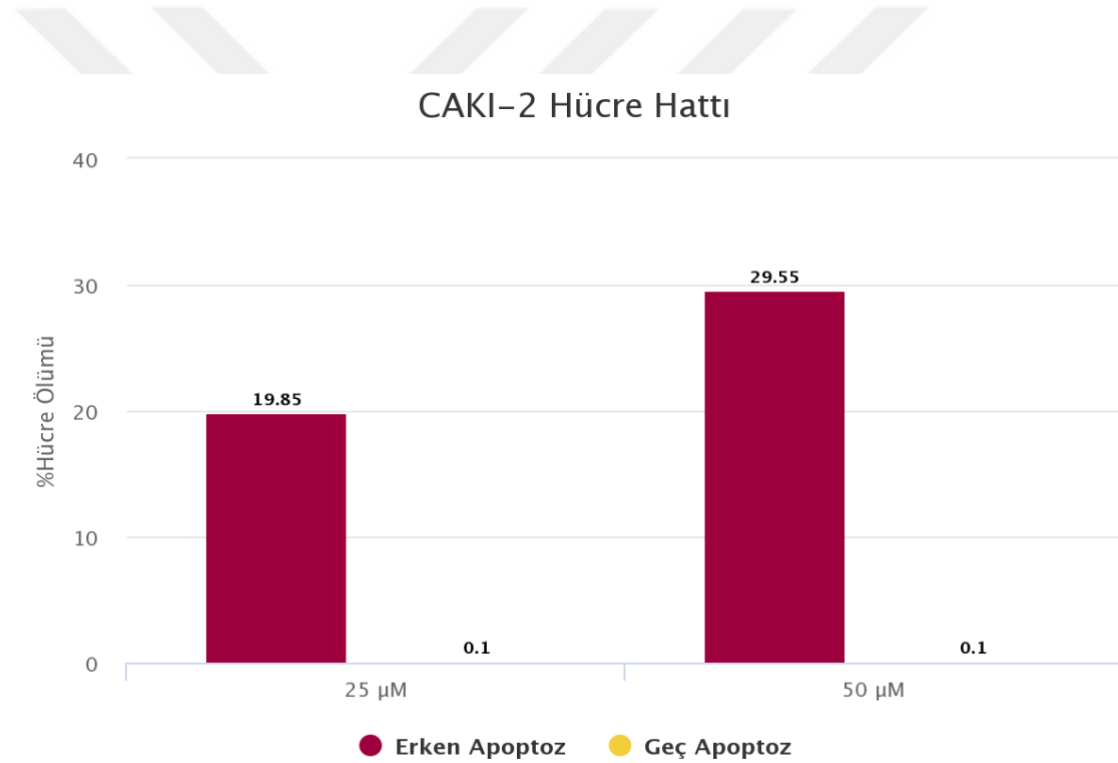
4.2. Apoptotik Değerlendirmeler

Renal kanser ve kontrol hücre hatları üzerinde 25µM ve 50µM konsantrasyonlarındaki süksinik asit solüsyonu ile hücrelerin 24 saat süreyle inkübe edilmesinin ardından hücre ölümünün apoptoz/ nekroz analizi Akış Sitometrik Annexin V ve Hücre Ölüm Tipi Tayini ELISA yöntemleri ile yapılmıştır.

4.2.1. Akış Sitometrik Annexin V-FITC Analizi

Süksinik asit ile indüklenen hücre ölümü apoptotik ve nekrotik hücrelerdeki morfolojik ve biyokimyasal değişimlere dayanarak ayırım yapan Annexin V- FITC Apoptoz/Nekroz yöntemi ile analiz edilmiştir. Yöntemin temeli akış sitometride her bir

örnek için 1×10^4 sayıda hücre olacak şekilde sayılarak Annexin V ve PI sinyalinin algılandığı hücrelerin ölçülmesine dayanmaktadır. Buna göre akış sitometriden çıkan sonuçlar doğrultusunda hem Annexin V'nin hem de PI'nın negatif algılandığı hücreler sağlıklı, Annexin V pozitif- PI negatif algılanan hücreler erken apoptotik, her ikisinin de pozitif algılandığı hücreler geç apoptotik, yalnızca PI sinyalinin algılandığı hücreler ise nekrotik olarak karakterize edilmiştir. CAKI-2 hücre hattında $25\mu\text{M}$ ve $50\mu\text{M}$ konsantrasyonlarında süksinik asit ile 24 saatlik inkübasyonun ardından süksinik asit uygulaması yapılmamış CAKI-2 hücrelerine kıyasla $25\mu\text{M}$ konsantrasyon için %19,85 apoptotik hücre ölümü gözlenirken $50\mu\text{M}$ konsantrasyon için apoptotik hücre ölümü %29,55 olarak kaydedilmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4-4).

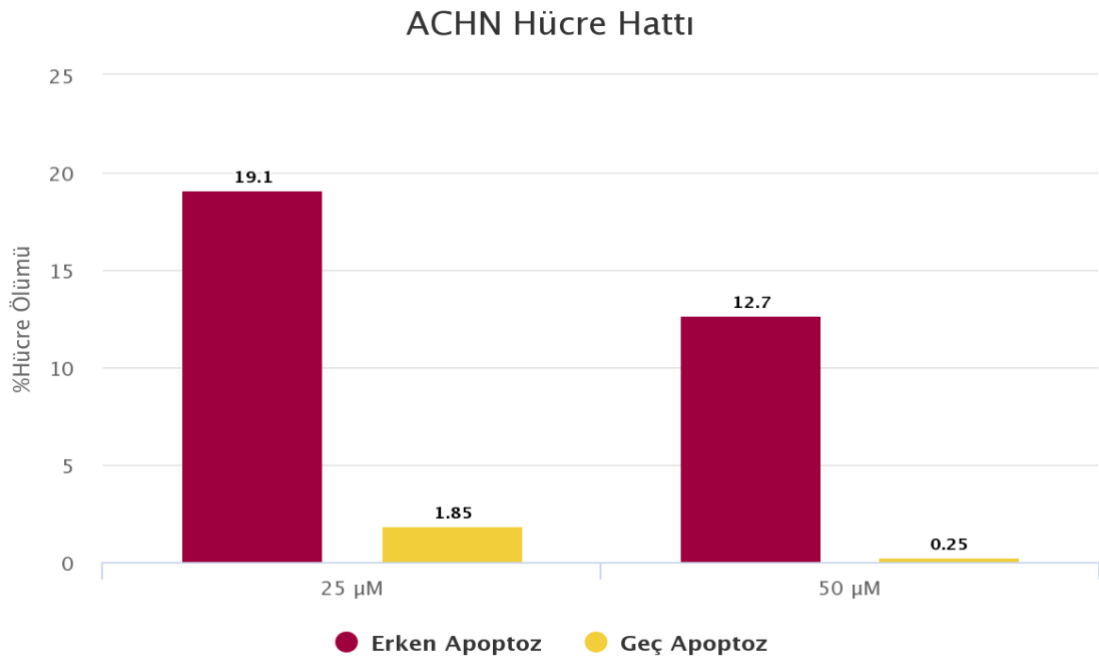


Şekil 4-4: CAKI-2 hücre hattı üzerinde $25\mu\text{M}$ ve $50\mu\text{M}$ konsantrasyonlarında uygulanan süksinik asitin Apoptoz/Nekroz tayini

$25\mu\text{M}$ ve $50\mu\text{M}$ konsantrasyonlarındaki süksinik asitin metastatik karakterli ACHN renal karsinoma hücre hattı üzerindeki 24 saatlik etkinliği sonucunda yalnızca Annexin V sinyalinin algılandığı hücrelerde $25\mu\text{M}$ ve $50\mu\text{M}$ konsantrasyonlar için

sırasıyla %19,1 ve %12,7 oranları ile erken apoptozun indüklendiği gözlenmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4-5).

Her iki hücre hattında da süksinik asitin bu dozlarda 24 saatlik inkübasyonun nekrotik hücre ölümünü tetiklemediği görülmüştür. Bununla birlikte nekrotik hücre ölümüne geçişi ifade eden geç apoptotik hücreler erken apoptozla kıyaslandığında her iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı bir oranda belirlenememiştir.

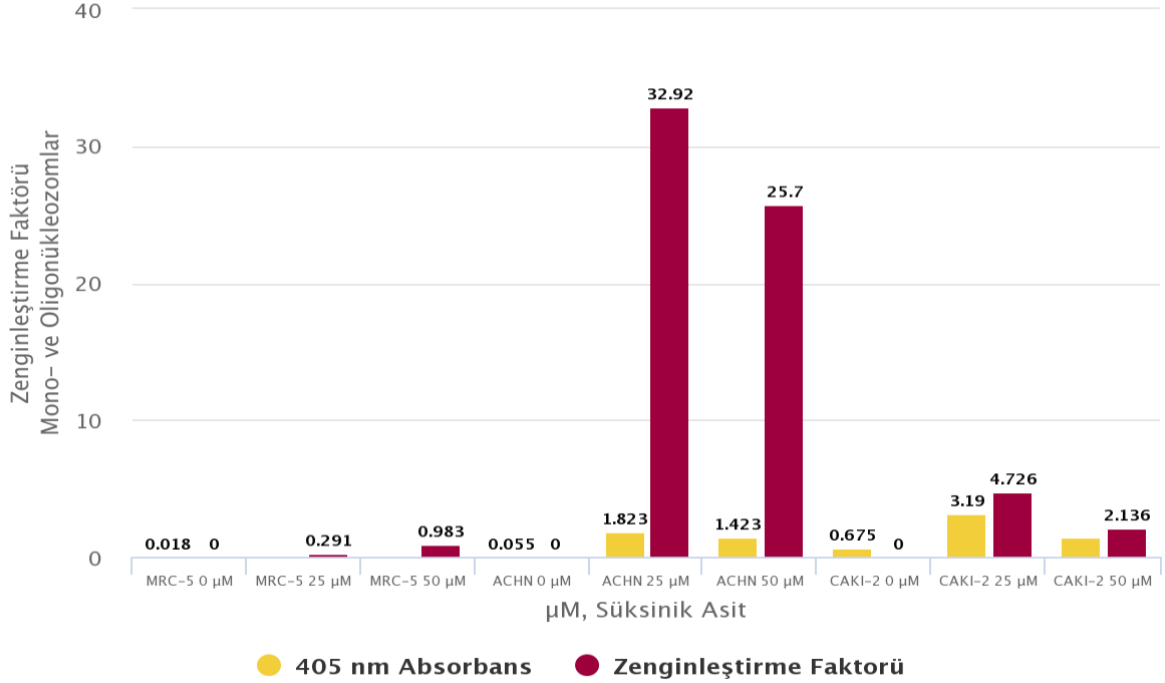


Şekil 4-5: ACHN hücre hattı üzerinde 25µM ve 50µM konsantrasyonlarında uygulanan süksinik asitin Apoptoz/Nekroz tayini

4.2.2. ELISA Kiti ile Hücre Ölümü Tayini

25µM ve 50µM konsantrasyonlarda uygulamış olduğumuz süksinik asit ile apoptoz arasındaki ilişki daha ileri bir değerlendirme için Hücre Ölüm Tipi Tayini ELISA Kiti kullanılarak analiz edilmiştir. Bu amaçla ölmekte olan CAKI-2 ve ACHN hücrelerinin sitoplazmalarında biriken mono- ve oligonüklezom ilişkili DNA fragmentleri saptanarak hücrelerdeki süksinik asit ile indüklenen hücre ölümü tipi tayin edilmiştir.

Platelerdeki apoptoz oranı; sitoplazmada biriken mono- ve oligonükleozomların zenginleştirilmesi ile saptanmıştır. Sonuçlar ELISA plate okuyucuda 405nm dalga boyunda ölçümleri yapılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 4-6: Süksinik Asitin Değişen Dozlarının CAKI-2, ACHN ve MRC-5 Hücre Hatlarında DNA Fragmentasyonuna Etkisi

Süksinik asit ile indüklenen apoptotik hücre ölümüne bağlı olarak ölü hücrelerin sitoplazmalarında ölçülen histon ilişkili DNA fragmentlerinin (Zenginleştirme Faktörü) ACHN, CAKI-2 ve MRC-5 hücre hatlarında karşılaştırılması Şekil 4-6'da yer almaktadır. Buna göre 25µM ve 50µM dozlarındaki süksinik asit uygulaması sonucunda histon ilişkili DNA fragmentlerinin CAKI-2 hücre hattında sırasıyla 4,7 ve 2.13 kat, ACHN hücre hattında 32,92 ve 12,7 kat artış olduğu tespit edilmiş olup MRC-5 hücre hattı üzerinde süksinik asitin herhangi bir apoptotik etkinliği saptanamamıştır ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Ürogenital kanserler arasında prostat ve mesane kanserlerinden hemen sonra 3. sırada yer alan renal kanserler tüm kanser türleri arasında en yaygın karşılaşılan 14. kanser türüdür[1], [11]. Epidemiyolojik çalışmaların gösterdiğine göre obezite, diyabet, hipertansiyon gibi metabolik hastalıklar, sigara kullanımı ve genetik yatkınlık renal kanser ile ilişkileri en çok çalışılmış risk faktörleri arasındadır[4].

Renal hücreli karsinoma; patogenezinde yer alan genlerin etkili olduğu yollarla dolayısıyla hem uygulanılmakta olan kemoterapötik yöntemlere karşı direnç geliştirilebildiği hem de tedavi edilmediği takdirde lenf bezlerine ve bunu takiben yakındaki organlara metastaz yapma olasılığının yüksek olduğu bir kanser türüdür[72]. Her ne kadar yerleşik halde bulunan ve erken evrelerde tanı konulan renal tümörlerin tedavisi için cerrahi müdahale altın standart oluşturuyor olsa da operasyon sonrası tümörün yeniden oluşma ihtimali oldukça yüksektir[78]. Bu özellikleri göz önünde bulundurulduğunda renal hücreli karsinoma için sağlıklı hücreler üzerinde toksik etki oluşturmaman alternatif tedavi yöntemlerinin araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, yakın zamanda farklı kanser türleri üzerinde apoptotik etkinliği gösterilmiş olan süksinik asitin renal karsinoma hücre soyları üzerindeki apoptotik etkinliğini araştırmayı amaçladık.

Süksinik asitin renal karsinoma hücre hatları üzerindeki apoptotik aktivitesine dair daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanılamamıştır.

Çalışmamız kapsamında elde ettiğimiz bulgulara göre her üç hücre hattı için de en uygun sitotoksik aktiviteye 25µM ve 50µM konsantrasyonlarda süksinik asitin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda ulaşıldığını gözlemledik. Bu sonuçlara göre berrak hücreli renal karsinoma CAKI-2 hücre hattı üzerinde 25µM ve 50µM dozlarındaki süksinik asitin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda hücre canlılığı sırasıyla %89 ve %91 oranında azalmış olup; metastatik karakterli ACHN renal adenokarsinoma hücre hattında ise aynı konsantrasyonlardaki süksinik asitin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda canlı hücre miktarının sırasıyla %59 ve %61 oranında azaldığı gözlenmiştir. Kontrol grubu olarak kullandığımız MRC-5 hücre hattı üzerinde beklediğimiz üzere sitotoksik bir etki gözlenmemiştir.

Çalışmamızda, ACHN ve CAKI-2 hücre hatlarındaki apoptotik hücre ölümü artan dozlardaki süksinik asit uygulamasıyla birlikte artış göstermiştir. CAKI-2 hücre hattı üzerinde 25µM ve 50µM dozlardaki süksinik asitin 24 saat süre ile uygulanmasının sonucunda Annexin V yöntemi ile ölçülen apoptotik hücre ölümü, süksinik asit uygulaması yapılmamış olan CAKI-2 hücreleri ile kıyaslandığında, sırası ile %19,25 ve %29,55 oranlarında artış göstermiştir. Bununla birlikte apoptotik hücre ölümü ile paralel olarak artış gösteren histon ilişkili DNA fragmentleri 4,7 ve 2,13 kat artmış olarak tespit edilmiştir. ACHN hücrelerinde apoptotik hücre ölümü süksinik asit uygulaması yapılmamış hücrelere kıyasla %19,1 ve %12,7 artış gösterirken histon ilişkili DNA fragmentlerinin 32,92 ve 25,7 kat arttığı gözlenmiştir. MRC-5 hücre hattı üzerinde ise diğer çalışmalarla uyumlu olarak apoptotik aktivite saptanamamıştır.

Hücre enerji metabolizmasında ara metabolit olarak işlev gören ve neredeyse tüm canlı organizmalarda doğal olarak bulunan süksinik asit tatlandırıcı ve kıvam arttırıcı olarak gıda sektöründe, ürün verimliliğini arttırmak amaçlı tarım alanında ve kozmetik endüstrilerinde oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir[5], [83].

Yaygın kullanım ve üretim alanına sahip olması süksinik asitin tedavi amaçlı kullanımı için elde edilebilirliği açısından avantaj sağlamaktadır.

Farklı endüstriyel alanlarda kullanılmasının yanı sıra süksinik asitin canlı organizmalar üzerinde anti-hipoksik, antioksidan ve apoptotik etkinliklerine dair yapılmış çeşitli çalışmalar literatürde mevcuttur[103]–[105].

Zarubina ve arkadaşlarının erkek Wistar cinsi 152 adet sıçan üzerinde yaptıkları çalışmada hipoksik şartlar altında süksinik asitin antihipoksik ve antioksidan aktivite sergileyerek hipoksi kaynaklı glikolitik ATP üretimini baskıladığı gösterilmiştir[104].

Süksinik asitin antioksidan aktivitesi üzerine yapılan bir diğer çalışmada kuluçka dönemindeki yumurtalara süksinik asit, serin ve etanolaminden oluşan bir kompleks uygulanmış olup, madde uygulaması yapılmamış olan kontrol grubuna göre yumurtaların stres altında fizyolojik durumları karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucuna göre süksinik asitin stres kaynaklı oluşan membran bütünlüğündeki ve mitokondriyal solunum zincirindeki bozulmalara karşı koruyucu etkinlik gösterdiği kaydedilmiştir[103].

Bu çalışmaların dışında, süksinik asitin çeşitli formlarının direkt veya antikanser ilaçlarla birlikte tümör hücre proliferasyonunu inhibe etmek, apoptozu indüklemek veya antikanser ilaçların etki düzeyini artırmak amacıyla farklı kanser türlerinde terapötik ajan olarak kullanılmasına dair çalışmalar mevcuttur[106]–[110].

E vitamininin kemoterapötik tedaviler sırasında kimyasal ajan uygulanması ile ortaya çıkan önemli yan etkileri azaltıcı yönde antioksidan etkiye sahip olduğu bilinmektedir[111]. E vitamini türevlerinden biri olan alfa-Tokoferol süksinat (α -TOS), süksinik asitin ester bağı ile ana zincire bağlanmasıyla oluşur[109] ve çeşitli kanser türlerinde *in vitro* ve *in vivo* olarak potansiyel hücre büyümesini inhibe edici ajan olarak kullanılmıştır[112], [113].

Weber ve ark. α -TOS'ın selektif sitotoksik etkinliği üzerinde çalışma yapmış olup tümör hücrelerinde apoptoz indüklenirken kalp, karaciğer, böbrek ve kolon hücreleri üzerinde herhangi bir toksik etki saptanmadığı not edilmiştir[114].

Yu ve arkadaşlarının insan meme kanseri hücre hatları üzerinde yaptıkları çalışmada Vitamin E-süksinatın hücrelerde JNK yolağının uzun süreli aktivasyonunu sağlayarak apoptozu indüklediğini göstermişlerdir[113] .

Baş ve boyun kanseri hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışmada, α -TOS temelli polimerik nanopartiküllerin selektif antikanser aktivite gösterdikleri ve pro-anjiyogenik büyüme faktörü VEGF'in üretimini azaltma ve VEGFR reseptörünü baskılama yoluyla kanser hücrelerinin anjiyogenezini baskıladıkları kaydedilmiştir. Ayrıca buna ek olarak tek başına polimerik nanopartikül kullanımına göre α -TOS temelli partiküllerin antikanser ve anti-anjiyogenik aktiviteleri artırdığı gösterilmiştir[106].

α -TOS'ın vesikül formasyonunun buna benzer aktivitesi Hahn ve ark. tarafından agresif metastatik karakterli fare meme kanseri hücre hattı üzerinde de çalışılmış olup 20 μ g/mL konsantrasyonda uygulanması sonucunda %67 oranında hücre ölümünü indüklediği ve artan madde konsantrasyonu ile birlikte hücre ölümünün de arttığı kaydedilmiştir. Buna ek olarak 20 μ g/mL konsantrasyonda canlı kalan hücrelerde α -TOS'ın proliferasyon yetenekleri ve koloni oluşumlarını da doz bağımlı olarak etkilediği gözlenmiştir[109].

Doxorubicin kemoterapötik tedavilerde sıklıkla tercih edilen bir antikanser ilaç olmasına rağmen sağlıklı hücreler üzerinde ciddi yan etkiler oluşturduğu bilinmektedir. Hossain ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Doxorubicinin sitotoksik ve hedefe

yönelik etkinliğini artırmak için süksinat ve sitrat ile modifiye edilmiş olan mineral temelli nanopartiküller kullanılmıştır ve çalışmaya göre meme kanseri hücre hatlarında süksinat ile birlikte uygulanan doxorubicinin antikanser etkinliğinin arttığı bildirilmiştir[107].

Süksinik asitin hücre kültürü ortamlarında anti-kanser etkinliğini direkt olarak gözlemlemeye yönelik endometrium kanseri ve T hücreli akut lenfoblastik lösemi hücre hatları üzerinde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Her iki çalışmada da süksinik asitin kullanılan sağlıklı MRC-5 hücre hattı üzerinde toksik etki oluşturmadığı kaydedilmiştir[7], [102].

Süksinik asitin antikanser etkinliği laboratuvarımızda daha önce İplik ve ark. tarafından endometrium kanser hücre hattı üzerinde çalışılmıştır. 5 μ M ve 10 μ M dozlarındaki süksinik asitin 48 saatlik inkübasyonu sonucunda CRL-2923 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinliği sırası ile %22,12 ve %18,28 olarak gözlenmiş olup ($p<0,05$) çalışmamız sonucunda ulaştığımız bulguları destekler niteliktedir. Bunu takiben süksinik asitin apoptotik etkinliği Akış Sitometrik Annexin V yöntemiyle ölçülmüş olup yine aynı dozlarda süksinik asitin hücrede apoptotik ölümü tetiklemede %42,08 ve %68,65 oranlarında etkinlik gösterdiği kaydedilmiştir ($p<0,05$)[7]. Bu sonuçlar da çalışmamızda renal karsinoma CAKI-2 ve ACHN hücre hatları üzerinde Annexin V yöntemi ile elde ettiğimiz bulgularla paralellik göstermektedir.

Bunun yanı sıra benzer bulgular Ertuğrul ve ark. tarafından çalışılmış olan T hücreli akut lenfoblastik lösemi kanser hücre hatlarında da gösterilmiş olup 25 μ M süksinik asitin 48 saatlik etkinliği sonrası MOLT-4 hücre hattında kaspaz-3 etkinliğinin süksinik asit uygulaması yapılmamış olan gruba göre 2,5 kat artış gösterdiği bildirilmiştir ($p<0,05$)[102].

Farklı kanser türleri üzerinde gerek süksinik asit türevli moleküllerin gerekse süksinik asitin direkt olarak antikanser ve apoptotik etkinliklerinin incelendiği pek çok çalışma literatürde yer almaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre süksinik asit türevli moleküllerin farklı maddelerin selektif antikanser etkinliğini artırmasının yanı sıra süksinik asitin doğrudan uygulanması durumunda kanser hücrelerinde apoptotik hücre ölümünü indüklemesi de önemli bir bulgudur. Bu bilgilerden yola çıkarak süksinik asitin farklı kanser türleri üzerinde apoptotik etkinliğinin araştırılarak tedaviye yönelik geliştirilebileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamız doğrultusunda süksinik asitin renal kanser hücre soyları üzerinde sağlıklı hücrelere zarar vermeden anti-kanser etkinlik oluşturabileceği izlenimi elde edilmiştir. Daha ileri moleküler temelli çalışmalar ile desteklenerek hücrede apoptotik ölümü indüklemeye hangi yollar üzerinden etkinlik gösterdiği tespit edilebilir ve klinik tedavi yöntemlerine karşı son yıllarda daha sık tercih edilmekte olan kişiye özel hedefleme temelli tedavi yaklaşımları için potansiyel bir terapötik ajan olarak süksinik asit uygulamalarının geliştirilmesi açısından umut vadetmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] P. Cairns, "Renal cell carcinoma," *Cancer Biomarkers*, 2011.
- [2] A. Kumar, N. Kumari, V. Gupta, and R. Prasad, "Renal Cell Carcinoma: Molecular Aspects," *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2018.
- [3] W.-H. Chow, L. M. Dong, and S. S. Devesa, "Epidemiology and risk factors for kidney cancer," *Nat. Rev. Urol.*, 2010.
- [4] U. Capitanio *et al.*, "Epidemiology of Renal Cell Carcinoma [Figure presented]," *European Urology*. 2019.
- [5] J. G. Zeikus, M. K. Jain, and P. Elankovan, "Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1999.
- [6] K.-K. Cheng, X.-B. Zhao, J. Zeng, and J.-A. Zhang, "Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives," *Biofuels, Bioprod. Biorefining*, 2012.
- [7] E. S. Iplik, T. Catmakas, and B. Cakmakoglu, "A new target for the treatment of endometrium cancer by succinic acid.," *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*, vol. 64, no. 1, pp. 60–63, Jan. 2018.
- [8] I. Bechthold, K. Bretz, S. Kabasci, R. Kopitzky, and A. Springer, "Succinic acid: A new platform chemical for biobased polymers from renewable resources," *Chemical Engineering and Technology*. 2008.
- [9] D. L. Lim, R. Ko, and S. E. Pautler, "Current understanding of the molecular mechanisms of kidney cancer: A primer for urologists," *Journal of the Canadian Urological Association*. 2007.
- [10] W. M. Linehan and C. J. Ricketts, "The metabolic basis of kidney cancer," *Seminars in Cancer Biology*. 2013.
- [11] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, and A. Jemal, "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.," *CA. Cancer J. Clin.*, 2018.
- [12] S. H. Rossi, T. Klatte, J. Usher-Smith, and G. D. Stewart, "Epidemiology and screening for renal cancer," *World Journal of Urology*. 2018.
- [13] M. Medina-Rico, H. L. Ramos, M. Lobo, J. Romo, and J. G. Prada, "Epidemiology of renal cancer in developing countries: Review of the literature,"

- Journal of the Canadian Urological Association*. 2018.
- [14] WHO, “Globocan 2018 - Home,” *Globocan 2018*. 2018.
 - [15] H. Moch, A. L. Cubilla, P. A. Humphrey, V. E. Reuter, and T. M. Ulbright, “The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours,” *Eur. Urol.*, 2016.
 - [16] K. Inamura, “Renal cell tumors: Understanding their molecular pathological epidemiology and the 2016 WHO classification,” *International Journal of Molecular Sciences*. 2017.
 - [17] M. Bonert and I. El-Shinnawy, “Subtypes of renal cell carcinoma with defined genomic alterations: diagnostic and prognostic significance,” *Diagnostic Histopathology*. 2018.
 - [18] C. J. Creighton *et al.*, “Comprehensivemolecular characterization of clear cell renal cell carcinoma,” *Nature*, 2013.
 - [19] S. Girgis, G. Huang, G. Low, Z. Moloo, and W. Fu, “Review of renal cell carcinoma and its common subtypes in radiology,” *World J. Radiol.*, 2016.
 - [20] L. Cheng, S. Zhang, G. T. MacLennan, A. Lopez-Beltran, and R. Montironi, “Molecular and cytogenetic insights into the pathogenesis, classification, differential diagnosis, and prognosis of renal epithelial neoplasms,” *Hum. Pathol.*, 2009.
 - [21] C. S. Ng, C. G. Wood, P. M. Silverman, N. M. Tannir, P. Tamboli, and C. M. Sandler, “Renal cell carcinoma: Diagnosis, staging, and surveillance,” *American Journal of Roentgenology*. 2008.
 - [22] I. J. Frew and H. Moch, “A Clearer View of the Molecular Complexity of Clear Cell Renal Cell Carcinoma,” *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 2014.
 - [23] B. Delahunt, J. N. Eble, M. R. E. McCredie, P. B. Bethwaite, J. H. Stewart, and A. M. Bilous, “Morphologic typing of papillary renal cell carcinoma: Comparison of growth kinetics and patient survival in 66 cases,” *Hum. Pathol.*, 2001.
 - [24] C. F. Davis *et al.*, “The somatic genomic landscape of chromophobe renal cell carcinoma,” *Cancer Cell*, 2014.
 - [25] N. R. Dunnick, “Renal cell carcinoma: staging and surveillance,” *Abdominal Radiology*. 2016.
 - [26] J. D. Brierley, M. K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, “TNM classification of

- malignant tumours - 8th edition,” *Union Int. Cancer Control*, 2016.
- [27] F. L. Greene *et al.*, *AJCC Cancer Staging Manual, Sixth Edition*. 2002.
 - [28] S. A. Fuhrman, L. C. Lasky, and C. Limas, “Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma,” *Am. J. Surg. Pathol.*, 1982.
 - [29] M. J. Oldham, D. J. DeSoi, L. T. Rimmer, K. A. Wagner, and M. J. Morton, “Insights from analysis for harmful and potentially harmful constituents (HPHCs) in tobacco products,” *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2014.
 - [30] P. Vineis *et al.*, “Tobacco and cancer: Recent epidemiological evidence,” *J. Natl. Cancer Inst.*, 2004.
 - [31] I. A. for R. on Cancer, “IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking,” *Monograph*, 2004.
 - [32] M. Fricker *et al.*, “Chronic cigarette smoke exposure induces systemic hypoxia that drives intestinal dysfunction,” *JCI Insight*, 2018.
 - [33] J. D. Hunt, O. L. Van Der Hel, G. P. McMillan, P. Boffetta, and P. Brennan, “Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: Meta-analysis of 24 studies,” *Int. J. Cancer*, 2005.
 - [34] J. Clague *et al.*, “Sensitivity to NNKOAc is associated with renal cancer risk,” *Carcinogenesis*, 2009.
 - [35] Y. Zhu, Y. Horikawa, H. Yang, C. G. Wood, T. Habuchi, and X. Wu, “BPDE Induced Lymphocytic Chromosome 3p Deletions May Predict Renal Cell Carcinoma Risk,” *J. Urol.*, 2008.
 - [36] S. B. Heymsfield and T. A. Wadden, “Mechanisms, Pathophysiology, and Management of Obesity,” *N. Engl. J. Med.*, 2017.
 - [37] A. Gati *et al.*, “Obesity and renal cancer: Role of adipokines in the tumor-immune system conflict,” *OncoImmunology*. 2014.
 - [38] L. C. MacLeod *et al.*, “Risk factors for renal cell carcinoma in the VITAL study,” *J. Urol.*, 2013.
 - [39] P. Gild, B. Ehdaie, and L. A. Kluth, “Effect of obesity on bladder cancer and renal cell carcinoma incidence and survival,” *Current Opinion in Urology*. 2017.
 - [40] A. D. Dobrian, M. J. Davies, S. D. Schriver, T. J. Lauterio, and R. L. Prewitt, “Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension,” *Hypertens. (Dallas, Tex. 1979)*, 2001.
 - [41] L. M. Liao, J. N. Hofmann, E. Cho, M. N. Pollak, W. H. Chow, and M. P.

- Purdue, "Circulating levels of obesity-related markers and risk of renal cell carcinoma in the PLCO cancer screening trial," *Cancer Causes Control*, 2017.
- [42] E. E. Calle and R. Kaaks, "Overweight, obesity and cancer: Epidemiological evidence and proposed mechanisms," *Nature Reviews Cancer*. 2004.
- [43] M. Liss, L. Natarajan, A. Hasan, J. L. Noguchi, M. White, and J. K. Parsons, "Physical Activity Decreases Kidney Cancer Mortality," *Curr. Urol.*, 2017.
- [44] S. Boorjian, "Commentary on 'The association between physical activity and renal cancer: Systematic review and meta-analysis.' Behrens G, Leitzmann MF, Department of Epidemiology and Preventive Medicine, Regensburg University Medical Center, Regensburg, Germany. Br J C," *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*. 2014.
- [45] E. Cho *et al.*, "Prospective evaluation of analgesic use and risk of renal cell cancer," *Arch. Intern. Med.*, 2011.
- [46] N. Kreiger, L. D. Marrett, L. Dodds, S. Hilditch, and G. A. Darlington, "Risk factors for renal cell carcinoma: results of a population-based case-control study," *Cancer Causes Control*, 1993.
- [47] J. Vlaanderen *et al.*, "Occupational exposure to trichloroethylene and perchloroethylene and the risk of lymphoma, liver, and kidney cancer in four Nordic countries," *Occup. Environ. Med.*, 2013.
- [48] C. S. Scott and W. A. Chiu, "Trichloroethylene cancer epidemiology: A consideration of select issues," *Environ. Health Perspect.*, 2006.
- [49] M. P. Waalkes, "Cadmium carcinogenesis," *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2003.
- [50] M. Waisberg, P. Joseph, B. Hale, and D. Beyersmann, "Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis," *Toxicology*. 2003.
- [51] S. Karami *et al.*, "Family history of cancer and renal cell cancer risk in Caucasians and African Americans," *Br. J. Cancer*, 2010.
- [52] J. J. Hsieh *et al.*, "Renal cell carcinoma 1 2," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, 2017.
- [53] N. B. Haas and K. L. Nathanson, "Hereditary Kidney Cancer Syndromes," *Advances in Chronic Kidney Disease*. 2014.
- [54] W. G. Kaelin, "The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer," *Nature Reviews Cancer*. 2008.
- [55] W. H. Chow and S. S. Devesa, "Contemporary epidemiology of renal cell

- cancer,” *Cancer J.*, 2008.
- [56] S. M. Haake and W. K. Rathmell, “Renal cancer subtypes: Should we be lumping or splitting for therapeutic decision making?,” *Cancer*, vol. 123, no. 2, pp. 200–209, 2017.
 - [57] C. D’Avella, P. Abbosh, S. K. Pal, and D. M. Geynisman, “Mutations in renal cell carcinoma,” *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.*, vol. 000, 2018.
 - [58] H. Hasumi and M. Yao, “Hereditary kidney cancer syndromes: Genetic disorders driven by alterations in metabolism and epigenome regulation,” *Cancer Science*. 2018.
 - [59] C. P. Pavlovich, L. S. Schmidt, and J. L. Phillips, “The genetic basis of renal cell carcinoma,” *Urologic Clinics of North America*. 2003.
 - [60] A. A. Hakimi, C. G. Pham, and J. J. Hsieh, “A clear picture of renal cell carcinoma,” *Nat. Genet.*, 2013.
 - [61] D. J. Sanchez and M. C. Simon, “Genetic and metabolic hallmarks of clear cell renal cell carcinoma,” *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. 2018.
 - [62] M. A. Perazella, R. Dreicer, and M. H. Rosner, “Renal cell carcinoma for the nephrologist,” *Kidney International*. 2018.
 - [63] C. Shen and W. G. K. Jr, “Seminars in Cancer Biology The VHL / HIF axis in clear cell renal carcinoma,” *Semin. Cancer Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 18–25, 2013.
 - [64] J. E. Ziello, I. S. Jovin, and Y. Huang, “Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia,” *Yale J. Biol. Med.*, vol. 80, no. 2, pp. 51–60, 2007.
 - [65] H. T. Cohen and F. J. McGovern, “MEDICAL PROGRESS: Renal-Cell Carcinoma,” *N. Engl. J. Med.*, 2005.
 - [66] N. M. Anderson, P. Mucka, J. G. Kern, and H. Feng, “The emerging role and targetability of the TCA cycle in cancer metabolism,” *Protein and Cell*. 2018.
 - [67] A. L. Harris, “Hypoxia — a Key Regulatory Factor in Tumour Growth,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, no. 1, pp. 38–47, 2002.
 - [68] N. Rohwer and T. Cramer, “Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways,” *Drug Resist. Updat.*, vol. 14, no. 3, pp. 191–201, 2011.
 - [69] G. Evan and T. Littlewood, “A matter of life and cell death,” *Science*. 1998.
 - [70] A. Sandoel and M. O. Hengartner, “Apoptotic Cell Death Under Hypoxia,”

Physiology, 2014.

- [71] I. Duran *et al.*, “Resistance to Targeted Therapies in Renal Cancer: The Importance of Changing the Mechanism of Action,” *Target. Oncol.*, 2017.
- [72] Y. Xia, L. Jiang, and T. Zhong, “The role of HIF-1 α in chemo-/radioresistant tumors,” *Onco. Targets. Ther.*, vol. 11, pp. 3003–3011, 2018.
- [73] R. M. Bukowski and R. J. Motzer, *Renal cell carcinoma: Molecular targets and clinical applications*. 2015.
- [74] G. Wang and P. Rao, “Succinate dehydrogenase-deficient renal cell carcinoma: A short review,” *Arch. Pathol. Lab. Med.*, vol. 142, no. 10, pp. 1284–1288, 2018.
- [75] R. J. Motzer *et al.*, “Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma,” *N. Engl. J. Med.*, 2007.
- [76] B. Escudier *et al.*, “Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma,” *N. Engl. J. Med.*, 2007.
- [77] J. J. Adashek, M. M. Salgia, E. M. Posadas, R. A. Figlin, and J. Gong, “Role of Biomarkers in Prediction of Response to Therapeutics in Metastatic Renal-Cell Carcinoma,” *Clin. Genitourin. Cancer*, 2019.
- [78] E. Chiong, R. H. Giles, M. A. Jewett, D. Murphy, H. Van Poppel, and H. Zargar, “The global burden of kidney cancer: a call to action,” *Int. Kidney Cancer Coalit.*, vol. 31, no. 0, pp. 1–20, 2017.
- [79] J. P. Tan, J. Jahim, S. Harun, and T. Y. Wu, “Overview of the Potential of Bio-Succinic Acid Production from Oil Palm Fronds,” vol. 28, pp. 53–72, 2017.
- [80] J. M. Pinazo, M. E. Domine, V. Parvulescu, and F. Petru, “Sustainability metrics for succinic acid production: A comparison between biomass-based and petrochemical routes,” *Catal. Today*, 2015.
- [81] J. J. Bozell and G. R. Petersen, “Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates - The US Department of Energy’s ‘top 10’ revisited,” *Green Chemistry*. 2010.
- [82] I. Meynial-Salles, S. Dorotyn, and P. Soucaille, “A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity,” *Biotechnol. Bioeng.*, 2008.
- [83] M. Jiang *et al.*, “Progress of succinic acid production from renewable resources: Metabolic and fermentative strategies,” *Bioresource Technology*. 2017.
- [84] W. Cao, Y. Wang, J. Luo, J. Yin, J. Xing, and Y. Wan, “Succinic acid

- biosynthesis from cane molasses under low pH by *Actinobacillus succinogenes* immobilized in luffa sponge matrices,” *Bioresour. Technol.*, 2018.
- [85] O. D. Rotstein, T. L. Pruett, V. D. Fiegel, R. D. Nelson, and R. L. Simmons, “Succinic acid, a metabolic by-product of *Bacteroides* species, inhibits polymorphonuclear leukocytes function,” *Infect. Immun.*, 1985.
- [86] K. B. Abdul-Majid, P. A. Kenny, and J. J. Finlay-Jones, “The effect of the bacterial product, succinic acid, on neutrophil bactericidal activity,” *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1997.
- [87] R. Hatti-Kaul, U. Törnvall, L. Gustafsson, and P. Börjesson, “Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals - a cradle-to-grave perspective,” *Trends in Biotechnology*. 2007.
- [88] J. J. Beauprez, M. De Mey, and W. K. Soetaert, “Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers,” *Process Biochem.*, 2010.
- [89] J. Wang, J. Zhu, G. N. Bennett, and K. Y. San, “Succinate production from different carbon sources under anaerobic conditions by metabolic engineered *Escherichia coli* strains,” *Metab. Eng.*, 2011.
- [90] B. Shuch, W. M. Linehan, and R. Srinivasan, “Aerobic glycolysis: A novel target in kidney cancer,” *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2013.
- [91] P. S. Ward and C. B. Thompson, “Signaling in control of cell growth and metabolism,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2012.
- [92] B. Otto Warburg, F. Wind, and N. Negelein, “THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. The Journal of General Physiology,” *Biochem. Z. Biochem. Z. Biochem. Z. Biol. Chem*, 1927.
- [93] M. G. Vander Heiden, L. C. Cantley, and C. B. Thompson, “Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation,” *Science*. 2009.
- [94] F. Massari *et al.*, “Metabolic alterations in renal cell carcinoma,” *Cancer Treat. Rev.*, vol. 41, no. 9, pp. 767–776, 2015.
- [95] S. Vanharanta *et al.*, “Early-Onset Renal Cell Carcinoma as a Novel Extraparaganglial Component of SDHB-Associated Heritable Paraganglioma,” *Am. J. Hum. Genet.*, 2004.
- [96] S. J. Lim, K. C. Moon, J. K. Min, and K. K. Joo, “ α -Tocopheryl succinate potentiates the paclitaxel-induced apoptosis through enforced caspase 8

- activation in human H460 lung cancer cells,” *Exp. Mol. Med.*, 2009.
- [97] X. Zhang *et al.*, “Alpha-tocopheryl succinate enhances doxorubicin-induced apoptosis in human gastric cancer cells via promotion of doxorubicin influx and suppression of doxorubicin efflux,” *Cancer Lett.*, 2011.
- [98] N. Duhem *et al.*, “Self-assembling doxorubicin-tocopherol succinate prodrug as a new drug delivery system: Synthesis, characterization, and in vitro and in vivo anticancer activity,” *Bioconjug. Chem.*, 2014.
- [99] J. Emami *et al.*, “Co-delivery of paclitaxel and α -tocopherol succinate by novel chitosan-based polymeric micelles for improving micellar stability and efficacious combination therapy,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2015.
- [100] K. N. Prasad, B. Kumar, X. D. Yan, A. J. Hanson, and W. C. Cole, “ α -tocopheryl succinate, the most effective form of vitamin e for adjuvant cancer treatment: A review,” *J. Am. Coll. Nutr.*, 2003.
- [101] D. Patacsil *et al.*, “Vitamin E succinate inhibits survivin and induces apoptosis in pancreatic cancer cells,” in *Genes and Nutrition*, 2012.
- [102] B. Ertuğrul, “Süksinik Asitin T Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi Hücre Hatlari Üzerindeki Apoptotik Etkisinin İncelenmesi.” *İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Proje Numarası: 21449.*, 2017.
- [103] I. S. Yartseva, M. S. Naydensky, I. I. Kochish, Y. N. Indukhova, and T. O. Azarnova, “Antioxidant Properties Of Ethanolamine, Succinic Acid And Serine When Treating Hatching Eggs,” *J. Biol. Sci. Opin.*, 2013.
- [104] I. V. Zarubina, M. V. Lukk, and P. D. Shabanov, “Antihypoxic and antioxidant effects of exogenous succinic acid and aminothiol succinate-containing antihypoxants,” *Bull. Exp. Biol. Med.*, vol. 153, no. 3, pp. 336–339, 2012.
- [105] M. Gąsecka, Z. Magdziak, M. Siwulski, and M. Mleczek, “Profile of phenolic and organic acids, antioxidant properties and ergosterol content in cultivated and wild growing species of *Agaricus*,” *Eur. Food Res. Technol.*, 2018.
- [106] C. Sánchez-Rodríguez *et al.*, “ α -Tocopheryl succinate-based polymeric nanoparticles for the treatment of head and neck squamous cell carcinoma,” *Biomolecules*, vol. 8, no. 3, 2018.
- [107] S. M. Hossain and E. H. Chowdhury, “Citrate- and succinate-modified carbonate apatite nanoparticles with loaded doxorubicin exhibit potent anticancer activity

- against breast cancer cells,” *Pharmaceutics*, 2018.
- [108] Y. Liu *et al.*, “Vitamin E succinate-conjugated F68 micelles for mitoxantrone delivery in enhancing anticancer activity,” *Int. J. Nanomedicine*, 2016.
- [109] T. Hahn, L. Szabo, M. Gold, L. Ramanathapuram, L. H. Hurley, and E. T. Akporiaye, “Dietary administration of the proapoptotic vitamin E analogue α -tocopheryloxyacetic acid inhibits metastatic murine breast cancer,” *Cancer Res.*, 2006.
- [110] J. Neuzil, “Vitamin E succinate and cancer treatment: A vitamin E prototype for selective antitumour activity,” *British Journal of Cancer*. 2003.
- [111] C. W. Wei, Y. L. Yu, Y. H. Chen, Y. T. Hung, and G. T. Yiang, “Anticancer effects of methotrexate in combination with α -tocopherol and α -tocopherol succinate on triple-negative breast cancer,” *Oncol. Rep.*, vol. 41, no. 3, pp. 2060–2066, 2019.
- [112] J. Neuzil, T. Weber, N. Gellert, and C. Weber, “Selective cancer cell killing by α -tocopheryl succinate,” *Br. J. Cancer*, 2001.
- [113] W. Yu, B. G. Sanders, and K. Kline, “RRR- α -tocopheryl succinate-induced apoptosis of human breast cancer cells involves bax translocation to mitochondrial,” *Cancer Res.*, 2003.
- [114] C. Weber *et al.*, “Vitamin E succinate is a potent novel antineoplastic agent with high selectivity and cooperativity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2 ligand) in vivo,” *Clin. Cancer Res.*, 2002.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

RENAL KANSER HÜCRE SOYLARINDA SÜKSİNİK ASİTİN ANTİKANSER ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 4	% 3	% 0	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
2	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Mugla University Öğrenci Ödevi	<% 1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
5	katalog.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	onunda-iki-bakan-oglu-ve-reza-zarrab- tutuklandi-914825-1mynet.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.iit.upcomillas.es İnternet Kaynağı	<% 1
8	verimliyiz.blogspot.com	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Göksu	Soyadı	Kaşarcı
Doğ.Yeri	Uşak	Doğ.Tar.	11/05/1993
Email	goksu.kasarci@gmail.com	Uyruğu	T.C.

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp AD	2019
Lisans	İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi	2016
Lise	Uşak Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok İyi	İyi	İyi		78,75 (Yökdil)

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
ALES Puanı	78,89		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office	Çok İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):