



**AKCİĞER KANSERİ DENEYSEL FARE MODELİNDE GEMSİTABİN VE
EF24'ÜN HÜCRE SAĞ KALIMI VE ÖLÜM MEKANİZMALARINA OLAN
ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ**

Ela KESEN BOZTAŞ

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2025

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Ela KESEN BOZTAŞ

06/02/2025

AKCİĞER KANSERİ DENEYSEL FARE MODELİNDE GEMSİTABİN VE EF24'ÜN HÜCRE SAĞ KALIMI VE ÖLÜM MEKANİZMALARINA OLAN ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

(Doktora Tezi)

Ela KESEN BOZTAŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2025

ÖZET

Akciğer kanseri, görülme sıklığı ve kansere bağlı ölüm sıralamasında, dünya çapında erkeklerde birinci, kadınlarda ise ikinci sıradadır. Akciğer kanseri tedavisinde; cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi yöntemleri tek başlarına veya kombine olarak uygulanmaktadır. Gemsitabin kemoterapide en sık kullanılan ajandır. Kemoterapide, genellikle birden fazla kemoterapötik ajan birlikte uygulanmaktadır. Son yıllarda, tedavide kullanılan ajanların kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini arttırmak ve/veya sağlıklı dokulardaki toksik etkilerini azaltmak amacıyla kemoterapötik ajanlar ile birlikte fitokimyasallar kullanılmaktadır. EF24 (Difenil difloroketon) ise, kurkuminin sentetik analoglarından biridir. Bu doktora tez çalışmasında, gemsitabin ile uyarılan hücre ölüm cevabına EF24'ün etkisinin *in vitro* ve *in vivo* olarak belirlenmesini amaçladık. Doktora tez çalışmamızın *in vitro* bölümünde, A549 hücrelerine EF24 ve gemsitabin ajanları tek başlarına ve birlikte 24 ve 48 saat uygulanarak hücrelerdeki canlılık oranlarını belirledik. Gemsitabinin ve EF24'ün seçilen konsantrasyonları ile yara iyileşmesi deneyi yaparak her iki ajanın tek başlarına ve birlikte hücrelerin göç etme yeteneği üzerine olan etkisini belirledik. Doktora tez çalışmamızın *in vivo* kısmında ise, A549 hücreleri kullanılarak deneysel akciğer kanseri ksenograft fare modeli oluşturduk. A549 ksenograftları gemsitabin, EF24 ve gemsitabin+EF24 ile tedavi edildi. Tedavi süresi sonunda, rezekte edilen tümör dokularının hacim ve ağırlıkları ölçüldü. Farelerden elde edilen tümör dokularında kaspaz-3, katalaz enzim aktiviteleri ve pNFκB/NFκB oranı ve MDA düzeyleri değerlendirildi. Tümör dokularının histopatolojik incelemesi de yapıldı. MTT sonuçlarına göre EF24 uygulanan hücrelerde hücre canlılığının konsantrasyona bağlı bir şekilde, gemsitabin uygulanan hücrelerde ise konsantrasyona bağlı olmadan azaldığını belirledik. Yara iyileşmesi deneyi sonuçlarımız, tek başına ve gemsitabinle birlikte EF24'ün, tek başına gemsitabin uygulanan hücrelerin göç hızını baskıladığını gösterdi. Oluşturduğumuz ksenograft modelden elde ettiğimiz tümör dokularını incelediğimizde gemsitabin tedavisi alan grupta kaspaz bağımlı apoptozun uyarıldığını belirledik. Tek başına EF24 ve gemsitabinle birlikte EF24 ile tedavi edilen gruplardan elde ettiğimiz sonuçlar ise, bu gruplarda otofajik hücre ölümü olabileceğini düşündürmüştür.

Bilim Kodu : 1055.1
Anahtar Kelimeler : EF24, gemsitabin, ksenograft, KHDAAK
Sayfa Adedi : 77
Danışman : Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN

DETERMINATION OF THE EFFECTS OF GEMCITABINE AND EF24 ON CELL
SURVIVAL AND DEATH MECHANISMS IN AN EXPERIMENTAL MOUSE MODEL
OF LUNG CANCER

(Ph. D. Thesis)

Ela KESEN BOZTAŞ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

February 2025

ABSTRACT

Lung cancer ranks first in men and second in women globally in terms of incidence and cancer-related mortality. Treatment for lung cancer includes surgery, chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy, either alone or in combination. Gemcitabine is one of the most commonly used agents in chemotherapy. Typically, multiple chemotherapeutic agents are applied together in chemotherapy. In recent years, phytochemicals have been used in combination with chemotherapeutic agents to increase their cytotoxic effects on cancer cells and/or reduce toxic effects on healthy tissues. EF24 (Difenyl difluoroketone) is one of the synthetic analogs of curcumin. In this doctoral thesis, we aimed to determine the effect of EF24 on the gemcitabine-induced cell death response in vitro and in vivo. In the in vitro section of our doctoral thesis, we determined the cell viability of A549 cells after treatment with EF24 and gemcitabine, both alone and in combination, for 24 and 48 hours. Using the selected concentrations of gemcitabine and EF24, we performed a wound healing assay to assess the effect of both agents, alone and in combination, on the cells' migration ability. In the in vivo section of our doctoral thesis, we established an experimental lung cancer xenograft mouse model using A549 cells. The A549 xenografts were treated with gemcitabine, EF24, and gemcitabine + EF24. At the end of the treatment period, the volume and weight of the resected tumor tissues were measured. Caspase-3, catalase enzyme activity, pNFκB/NFκB ratio, and MDA levels were evaluated in tumor tissues obtained from the mice. Histopathological examination of the tumor tissues was also conducted. According to the MTT results, we observed that cell viability decreased in EF24-treated cells in a concentration-dependent manner, whereas gemcitabine-treated cells exhibited a decrease in viability regardless of concentration. Our wound healing assay results showed that both EF24 alone and EF24 combined with gemcitabine suppressed the migration rate of cells compared to gemcitabine alone. Upon examining the tumor tissues obtained from the xenograft model, we determined that caspase-dependent apoptosis was induced in the gemcitabine-treated group. Results from the groups treated with EF24 alone and with EF24 combined with gemcitabine suggested that autophagic cell death might be occurring in these groups.

Science Code : 1055.1

Key Words : EF24, gemcitabine, xenograft, NSCLC

Page Number : 77

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Hacer İlke ÖNEN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca deneyimi, bilgisi, özverisi ve sabrıyla her zaman yanımda olan, değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN'e,

Doktora eğitimim boyunca bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen, bilim insanı ve akademisyen kimliği ile daima örnek olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ece KONAÇ'a,

Eğitim sürecime katkıda bulunan tüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim üyelerine,

Doktora tez çalışmasından elde ettiğimiz verilerin istatistiksel analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. F. Nur BARAN AKSAKAL'a

Yaşamının her anında ve eğitimim boyunca her zaman desteklerini hissettiğim sevgili eşim Özkan BOZTAŞ'a, çok kıymetli annem, babam ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Doktora tez çalışması, TDK-2023-8374 proje kodu ile Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	iv
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	viii
RESİMLERİN LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Akciğer.....	3
2.2. Akciğer Kanseri	4
2.2.1. Epidemiyoloji.....	4
2.2.2. Etiyoloji	8
2.2.3. Hiç sigara içmeyenlerde akciğer kanseri	10
2.2.4. Histopatoloji.....	10
2.2.5. Genetik faktörler	13
2.2.6. Epigenetik değişiklikler	14
2.2.7. Gempitabin etki mekanizması	15
2.2.8. Fitokimyasallar ve kanser	17
2.2.9. Apoptoz.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. Gereç.....	23
3.1.1. A549 hücre hattı.....	23

	Sayfa
3.1.2. Kullanılan cihazlar	23
3.1.3. Kullanılan sarf malzemeler	23
3.1.4. Kullanılan kimyasal malzemeler	24
3.1.5. Kullanılan kitler	24
3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı	25
3.3. Yöntemler	25
3.3.1. Hücre kültürü	25
3.3.2. Hücre canlılığının belirlenmesi.....	26
3.3.3. Hücre göçü (<i>in vitro</i> yara iyileşme deneyi).....	26
3.3.4. <i>In vivo</i> A549 ksenograft fare modelinin oluşturulması.....	27
3.3.5. Tümör dokularından protein eldesi.....	32
3.3.6. Tümör dokularında protein miktarının belirlenmesi.....	32
3.3.7. Tümör dokularında kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi.....	32
3.3.8. Tümör dokularında total NFκB p65 ve fosforile NFκB P65 (pS536) protein konsantrasyonlarının karşılaştırılması	32
3.3.9. Tümör dokularında Malondialdehid (MDA) düzeyinin belirlenmesi.....	33
3.3.10. Tümör dokularında katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	33
3.3.11. Histopatolojik inceleme	33
3.3.12. İstatistiksel analiz.....	34
4. BULGULAR	35
4.1. <i>In vitro</i> Deney Bulguları	35
4.1.1. EF24' ün A549 hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.....	35
4.1.2. Gempitabinin A549 hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemiyle belirlenmesi.....	36
4.1.3. EF24 ve gempitabinin birlikte uygulamalarının A549 hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi.....	38

Sayfa

4.1.4. A549 hücrelerinde EF24 ve gemsitabinin <i>in vitro</i> yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi.....	40
4.2. <i>In vivo</i> Bulgular	42
4.2.1. <i>In vivo</i> A549 ksenograft fare modelinde tedavi gruplarındaki tümör gelişiminin değerlendirilmesi	42
4.2.2. Tümör dokularında kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi.....	44
4.2.3. Tümör dokularında total NFκB p65 ve fosforile NFκB p65 (pS536) protein konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	45
4.2.4. Tümör dokularında MDA düzeyinin belirlenmesi.....	46
4.2.5. Tümör dokularında katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi.....	47
4.2.6. Histopatolojik değerlendirmeler	48
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR.....	61
EKLER.....	73
EK-1. Kobay D.H.L. A.Ş. Yerel Etik Kurul Kararı.....	74
EK-2. Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası	75
ÖZGEÇMİŞ	76

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. TNM' nin 9. baskısından uyarlanan KHDAK evreleri	12
Çizelge 2.2. Akciğer kanserinde genetik değişiklikler	14

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Akciğerin yapısı	3
Şekil 2.2. GLOBOCAN 2022 Türkiye kanser verilerine göre her iki cinsiyet ve tüm yaş gruplarındaki yeni olgu sayıları.....	5
Şekil 2.3. Türkiye’ de erkeklerde tüm yaş gruplarında en sık görülen kanserlerin dağılımları.....	6
Şekil 2.4. Türkiye’ de kadınlarda tüm yaş gruplarında en sık görülen kanserlerin dağılımları.....	6
Şekil 2.5. Gemsitabin metabolizması.....	16
Şekil 2.6. Kurkumin ve EF24’ ün kimyasal yapıları	17
Şekil 2.7. EF24’ün hücre canlılığı ve sinyal yolakları üzerindeki etkilerinin özeti	18
Şekil 2.8. NFκB Sinyal Yolağı	19
Şekil 2.9. Apoptoza yol açan ana moleküler yolakların şematik gösterimi	21
Şekil 3.1. <i>In vivo</i> A549 ksenograft deneysel fare modeli ve deneyin akış şeması.....	29
Şekil 4.1. EF24’ün artan konsantrasyonlarının 24 saat A549 hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	35
Şekil 4.2. EF24’ün artan konsantrasyonlarının 48 saat A549 hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	36
Şekil 4.3. Gemsitabinin artan konsantrasyonlarının 24 saat A549 hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.	37
Şekil 4.4. Gemsitabinin artan konsantrasyonlarının 48 saat A549 hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	38
Şekil 4.5. A549 hücrelerine EF24 ve gemsitabinin 24 saat süresince birlikte seçilen konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.....	39
Şekil 4.6. A549 hücrelerine EF24 ve gemsitabinin 48 saat süresince birlikte seçilen konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları.	40
Şekil 4.7. Seçilen ajan konsantrasyonlarının A549 hücrelerindeki yara kapanma oranları	41
Şekil 4.8. Her fareden elde edilen tümörlerin gruplara göre görüntüleri	43

Şekil 4.9. Farelerden rezekte edilen tümör dokularının ortalama ağırlıkları	43
Şekil 4.10. Farelerden rezekte edilen tümör dokularının ortalama hacimleri	44
Şekil 4.11. Tümör dokularındaki kaspaz 3 aktiviteleri	45
Şekil 4.12. Tümör dokularında belirlenen pNFκB/ NFκB protein konsantrasyonlarının oranı	46
Şekil 4.13. Tümör dokularında belirlenen MDA düzeyleri.....	47
Şekil 4.14. Tümör dokularında belirlenen katalaz enzim aktivitesi.....	48

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. <i>İn vivo</i> A549 ksenograft fare modeli deney aşamaları.....	31
Resim 4.1. Seçilen ajan konsantrasyonlarının A549 hücrelerinin göç etme yeteneği üzerine olan etkisinin yara iyileşme deneyi ile gösterilmesine ait fotoğraflar	41
Resim 4.2. Farklı gruplardan alınan tümör doku kesitlerinde mitozun gösterilmesi.....	49
Resim 4.3. Farklı gruplardan alınan tümör doku kesitlerinde nekrozun gösterilmesi	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
°C	Santigrat derece
Ca ²⁺	Kalsiyum
cm ²	Santimetre kare
CO ₂	Karbondioksit
dk	Dakika
g	Gram
H ₂ O	Su
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
IU	Uluslararası birim
kg	Kilogram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mm ³	Milimetre küp
nm	Nanometre
nM	Nanomolar
pmol	pikomol
rpm	Dakika başına dönme sayısı
sn	Saniye
U	Ünite
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar

Kısaltmalar	Açıklamalar
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndorome (Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu)
Akt	Protein kinase B (Protein kinaz B)
Apaf1	Apoptotic Protease Activating Factor 1 (Apoptoz proteaz aktivatör faktörü 1)
Bad	Bcl-2-associated agonist of cell death
Bak	BCL-2 homologous antagonist killer (Bcl-2 homolog antagonist öldürücü)
Bax	BCL-2-associated X protein (Bcl-2 ilişkili x proteini)
Bca	Bicinchoninic acid
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (B hücresi lenfoma-2)
BH	Bcl-2 homoloji
Bcl-W	B-cell lymphoma-2-Related X-Wide
Bfl-1	Bcl-2-related FLICE-inhibitory protein 1
Bid	BH3-interacting domain death agonist
Bik	Bcl-2-interacting killer
Bim	Bcl-2-interacting mediator of cell death
BSA	Bovine serum albümin (Sığır serum albümini)
B-RAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (v-raf mürin sarkoma viral onkogen homoloğu)
Casp3	Caspase 3 (Kaspaz 3)
Casp8	Caspase 8 (Kaspaz 8)
Casp9	Caspase 9 (Kaspaz 9)
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (Siklin Bağlantılı Kinaz İnhibitörü 2A)
COX-2	Cyclooxygenase-2
DAPK	Death-Associated Protein Kinase
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide (Dimetil sülfoksit)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoksiribonükleik asit)
DNaz	Deoksiribonükleaz

Kısaltmalar	Açıklamalar
DNMT1	DNA methyltransferase 1 (DNA metiltransferaz 1)
DNMT3A	DNA methyltransferase 3 alpha (DNA metiltransferaz 3 alfa)
DNMT3B	DNA methyltransferase 3 beta (DNA metiltransferaz 3 beta)
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EF24	Difenil difloroketon
EGFR	Epidermal growth factor receptor (Epidermal büyüme faktör reseptörü)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Enzim bağlı immünosorbent deneyi)
ELM4-ALK	Echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase
ERK	Extracellular signal regulated kinase (Hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinaz)
EZH2	Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
Fas	(CD95/Apo1) Fas, Fas cell surface death receptor
FBS	Fetal bovine serum (Fetal sığır serumu)
FHIT	Fragile histidine triad (fragil hisitidin triadı)
FOXA2	Forkhead box A2 (forkhead kutusu A2)
FOXF1	Forkhead box F1 (forkhead kutusu F1)
FOXJ1	Forkhead box J1 (forkhead kutusu J1)
GABA	Gama-aminobütirik asit
GATA2	GATA binding protein 2 (GATA bağlayıcı proteini 2)
H3K27me3	Histone 3 Lysine 27 trimethylation
H4K20me3	Histone 4 Lysine 20 trimethylation
HAART	Yüksek etkin antiretroviral tedavi
HAT	Histone acetyltransferase (Histon asetiltransferaz)
HDAC	Histone deacetylase (Histon deasetilaz)
H&E	Hematoksilen eozin boyama
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)

Kısaltmalar	Açıklamalar
HIV	Human Immunodeficiency Virus (İnsan immün yetmezlik virüsü)
HLF	Hypoxia inducible factor-like (hipoksiye duyarlı faktör benzeri)
HOXA5	Homeobox A5
Hrk	Harakiri
IARC	International agency for research on cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı)
IC50	Inhibitory concentration 50 (İnhibitör konsantrasyon)
IκB kinaz (IKK)	Inhibitor of kappa B Kinase (Kappa B kinaz inhibitörü)
İ.p.	Intraperitoneal
KHAK	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
KIF5B-RET	Kinesin Family Member 5B (KIF5B) ve Ret (Rearranged during Transfection)
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
K-Ras	Kirsten rat sarcoma virüs (Kirsten sıçan sarcoma viral onkogen homoloğu)
MDA	Malondialdehid
MEK-1	Mitojenle aktive olan protein kinaz 1 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1)
MET	Mesenchymal-Epithelial Transition Factor (Hepatosit büyüme faktör reseptörü)
MGMT	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (Metiltiyazoldifenil-tetrazolyum bromid)
n	Gözlem sayısı
nACHR	Nikotinik asetilkolin reseptörleri
NFκB	Nuclear factor kappa B (Nükleer faktör kappa B)
NKX2.1	NK2 Homeobox 1
NNK	4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-bütanon
Noxa	NADPH oxidase activator
OD	Optical density (Optik yoğunluk)
P	P-değeri
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymerase

Kısaltmalar	Açıklamalar
PBS	Phosphate buffered saline (Fosfat Tamponlu Tuz)
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase (Fosfoinositid 3 kinaz)
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PUMA	P53 Upregulated modulator of apoptosis
RARb	Retinoic Acid Receptor Beta
RASSF1	Ras association domain-containing family member 1 (Ras ilişkili alan içeren protein ailesi 1)
RASSF1A	Ras association domain family member 1A (Ras ilişki alanı ailesi üyesi 1A)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonükleik asit)
RNaz	Ribonükleaz
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
SWI/SNF	Switch/sucrose nonfermentable (Kromatin yeniden düzenleme kompleksi)
TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1 (T-hücre akut lenfositik lösemi 1)
TP53	Tumor Protein 53
ZEB2	Zinc finger E-box binding homeobox 2 (çinko parmak E-box bağlayıcı homeobox 2)
ZNF132	Zinc finger protein 132 (çinko parmak proteini 132)

1. GİRİŞ

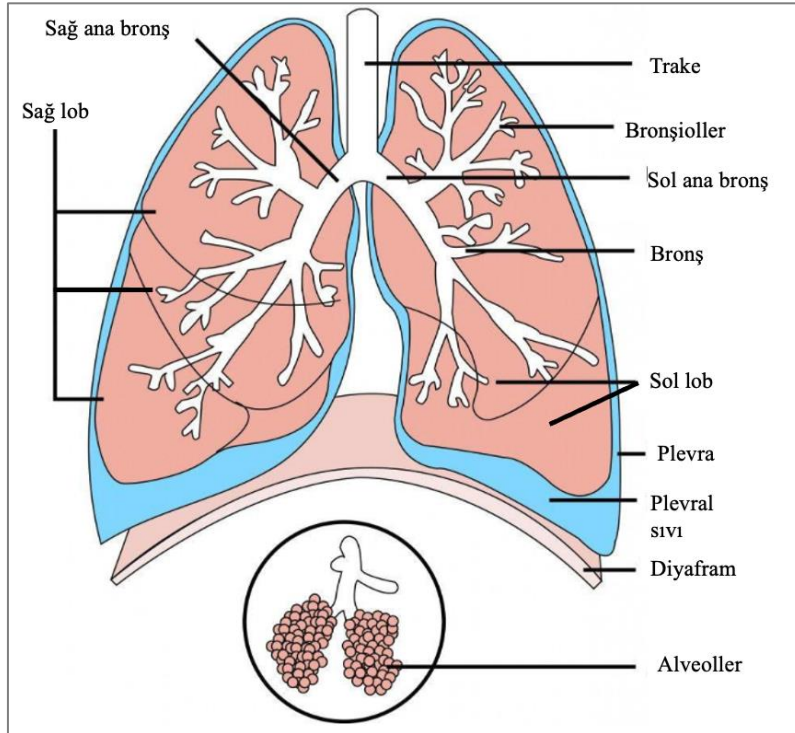
Akciğer kanseri, dünya genelinde erkeklerde en sık, kadınlarda ise ikinci en sık görülen kanser türüdür. Her yıl yaklaşık iki milyon kişi tanı almaktadır. Kansere bağlı ölümlerde ise, erkeklerde birinci, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Akciğer kanserinin çeşitli risk faktörleri içinde en önemlisi sigara kullanımıdır. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) ve Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) olmak üzere iki ana tipi vardır. Olguların yaklaşık %85'i KHDAK grubunda yer alır. KHDAK tedavisinde, kanserin evresine bağlı olarak cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi tek başlarına ya da birlikte uygulanmaktadır. İleri evre bazı hastalarda hedefe yönelik akıllı ilaçlar da kullanılmaktadır. Son yıllarda, EGFR/MET/ALK gibi gen mutasyonları veya yeniden düzenlemeleri olan hastalarda tirozin kinaz inhibitörleri de (TKI' ler) tedavide kullanılmaktadır. Ancak sadece bu grup üzerinde etkili olmaktadır. Çok yönlü tedavi stratejilerine rağmen özellikle ileri evrelerde tanı alan hastaların beş yıllık ortalama sağ kalım süreleri hala istenilen düzeyde değildir ve bu hastalarda kemoterapi birincil tedavi seçeneği olmaya devam etmektedir. İleri evre KHDAK tedavisinde birinci basamakta, gemsitabin ve platin bazlı ajanlar birlikte uygulanmaktadır. Gemitabin bir deoksitidin analogudur ve kanser hücreleri üzerindeki etkisini hücre ölümünü uyararak gösterir. Ancak, sonradan kazanılan ya da tedavi öncesi kişide mevcut olan ilaç direnci kemoterapötik ajanların hastalar üzerinde beklenen etkisini gösterememesine, ilaç dozunun artırılması ise hastalarda görülen yan etkilerin artmasına neden olmaktadır. Bu sebeplerden dolayı son yıllarda, tedavide kullanılan ajanların kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini artırmak ve sağlıklı dokulardaki toksik etkilerini azaltmak amacıyla kemoterapötik ajanlar ile birlikte fitokimyasallar kullanılmaktadır. En sık çalışılanlardan biri de kurkumindir. Hücreler üzerindeki antikanser etkilerine rağmen düşük stabilitesi ve zayıf farmokinetiği yapılan çalışmalarda istenilen sonuçlara ulaşılamamasına neden olmuştur. Bu sebeple sentetik olarak çeşitli analogları sentezlenmiştir. Bunlardan biri de EF24' tür ve farklı kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif, antimetastatik ve antianjiojenik özellikler gösterdiği bilinmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, A549 insan akciğer kanseri hücre hattı kullanılarak oluşturulan deneysel fare akciğer kanseri ksenograft modelinde gemitabin ile uyarılan hücre ölüm cevabına EF-24' ün etkisinin belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer

Akciğerler; göğüs boşluğunda, koni şeklinde, süngerimsi yapıdan oluşmuş ve genelde pembe-gri renktedir. Süngerimsi yapı sayesinde hacmi küçülür ve büyür. Sağ akciğer üç loba (üst, orta ve alt lob), sol akciğer ise iki loba (üst ve alt lob) sahiptir. Sol akciğerde ayrıca kalbin oturduğu alan nedeniyle bir kardiyak çentik bulunur. Her bir akciğer plevra adı verilen bir zarla kaplanmıştır ve göğüs kafesi içinde mediasten adı verilen yapı ile birbirinden ayrılır [1]. Hava, burun veya ağız yoluyla alınarak farenksden geçer, larinks ve trakea üzerinden bronşlar yoluyla akciğerlere ulaşır. Ana bronşlar, akciğer içinde daha küçük bronşlara, ardından bronşiolle ve en sonunda oksijen karbondioksit değişiminin gerçekleştiği alveollere ayrılır. Akciğerin yapısı Şekil 2.1. de gösterilmiştir. Akciğerlerin birincil işlevi gaz alışverişini kolaylaştırmaktır. Oksijen, alveoller aracılığıyla çevreden kan dolaşımına girer. Doku metabolizmasından kaynaklanan karbondioksit ise akciğerler yoluyla vücudu terk eder. Akciğer damar sistemi bu işlevleri destekleyecek şekilde düzenlenmiştir [2].



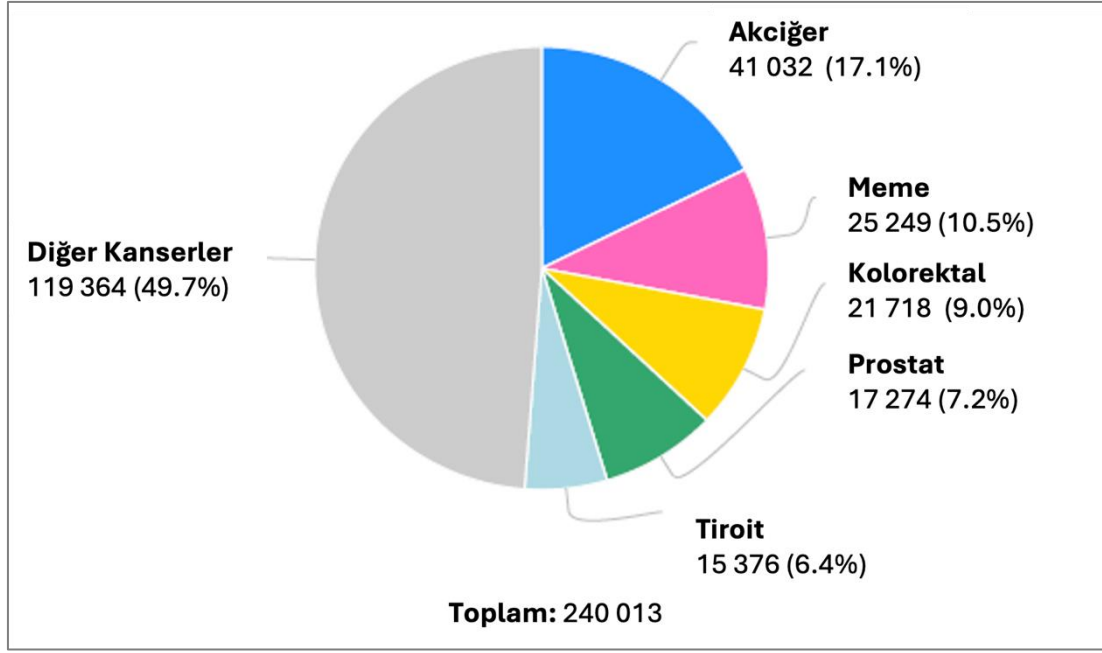
Şekil 2.1. Akciğerin yapısı

2.2. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri oluşumu sırasında epitelyal hücreler ile stromal hücreler arasında meydana gelen birçok etkileşim, normal akciğer gelişimindeki temel süreçlere benzerlik göstermektedir. Normal akciğerin gelişimi ve farklılaşmasında rol oynayan sinyal yolları, karsinogenezin başlaması, ilerlemesi ve histolojik farklılaşma aşamasında da rol alır [3]. Akciğer hücreleri, normal hücre çoğalması ve homeostazındaki kontrol kaybı nedeniyle malign fenotipe dönüşür. Bu sürecin, bir dizi genetik ve epigenetik değişiklik yoluyla çok aşamalı bir şekilde ortaya çıktığı ve nihayetinde klonal genişleme yoluyla invaziv fenotipe dönüştüğü düşünülmektedir. Birincil kanserin gelişimini takiben, klonal genişleme sırasında edinilen genetik ve epigenetik değişimlerin sürekli birikimi, invazyon ve metastazı, kanser tedavisinde direnç süreçlerini etkiler. Bu moleküler değişikliklerin tanımlanması kanseri önleme, erken tanı ve tedaviyi iyileştirmek için kritik öneme sahiptir. Hastanın tümör özelliklerinin ve genetiğinin bilinmesi, kişiye özel prognoz ve ideal tedavi seçimi konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmesini sağlar [4].

2.2.1. Epidemiyoloji

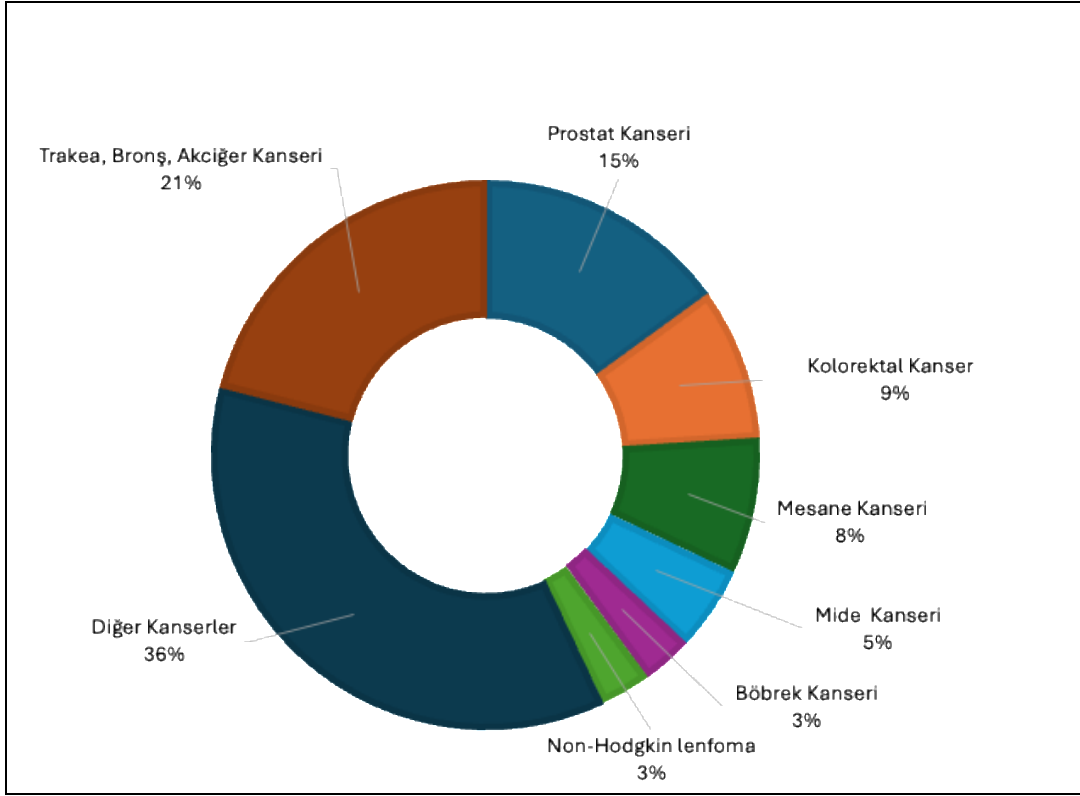
Akciğer kanseri, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2022 yılı verilerine göre, dünya genelinde 2,5 milyon yeni olgu ve 1,8 milyondan fazla ölümle, tüm kanser olgularının %12,4' ünü ve kanser ölümlerinin %18,7' sini oluşturarak başlıca yaşam kaybı nedeni olmuştur. Son verilere göre, olgu sayısı ve ölüm oranları açısından erkeklerde birinci, kadınlarda ise ikinci sıradadır. Erkeklerde, 33 ülkede en sık teşhis edilen, 89 ülkede en fazla ölüme sebep olan kanser türü olmuştur. Erkeklerde en yüksek görülme sıklığı Polinezya ve Mikronezya gibi ülkelerde ve Doğu Asya ile Doğu Avrupa gibi bölgelerde kaydedilmiştir. En yüksek ulusal oranların Türkiye' de olduğu tahmin edilmektedir. Kadınlarda ise en yüksek sıklığın Kuzey Amerika, Doğu Asya ve Kuzey Avrupa' da görüldüğü, en yüksek ulusal oranların da Macaristan' da olduğu tahmin edilmektedir. Çin ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD) dahil olmak üzere 23 ülkede kadınlarda kanserden ölümlerin önde gelen nedeni olmuştur [5].



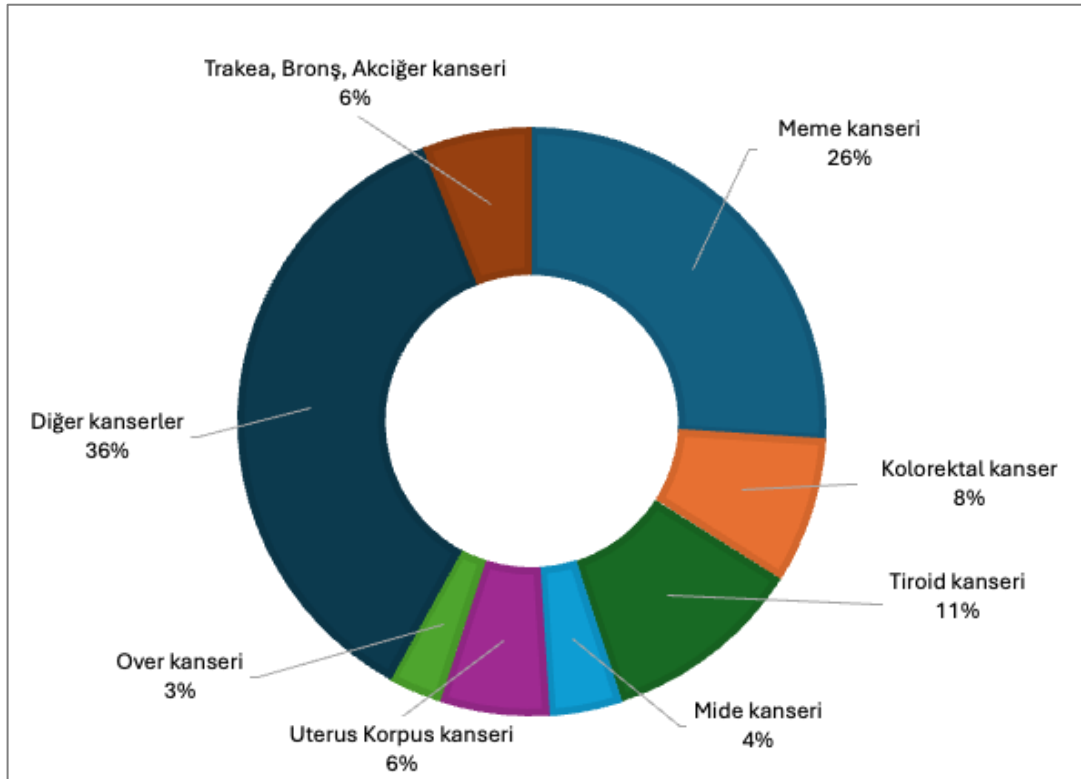
Şekil 2.2. GLOBOCAN 2022 Türkiye kanser verilerine göre her iki cinsiyet ve tüm yaş gruplarındaki yeni olgu sayıları

T.C Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2018 Türkiye Kanser İstatistikleri verilerine göre tüm yaş grupları içinde en sık görülen kanser türü soluk borusu/gırtlak/akciğer kanseridir. Kanser kaynaklı ölümler arasında da birinci sırada yer almaktadır [6, 7].

2018 yılında Türkiye’de 30.078 kişiye akciğer kanseri tanısı konulmuştur. Hastalarda kanserin evreleri incelendiğinde, %52,7 'sinde uzak organ metastazı olduğu belirlenmiştir. Akciğer kanseri tanısı genellikle ileri evrelerde konulabilmektedir. Özellikle erkeklerde, akciğer kanseri ve tütün kullanımına bağlı gelişen diğer kanserler, önemli sağlık problemleri arasında yer almaktadır [6].



Şekil 2.3. Türkiye’ de erkeklerde tüm yaş gruplarında en sık görülen kanserlerin dağılımları (Türkiye Kanser İstatistikleri, T.C. Sağlık Bakanlığı, 2018)



Şekil 2.4. Türkiye’ de kadınlarda tüm yaş gruplarında en sık görülen kanserlerin dağılımları (Türkiye Kanser İstatistikleri, T.C. Sağlık Bakanlığı, 2018)

Akciğer kanserindeki düşük hayatta kalma oranları göz önüne alındığında, hastalığın görülme sıklığı ve ölüm oranlarındaki belirgin coğrafi ve zamansal farklılıkların, tütün kullanımının ülkelerdeki yayılım ve gelişim aşamalarını yansıttığını göstermektedir. Bu farklılıklar, tütün kullanımının tarihsel olarak ne zaman ve ne ölçüde yaygınlaştığına, sigara içme alışkanlıklarının şiddetine, süresine, kullanılan sigara türüne ve sigaranın nasıl içildiğine bağlı olarak değişiklik göstermektedir [8]. Erkeklerde, sigara kullanımının yaygın olduğu nesillerde, sigara kullanımının azalmasının ardından akciğer kanseri oranlarının önce zirveye ulaşp sonra düşüşe geçtiği ilk olarak Birleşik Krallık ve ABD gibi yüksek gelirli ülkelerde bildirilmiştir. Bu değişim, sigara kullanımındaki eğilimleri yansıtırken genellikle 20-25 yıllık bir gecikme ile ortaya çıkmaktadır [9]. Genel olarak, tütün kullanımı kadınlar arasında erkeklere göre daha az ilerlemiş bir aşamadır ve kadınlardaki sigara kullanım eğilimlerinin, erkeklerde daha önce görülen eğilimleri ne ölçüde yansıttığı bölgelere göre büyük farklılık göstermektedir. Çoğu gelişmiş ülkede, kadınlarda akciğer kanseri oranları hâlâ artış göstermekte olup, yalnızca birkaç ülkede (ABD) oranların sabitlenme veya düşüş belirtileri görülmektedir. Bunun sonucunda, bazı ülkelerde kadınlarda görülme oranları genç ve orta yaş gruplarında erkeklere yaklaşmakta veya onları aşmaktadır. Avrupa ve Kuzey Amerika'da son nesillerdeki bu artış, önümüzdeki on yıllarda kadınlar arasında akciğer kanseri görülme sıklığının artabileceğine işaret etmektedir [10].

2020 yılında adenokarsinomun dünya genelinde en yaygın akciğer kanseri alt tipi olduğu ve erkeklerde çoğu ülkede, kadınlarda ise 185 ülkede skuamöz hücreli karsinomu geride bıraktığı tahmin edilmiştir [11]. Her iki cinsiyet için de adenokarsinom insidans oranlarının Doğu Asya'da (Çin dahil) en yüksek olduğu bildirilmiştir. Önceki epidemiyolojik çalışmalar, adenokarsinomun artan görülme sıklığını, gelişmiş ülkelerdeki uzun süreli dış ortam hava kirliliği maruziyetiyle ilişkilendirmiştir. Bu nedenle, dünya genelinde birçok büyük şehirde kaydedilen yüksek hava kirliliği seviyeleri, akciğer kanseri görülme oranlarındaki artışın önemli nedenlerinden biri olabilir [12].

Akciğer kanserinin beş yıllık sağkalım oranı çoğu ülkede %20'nin altında olup, çoğu olguya geç evrede tanı konulmaktadır. Bu nedenle, sigara bırakma ve erken tanı programları büyük önem taşımaktadır. Düşük doz bilgisayarlı tomografi ile yapılan tarama yöntemleri ile erken tanı konulması ölüm oranlarını azaltmada etkili bulunmuş olsa da maliyetler ve aşırı tanı gibi faktörler uygulamada zorluklar yaratmaktadır. DSÖ tarafından tanıtılan Tütün Kontrolü Çerçeve Sözleşmesi, MPOWER paketi ile tütün kontrol politikalarının kapsamlı

uygulanması sayesinde, özellikle Avrupa’da 20 yıllık süreçte 1,6 milyon akciğer kanseri olgusunun önlenilebileceği beklenmektedir [13].

2.2.2. Etiyoloji

Akciğer kanseri gelişimine neden olan en önemli risk faktörü sigara kullanımıdır. ABD ve sigara içmenin yaygın olduğu diğer ülkelerdeki olguların %80'inden fazlasının sigara kaynaklı olduğu belirlenmiştir [14]. Diğer önemli risk faktörleri; pasif içicilik (düzenli pasif içicilik akciğer kanseri riskini %30'a kadar artırabilir), çevre kirliliği, kanserojenlere (asbest, krom bileşikler, silika gibi) mesleki maruziyet ve genetik yatkınlıktır [15]. Bu faktörlerin etkileri, coğrafi konum, cinsiyet ve bu etmenlerin birbiriyle sinerjistik etkileşimlerine bağlı olarak farklılık gösterir [16].

Sigara kullanımı

Toplumsal sigara kullanma alışkanlıkları, insidansı büyük ölçüde etkilemektedir. Sigaraya başlama ve bırakma konusundaki cinsiyet farklılıkları, akciğer kanserinin erkekler ve kadınlar arasında farklı oranlarda görülmesiyle ilişkilidir. Sigara kullanımının geç dönemde zirveye ulaştığı ülkelerde, erkeklerde akciğer kanseri oranları azalırken kadınlarda artış görülmektedir [17]. Tütünün bağımlılık yapıcı maddesi, sinir sistemindeki nikotinik asetilkolin reseptörlerine (nAChR) bağlanan ve asetilkolin agonisti olarak işlev gören doğal bir alkaloid olan nikotindir. Bu bağlanma, dopamin, serotonin, norepinefrin, endorfinler ve gama-aminobütirik asit (GABA) gibi nörotransmitterlerin kan dolaşımına salınımını tetikler ve nikotinik reseptörlerin seviyesini arttırarak tütün bağımlılığını teşvik eder [18, 19]. Nikotinin kendisi bir kanserojen değildir ancak sigara dumanında, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı tarafından kanserojen olarak sınıflandırılmış en az 60 farklı madde bulunmaktadır. Bu maddeler arasında polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-bütanon (NNK) öne çıkmaktadır. [20]. Sigara içenlerde akciğer kanserine yakalanma riskinin derecesi günlük içilen sigara sayısına ve sigara içme paket yılına bağlıdır.

Pasif içicilik

Sigara dumanına pasif olarak maruz kalmak doza bağlı olarak akciğer kanser riskini artırmaktadır. Oberg ve diğerleri, 192 ülkede yaptıkları kapsamlı çalışmada çevresel tütün maruziyetinin etkilerini incelemişlerdir. Çocukların %40'ının ve sigara içmeyenlerin %33-35' inin pasif içiciliğe maruz kaldığını belirlemişlerdir [21].

Çevresel faktörler ve mesleki maruziyet

Kanserojen maddelere mesleki maruziyetin akciğer kanserlerinin %5-10'unu oluşturduğu tahmin edilmektedir [22]. Asbest maruz kalma, akciğer kanserinin en iyi bilinen mesleki nedenlerinden biridir. Asbest madenciliği ve işlenmesi, gemi yapımı, inşaat, tekstil ve yalıtım sektörlerinde çalışanlar en yüksek risk altındadır [23]. Sigara kullanımıyla birleştiğinde akciğer kanseri üzerinde sinerjistik bir etki oluşturmaktadır [24]. Radon gazına maruziyet önemli bir diğer faktördür. Radon, yer kabuğundaki uranyumun bozunmasıyla doğal olarak oluşan radyoaktif bir gazdır ve topraktan gelen radon akciğer kanseri için yaygın bir risk faktörüdür [25]. Yeraltı madencileri ile yapılan çalışmalar, yüksek dozda radon maruziyeti ile akciğer kanseri arasındaki ilişkiyi ilk kez ortaya koymuştur. Sigara içmeyenlere kıyasla radon maruziyeti ile birlikte sigara kullanımı akciğer kanserine yakalanma riskini 25 kat artırmaktadır [26].

Hava kirliliği

Fosil yakıtların yanmasıyla oluşan kanserojenler ve havada bulunan partikül maddeler, dış ve iç mekân hava kalitesini etkileyen iki ana faktördür. Dış ortamda bulunan atmosferik kanserojenler, PAH, kükürt dioksit ve eser metaller gibi maddeleri içerebilir. Bu maddelere uzun süre maruz kalınan mesleklerde akciğer kanser riski artmaktadır [27]. Isınma ve yemek pişirme amacıyla kömür gibi katı yakıtların kullanımı nedeniyle oluşan iç mekân hava kirliliği gelişmekte olan ülkelerde akciğer kanseri gelişimiyle ilişkilidir [28].

Enfeksiyon ve geçirilmiş akciğer hastalığı

Akciğerde inflamasyon ve enfeksiyon nedeniyle oluşan hasarın kanser oluşumunda rol oynadığı düşünülmektedir. Geçmişte, tüberküloz gibi enfeksiyonların sigara kullanımından bağımsız olarak ve uzun bir latent dönemin sonunda akciğer kanser riskini artırabileceği

gösterilmiştir. Büyük bir meta analiz çalışması, kronik bronşit, tüberküloz veya zatürre geçmişi bulunan hiç sigara içmeyen bireylerin akciğer kanserine yakalanma riskinin daha yüksek olduğunu göstermiştir [29]. Günümüzde gelişmiş ülkelerde tüberkülozun görülme sıklığı azalmıştır [30].

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA)

KOA ve akciğer kanseri için ortak risk faktörü sigara olsa da yapılan araştırmalar KOA'nın sigaradan bağımsız olarak akciğer kanseri riskini 2-3 kat artırdığını ortaya koymuştur [30]. KOA, amfizem ve kronik bronşiti de içeren çeşitli fenotiplerle karakterize edilen bir hastalığı temsil eder ve akciğer kanseri riskinin KOA fenotipleri arasında nasıl farklılık gösterdiğine ilişkin veriler sınırlıdır [31].

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV)

Akciğer kanseri, HIV ile enfekte olan bireylerde AIDS dışında en sık görülen malignitedir [32]. HIV enfeksiyonu taşıyan bireyler sigaradan bağımsız olarak akciğer kanseri riskinde 2,5 kat artış göstermektedir [22].

2.2.3. Hiç sigara içmeyenlerde akciğer kanseri

Dünya genelinde, her iki cinsiyette akciğer kanseri tanısı konulan hastaların %25'inin hiç sigara içmediği tahmin edilmektedir [33]. 2023 yılında, kanser kaynaklı ölümler arasında dünya genelinde beşinci sırada yer almıştır [34]. Genellikle kadınlarda ve genç bireylerde daha sık görülmektedir. Histolojik olarak çoğunlukla adenokarsinom olup, hedefe yönelik tedavilere iyi yanıt veren EGFR mutasyonu ve ELM4-ALK füzyon proteini gibi sürücü mutasyonları taşır [33]. KHDAK görülen kadınların %60-80' ininin hiç sigara içmediği Doğu ve Güney Asya' da özellikle yüksektir. Bu yüksek oranların, kısmen dış ortam hava kirliliğine ve evlerde ısınma, yemek pişirme amacıyla katı yakıtların yakılmasına maruziyet sonrası ortaya çıktığı düşünülmektedir [34].

2.2.4. Histopatoloji

Akciğer kanserlerinin çoğu epitelyal hücrelerden kaynaklanır. [35]. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) ve Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) olmak üzere iki ana

histolojik tipi vardır. Olguların yaklaşık %85'i KHDAK grubunda yer alır. KHDAK'ın, skuamoz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere üç ana histolojik alt tipi vardır [36]. Bunun yanında, daha az sıklıkla görülen adenoskuamöz karsinom ve sarkomatoid karsinom gibi diğer alt tipleri de vardır. [37]. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) güncel Torasik Tümörler Sınıflandırması 2021 yılında yayımlandı [38]. DSÖ'nün önceki baskıları 1967 ve 1981 yıllarında sadece akciğerle ilgili olarak yayımlanmış, 1999'da akciğer ve plevra, ardından 2004 ve 2015'te akciğer, plevra, timus ve kalp dahil edilerek güncellenmiştir [39]. 2015 DSÖ sınıflandırması, genetik ve moleküler hedefli tedavilerin anlaşılmasındaki kayda değer ilerleme sayesinde birçok önemli değişiklik getirmiştir. Sınıflama boyunca immünohistokimya ve moleküler testlerin uygulanması sayesinde, patolojik tanıya yönelik daha gelişmiş yaklaşımlar, akciğer tümörlerinin patolojik ve genetik sınıflandırmasını daha kesin hale getirerek daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak tanımıştır. 2015 yılında, sınıflandırmayı daha doğru hale getirmek için immünohistokimya kullanımına vurgu yapılırken 2021 yılında tüm tümör tiplerinde moleküler patolojideki ilerlemelere daha fazla odaklanılmıştır. Akciğer tümörü sınıflandırmasının temel ilkeleri, önce morfolojiye dayalı bir yaklaşımı benimsemek, ardından bunu immünohistokimya ve moleküler tekniklerle desteklemek şeklinde devam etmektedir [38].

Tedavi yaklaşımında histolojik tanı, hastalığın evresi, moleküler profillemeye sonuçları ve hastanın genel durumu belirleyici unsurlardır. Hastalığın nihai anatomik evresi ve yayılımı, Uluslararası TNM tabanlı evreleme sistemiyle belirlenir ve bu sistem, tedavi planının oluşturulmasında önemli bir rol oynar. Bu sisteme göre, KHDAK evreleri bir ila dört (I ila IV) arasında değişir. Evre ne kadar düşükse kanser o kadar az yayılmıştır [40]. Çizelge 2.2.' de TNM evrelemesi gösterilmiştir [41].

Çizelge 2.1. TNM' nin 9. baskısından uyarlanan KHDAK evreleri

T/M		N0	N1	N2		N3
				N2a	N2b	
T1	T1a ≤ 1 cm	IA1	IIA	IIB	IIIA	IIIB
	T1b > 1 ile ≤ 2 cm	IA2	IIA	IIB	IIIA	IIIB
	T1c > 2 ile ≤ 3 cm	IA3	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a	IB	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
	T2a > 3 ile ≤ 4 cm	IB	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
	T2b > 4 ile ≤ 5 cm	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
T3	T3 > 5 ile ≤ 7 cm	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 invazyon	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T3 Satellit nodüller	IIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4 > 7 cm	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
	T4 İnvazyon	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
	T4 Ipsilateral nodüller	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
M1	M1a Kontraletral nodüller	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1a Plevral, perikardiyal efüzyon	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b Tek bir torasik dışı lezyon	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c1 Tek bir organ sisteminde birden fazla torasik dışı lezyon	IVB	IVB	IVB	IVB	IVB
	Birden fazla organ sisteminde birden fazla torasik dışı lezyon	IVB	IVB	IVB	IVB	IVB

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

Akciğer kanseri olgularının yaklaşık %85' ini oluşturan KHDAK üç ana grupta sınıflandırılır:

Adenokarsinom

Özellikle sigara içmeyenlerde en sık görülen alt tiptir. Alveollerdeki glandüler hücrelerden kaynaklanır ve genellikle akciğerin periferik bölgelerinde görülür. Adenokarsinom, müsin üretimi ve glandüler farklılaşma ile karakterizedir. Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturur [39, 40].

Skvamöz hücreli karsinom

Sigara kullanımıyla güçlü bir ilişkiye sahiptir ve bronşları döşeyen epitel hücrelerinden gelişir. Ana bronşlarda ortaya çıkıp karinaya ilerleme eğilimindedir. Genellikle keratinizasyon ve hücreler arası köprüler sergiler. Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %25-30' unu temsil eder [39, 40].

Büyük hücreli karsinom

Daha nadir görülen bir alt tip olup, glandüler veya skuamöz özellikler göstermeyen tümörleri temsil eder. Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %10' unu oluşturur [39, 40].

Küçük hücreli akciğer kanseri

Küçük, yuvarlak veya oval hücrelerden oluşur; az sitoplazmaya, yoğun kromatine ve yüksek mitotik aktiviteye sahiptir. Son derece agresif bir yapıdadır. Bronşiyal invazyona neredeyse hiç maruz kalmadan submukozal lenf damarlarına ve bölgesel lenf düğümlerine yayılır. Tüm akciğer kanserlerinin %10-15'ini oluşturur [39, 40].

2.2.5. Genetik faktörler

Kanser gelişiminden sorumlu en az üç hücresel gen sınıfı söz konusudur: protoonkogenler, tümör baskılayıcı genler ve DNA onarım genleri. Onkogenlerin aktifleşmesi genellikle nokta mutasyonu, gen amplifikasyonu veya yeniden düzenleme yoluyla gerçekleşirken, tümör baskılayıcı genler klasik olarak bir nokta mutasyonla birlikte bir parental alelin kaybı veya kalan alelde hedef genin metilasyonu ile inaktive edilir [42]. Akciğer kanserinde mutasyon saptanan protoonkogenler; *K-RAS*, *EGFR*, *B-RAF*, *MEK-1*, *HER2*, *MET*, *EML-4-ALK*, *KIF5B-RET* ve *NKX2.1* 'dir. İnaktive olan tümör baskılayıcı genler; *TP53*, *PTEN*, *LKB-1*, *CDKN2A*, *FHIT*, *RASSF1A* ' dir [40, 43]. Akciğer kanserinde görülen genetik değişiklikler ve histolojik tipine göre görülme sıklığı Çizelge 2.2.' de gösterilmiştir [39].

Çizelge 2.2. Akciğer kanserinde genetik değişiklikler

Genler	Küçük Hücreli Karsinom (%)	Adenokarsinom (%)	Skvamöz Hücreli Karsinom (%)
Mutasyon			
BRAF	0	<5	0
EGFR Beyazlar	<1	10-20	<1
EGFR Asyalılar	<1	35-45	<5
ERBB2/HER2	0	<5	0
KRAS Beyazlar	<1	15-35	<5
KRAS Asyalılar	<1	5-10	<5
PIK3CA	<5	<5	5-15
RB	>90	5-15	5-15
TP53	>90	30-40	50-80
Amplifikasyon			
EGFR	<1	5-10	10
ERBB2/HER2	<1	<5	<1
MET	<1	<5	<5
MYC	20-30	5-10	5-10
FGFR1	<1	<5	15-25
Gen Yeniden Düzenlemeleri			
ALK	0	5	<1
RET	0	1-2	0
ROS1	0	1-2	0
NTRK1	0	<1	0
NRG1	0	<1	0

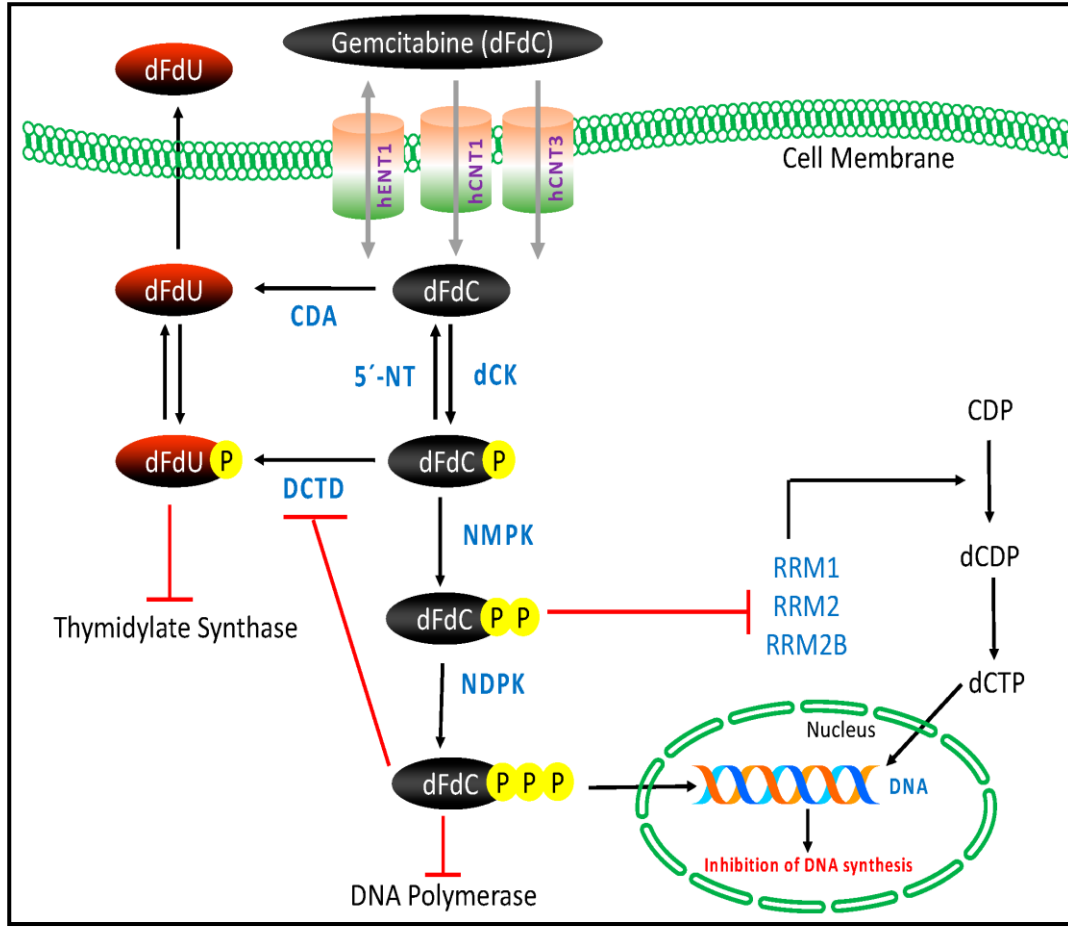
2.2.6. Epigenetik değişiklikler

Epigenetik mekanizmalar, DNA dizisinde değişiklik yapmadan gen ifade düzenini ve genomik kararlılığı etkileyebilir. Bu süreçler, DNA metilasyonu, histon modifikasyonu, kromatin yeniden düzenlenmesi ve kodlamayan RNA'ların ekspresyonundaki değişiklikleri içerir [44]. Normal koşullarda DNA metilasyonu düzenli bir şekilde gerçekleşirken, tümör dokusunda bu denge bozulabilir. Hipometilasyon genetik kararsızlığa ve onkogenlerin aktivasyonuna neden olurken, hipermetilasyon tümör baskılayıcı genleri susturabilir [45]. Histon proteinlerindeki kovalent modifikasyonlar (metilasyon, asetilasyon gibi), kromatin yapısını değiştirerek genlerin aktif hale gelmesine veya susturulmasına yol açar. Bu süreçte histon deasetilazlar (HDAC'ler) ve SWI/SNF gibi kromatin yeniden düzenleme kompleksleri önemli bir rol oynar. [46]. Ayrıca, kodlamayan RNA'lar (örneğin,

mikroRNA'lar ve uzun kodlamayan RNA'lar), gen ifadesini transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeyde düzenleyerek kanserde onkogenik veya tümör baskılayıcı işlevler üstlenebilir [47]. KHDAK gelişiminin farklı aşamalarında epigenetik değişikliklerin rolü üzerine birçok çalışma yapılmıştır. Skuamöz hücreli karsinomda ZNF132 ve GATA2 transkripsiyon faktörlerinin, adenokarsinomda ise, KCNIP4, ZEB2 ve FOXF1 genlerinin hipermetilasyona uğradığı gösterilmiştir. Ayrıca, her iki akciğer kanseri türünde de FOXA2, FOXJ1, HOXA5, TAL1 ve HLF transkripsiyon faktörlerinin hipermetilasyonu saptanmıştır [48]. Ayrıca, bazı DNA metiltransferazlarının (DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B) anormal ifadenmesinin akciğer kanseri gelişimiyle ilişkili olduğu bulunmuştur. Özellikle, skuamöz hücreli karsinomda DNMT1'in artan ifadesi, tümör baskılayıcı genlerin (RASSF1A, CDKN2A) hipermetilasyonu ve susturulmasına yol açmaktadır. Ayrıca, kromatin yeniden düzenleme komplekslerinin anormal aktivitesinin skuamöz hücreli karsinom gelişiminin erken aşamalarında etkili olduğu ve EZH2' nin artan ekspresyonu nedeniyle H4K20me3 seviyelerinin düşmesi, H3K27me3 seviyelerinde artış ve DNA metilasyonu aracılığıyla tümör baskılayıcı mikroRNA'ların (örneğin, miR-196b, miR-200b, miR-200c veya miR-205) susturulması bildirilmiştir [49, 50]. Adenokarsinomda ise, MGMT, RARb, DAPK, hTERT, PTPRN2 genlerinin promotör hipermetilasyonu ve buna bağlı olarak bu genlerin ifade düzeylerinde azalma tespit edilmiştir [51].

2.2.7. Gempitabin etki mekanizması

Gempitabin (2',2'-diflorodeoksisitidin), KHDAK tedavisinde yaygın olarak kullanılan sentetik sitidin analogudur [52]. Günümüzde gempitabin akciğer kanserinin yanı sıra pankreas, mesane, meme, over kanserlerinde ve malign mezotelyomada kullanılmaktadır [53]. Gempitabin, malign hücrelere transfer edildikten sonra deoksisitidin kinaz enzimi (dCK) tarafından fosforilasyon yoluyla monofosfat (dFdCMP), difosfat (dFdCDP) ve trifosfat (dFdCTP) formlarına dönüştürülür [54]. Difosfat (dFdCDP), DNA sentezi için gerekli deoksinükleotid trifosfatların oluşumunu katalizleyen ribonükleotid redüktaz enzimini baskılar. Bu enzimin inhibisyonu hücre içi deoksisitidin trifosfatın (dCTP) konsantrasyonunda bir azalmaya yol açar [54, 55]. Trifosfat (dFdCTP) replikasyon sırasında DNA polimeraz tarafından uzayan zincire katılmak için dCTP ile yarışır [55]. Bu şekilde uzayan DNA zincirine dFdCTP'nin dâhil edilmesi, replikasyonun durmasına ve apoptozun uyarılmasına neden olur [56].



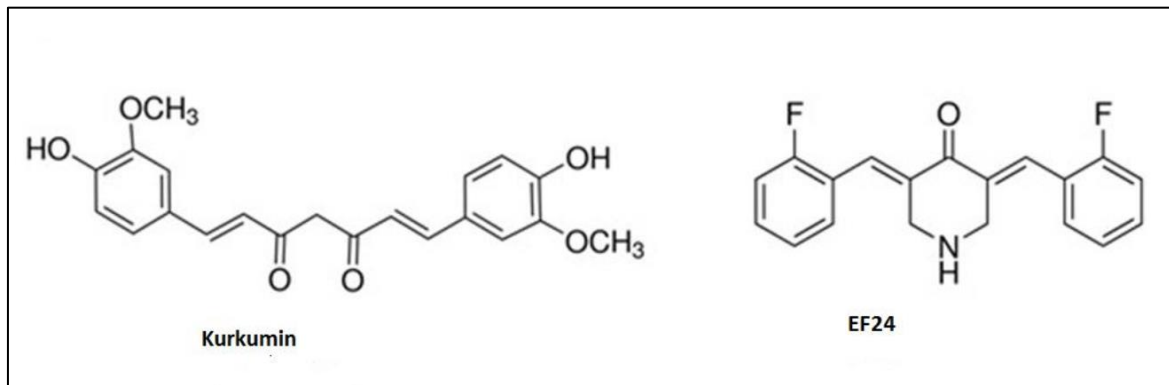
Şekil 2.5. Gempitabin metabolizması

Bu hücre içi aktivasyon yolunda; dFdC'nin, dFdCMP'ye dCK aracılı fosforilasyonu, gempitabinin aktif metabolitlerinin üretimi için hız kısıtlayıcı basamaktır [57]. Ancak, gempitabinin çoğu, sitidin deaminaz (CDA) enzimi tarafından deaminasyona uğrar ve 2',2'-diflorodeoksiüridin (dFdU) oluşur. [58]. dFdU, pirimidin nükleozid fosforilazlar için bir substrat değildir; dolayısıyla hücre içinden dışarı atılır [59]. Yapılan *in vitro* çalışmalarda CDA' nın ifade düzeyindeki artışın gempitabin direnciyle sonuçlandığı gösterilmiştir [60, 61]. Gempitabinin fosforlanmış metabolitleri, hücresel 5'-nükleotidaz (5'-NT) tarafından indirgenir. dFdCMP, deoksisitidilat deaminaz (DCTD) tarafından 2'-deoksi-2',2'-difluorouridin monofosfata dönüştürülür ve inaktif edilir (dFdUMP) [62, 63]. dFdUMP, timidilat sentaz (TS) enziminin bir substratı veya inhibitörüdür. TS, 2'-deoksiüridin-5'-monofosfatın (dUMP) DNA sentezi için gerekli bir öncü olan 2'-deoksitimidin-5'-monofosfata (dTMP) dönüşümünü katalizleyen folat bağımlı bir enzimdir. Hücre içi nükleotid havuzlarının tükenmesi, bu enzimi kanser kemoterapisinde kritik bir hedef haline getirir [64]. Gempitabin metabolizması Şekil 2.5.' de gösterilmiştir [59].

2.2.8. Fitokimyasallar ve kanser

Kemoterapide, genellikle birden fazla kemoterapötik ajan birlikte uygulanmaktadır. Ancak tedavi sırasında ortaya çıkan ya da önceden var olan ilaç dirençliliği tedavi başarısını engelleyen en önemli faktördür. Son yıllarda, tedavide kullanılan ajanların kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini arttırmak ve/veya sağlıklı dokulardaki toksik etkilerini azaltmak amacıyla kemoterapötik ajanlar ile birlikte fitokimyasallar kullanılmaktadır. En çok çalışılanlardan biri de kurkumindir.

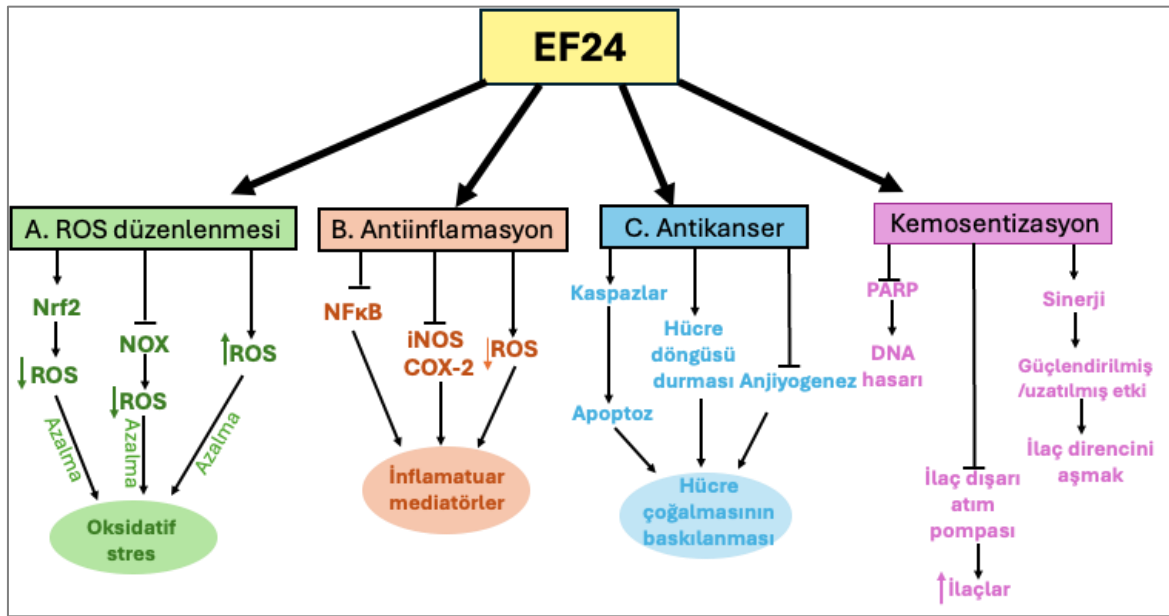
Kurkumin, çok yıllık otsu bir bitki cinsi olan *Curcuma longa* bitkisinin biyoaktif bir bileşenidir. Yapılan araştırmalar ile kurkuminin antiinflamatuvar, antikanser, antioksidan, antianjiyogenik ve tümör oluşumunu önleyici özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Kurkumin farklı proteinler ile etkileşime girdiğinden, hücre içinde farklı moleküler yolları etkileyebilmektedir [65]. Çeşitli kanserler ile yapılan *in vitro* [66-69] ve *in vivo* çalışmalarda [70-73] kurkuminin antikanser etkisi gösterilmiştir. Ancak, suda çözünürlüğünün azlığı, kimyasal kararlılığının düşüklüğü ve hücre içine alımının sınırlı olması nedenleriyle, bu çalışmaların klinik uygulamalara yansımadağı görülmüştür. Bu durumun başlıca nedeninin içerdiği β -diketon yapısı olduğu düşünülmektedir [74]. Bu molekülün biyoyararlanımını arttırmak amacıyla çeşitli analogları geliştirilmiştir ve bunlardan biri EF24 (Difenil difloroketon)'dür [75]. Kurkumin ve EF24'ün kimyasal yapıları Şekil 2.6.'da gösterilmiştir [77].



Şekil 2.6. Kurkumin ve EF24'ün kimyasal yapıları

Kurkuminle karşılaştırıldığında, EF24, kanser hücrelerinin proliferasyonunu, göçünü ve epitelyal-mezenkimal geçişini baskılayarak daha güçlü biyoaktivite gösterir [76]. Yapılan

çalışmalarda, EF24'ün hücre döngüsünün ilerlemesini durdurarak hücre büyümesini engellediği ve ardından kaspaz bağımlı apoptozu uyardığı gösterilmiştir. EF24, NFκB inhibisyonu, HIF-1α aktivitesinin baskılanması ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) düzenlenmesi gibi çeşitli yollarla kanser hücrelerinin proliferasyonunu engelleyerek veya apoptozu tetikleyerek antikanser aktivitesini göstermektedir [77]. Bununla birlikte ferroptoz, otofaji gibi apoptotik olmayan hücre ölüm yollarını uyardığı da gösterilmiştir [95, 127]. EF24'ün hücre canlılığı ve sinyal yolları üzerindeki etkileri şekil 2.7.' de özetlenmiştir [78].



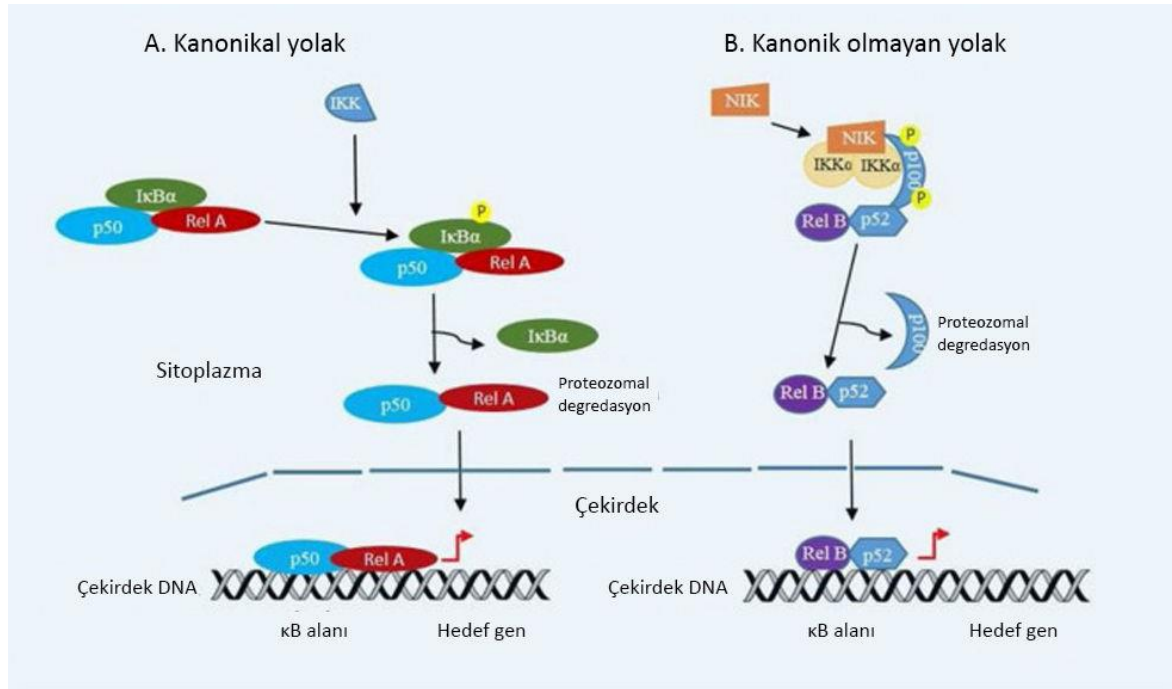
şekil 2.7. EF24'ün hücre canlılığı ve sinyal yolları üzerindeki etkilerinin özeti

Kasinski ve diğerleri, A549 akciğer kanser hücreleri ile yaptıkları çalışmada ilk defa EF24'ün güçlü bir NFκB (nüklear faktör kappa B) inhibitörü olduğunu göstermişlerdir [79].

NFκB sinyal sistemi, NFκB dimerleri, IκB (inhibitör kappa B) düzenleyicileri ve IKK (IκB Kinaz) kompleksleri arasındaki etkileşimlerle tanımlanan bir dizi uyarana cevap verir ve ligand-reseptör etkileşimi üzerine alınan özgül sinyale uygun farklı hücresel cevaplar oluşur. En çok bilinen NFκB yolları, kanonik ve kanonik olmayan yollardır. Kanonik NFκB yolağı; Tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) ve interlökin-1 (IL-1), T- ve B-hücreleri mitojenleri, bakteriyel lipopolisakkarit (LPS), viral proteinler ve fiziksel ve kimyasal stres gibi uyarılar tarafından aktive edilir. Kanonik olmayan NFκB yolunun aktivasyonu ise az sayıda TNF reseptörü süper aile üyesi aracılığıyla gerçekeştirilir [80]. Kanonikal NFκB

yolu, IKK α , IKK β ve IKK γ /NEMO'dan oluşan IKK (I κ B kinaz) kompleksinin aktivitesine bağlıdır. IKK kompleksinin aktivasyonu üzerine IKK β alt birimi, NF κ B ile ilişkili I κ B α 'yı doğrudan fosforile ederek proteazomal degradasyonuna ve p65/p50 heterodimerinin salınmasına yol açar. Serbest kalan NF κ B daha sonra çekirdeğe transloke olur ve gen transkripsiyonunu düzenler [81].

NF κ B, hücre proliferasyonu, farklılaşması, hücre döngüsü kontrolü, onkogenik aktivasyon ve metastaz ile ilgili çeşitli genleri düzenler [82, 83]. NF κ B sinyal yolağı Şekil 2.8.' de özetlenmiştir [84].

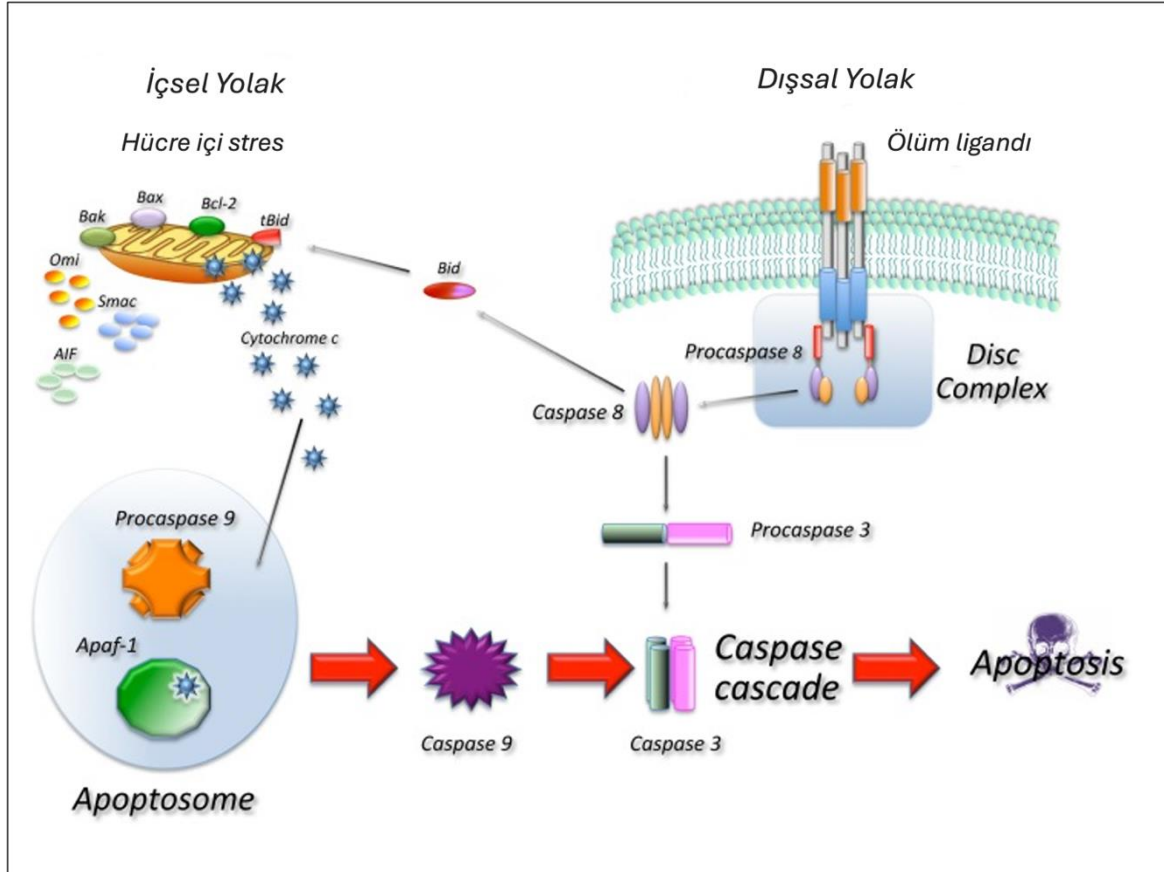


Şekil 2.8. NF κ B Sinyal Yolağı

2.2.9. Apoptoz

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü olarak bilinen, organizmaların homeostazını sağlamak ve hasarlı ya da anormal hücreleri ortadan kaldırmak için kullanılan kontrollü bir hücresel mekanizmadır. Apoptoz, hücre büyümesi ve ölümünün dengelenmesinde kritik bir rol oynar. Embriyogenez, morfogenez, normal doku yenilenmesi, hücresel bağışıklık gibi birçok fizyolojik işlemle ilişkilidir ve hücresel veya dış kaynaklı birçok uyarı ile tetiklenir. Hücre ölümü sırasında morfolojik olarak hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi değişiklikler gerçekleşir [85, 86]. Apoptoz, iki ana

yolak üzerinden gerçekleşir: dışsal (ölüm reseptörü) yolu ve içsel (mitokondriyal yol). Bu süreçlerde, sistein bağımlı aspartat-spesifik proteazlardan oluşan kaspaz ailesi kritik bir rol oynamaktadır. Dışsal yol, hücre zarında bulunan ölüm reseptörleri (örneğin, Fas (CD95/Apo1), tümör nekroz faktörü reseptörleri (TNFR'ler) ve TNF ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand reseptörleri (TRAILR'ler) ile ölüm ligandlarının etkileşimi sonucu aktive edilir. Ölüm sinyallerinin bağlanması, reseptörlerin trimerik bir yapı oluşturmaya yol açar. Bu trimerleşmiş reseptör, adaptör moleküller ve prokaspaz-8 ile birleşerek Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi (DISC) olarak bilinen bir yapı oluşturur. DISC içerisinde, prokaspaz-8 aktifleşerek kaspaz-8'e dönüşür ve doğrudan kaspaz-3'ü kesip aktive eder. Aktive olan kaspaz-3, apoptoz yolundaki diğer kaspazları uyararak apoptoz sürecini başlatır [87]. İçsel apoptoz yolu, Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenir ve bu aile, Bcl-2 homoloji (BH) bölgeleri olarak bilinen dört ortak bölgeye (BH1-BH4) sahiptir. Üyeleri, sadece BH3 bölgesine sahip proapoptotik proteinler (Bad, Bid, Bik, Bim, Hrk, Noxa ve Puma), birden fazla BH bölgesi içeren proapoptotik proteinler (Bax ve Bak) ve antiapoptotik proteinler (Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-W, Bfl-1 ve MCL-1) olarak sınıflandırılır [88]. Büyüme faktörlerinin eksikliği, DNA hasarı, hipoksi, oksidanlar, radyasyon, anti-kanser ilaçlar ve hücre içi Ca^{+2} artışı, Bcl-2 ailesini apoptoz için uyaran faktörlerdir [89, 90]. Apoptotik uyarı alındıktan sonra sadece BH-3 proteinleri aracılığıyla, antiapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinin inhibisyonu proapoptotik proteinler Bax ve Bak'ın aktive olur ve mitokondri dışıya geçirgenliği artar [88]. Bunun sonucunda membranlar arası alandan sitoplazmaya salınan sitokrom C, sitozolik protein Apaf I' e bağlanır ve onu aktive eder. Bu yapıya ATP' nin katılmasıyla apoptozom kompleksi oluşur. Bu kompleks inaktif prokaspaz 9' un aktif kaspaz 9'a dönüşmesine ve kaspaz-3 gibi diğer efektör kaspazların aktivasyonuna yol açar [91]. Apoptozun içsel ve dışsal yolları Şekil 2.9. da özet olarak gösterilmiştir [92].



Şekil 2.9. Apoptoza yol açan ana moleküler yolların şematik gösterimi

Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasının sebeplerinden biri de apoptoz mekanizmasındaki bozulmalardır. Özellikle antiapoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu veya proapoptotik proteinlerin baskılanması kanser gelişiminde önemli bir rol oynar. Apoptozun inhibisyonu, hücrelerin kemoterapi ve radyoterapi gibi tedavilere karşı direnç kazanmasına neden olur. Bu nedenle, apoptozun yeniden aktive edilmesi veya apoptotik yolların hedeflenmesi, kanser tedavisinde önemli bir strateji olarak değerlendirilmektedir [93].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. A549 hücre hattı

A549 hücre hattı; ilk olarak 1972 yılında Giard ve diğerleri tarafından, 58 yaşındaki bir Kafkasyalı erkekten alınan kanserli akciğer dokusunun çıkarılıp immortal hale getirilmesiyle geliştirilmiştir. Bu hücreler, insan alveolar bazal epitelyal hücreleridir [94].

3.1.2. Kullanılan cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (DanLaf)
- Cedex XS Analyzer otomatik hücre sayım cihazı (Roche)
- Çalkalayıcı (Biosan 3D mini shaker)
- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo)
- Derin dondurucu, -20°C (Sanyo)
- Hassas terazi (Precisa)
- Homojenizatör (IKA)
- Invert mikroskop (Zeiss)
- Işık Mikroskobu (Olympus, BX51)
- Karbondioksitli Etüv (Sanyo)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan)
- Mikropipetler, 10 µL, 100 µL, 1000 µL (Omnipette)
- Mikroplaka okuyucu (Spectramax M5, Molecular Devices)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Soğutmasız santrifüj (Heraeus Labofuge 200)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R)
- Spin vorteks (Biosan)

3.1.3. Kullanılan sarf malzemeler

- Hücre dondurma ampülü (Nest Scientific)
- Hücre kültür flaskları, 25 cm² ve 75 cm² (Nest Scientific)

- Hücre sayımı için tek kullanımlık slayt (Ibidi)
- Kaliper (Vernier)
- 1.5, 2 ml mikrosantrifüj tüpleri (Nest Scientific)
- Petri kabı, 60mm ve 100mm (Orange Scientific)
- 10, 100, 1000 mL'lik mikropipet uçları (Nest Scientific)
- Plaka, 96 kuyulu (Nest Scientific)
- 15 ve 50 mL santrifüj tüpleri (Nest Scientific)
- Steril 1 mL İnsülin Enjektörü (Beybi)

3.1.4. Kullanılan kimyasal malzemeler

- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck)
- EF-24 (Ambeed)
- Etanol (Sigma)
- Fetal sıgır serum (FBS) (Capricorn Scientific)
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (1X PBS) (Capricorn Scientific)
- Gemsitabin (MedChemExpress)
- High Glukoz DMEM Besiyeri (Capricorn Scientific)
- Karboksimetilselüloz (CMC) (Sigma)
- MTT (Thermo)
- Penisilin/Streptomisin (Capricorn Scientific)
- Tripan mavisi boyası (Sigma)
- Tripsin (Capricorn Scientific)

3.1.5. Kullanılan kitler

- BCA Protein Assay Kit (Takara)
- Caspase 3 Activity Assay Kit (Elabscience)
- NFκB p65 (pS536) + NFκB p65 Total Simple Step Elisa Kit (Abcam)

3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

- a) %1 FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanışı; 495 mL High Glukoz Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri içerisine 5 mL Fetal Bovine serum (FBS) eklenip, antibiyotiklerle (penisilin (100 IU/mL) ve streptomisin (100 µg/mL)) desteklenerek, FBS oranı %1 olan DMEM besiyeri hazırlandı.
- b) %10 FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanışı; 450 mL DMEM besiyeri içerisine 50 mL FBS eklenip, antibiyotiklerle (penisilin (100 IU/mL) ve streptomisin (100 µg/mL)) desteklenerek, FBS oranı %10 olan DMEM besiyeri hazırlandı.
- c) MTT karışımının hazırlanması; MTT hazırlamak için toz formundaki 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür konsantrasyonu 5 mg/mL olacak şekilde tartılarak, PBS içerisinde çözüldü. Hazırlanan çözelti, por çapı 0,22 µm olan filtreden geçirildi. Çözelti kullanım öncesi taze hazırlandı.
- d) 32 mM EF24 stok çözeltisinin hazırlanması; 5 mg EF24 tartılıp 803 µL DMSO içerisinde çözülüp hazırlanarak kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Hazırlanan stok çözelti seyreltilip çeşitli konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı.
- e) 1 mM Gempitabin stok çözeltisinin hazırlanması; 0,5 mg gempitabin tartılıp 605,3 µL DMSO içerisinde çözüldü. Stok çözelti kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı. Hazırlanan stok çözelti seyreltilip çeşitli konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı.
- f) 60 mg/mL EF24 stok çözeltisinin hazırlanması; 12 mg EF24 tartılıp 2 mL DMSO içerisinde çözüldü. Elde edilen stok çözelti 500 µL' lik tüplere dağıtılarak -20°C'de saklandı.
- g) 7,6 mg/mL Gempitabin stok çözeltisinin hazırlanması; 38 mg gempitabin tartılıp 5 mL PBS içerisinde çözüldü. Elde edilen stok çözelti 500 µL' lik tüplere dağıtılarak -20°C'de saklandı.
- h) %0,05 Karboksimetilselüloz (CMC) hazırlanışı; 0,25 gr CMC tartıldı, 50 mL distile su içerisinde çözüldü. Elde edilen stok çözelti oda ısısında saklandı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hücre kültürü

Bu tez çalışmasında kullanılan A549 insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücreleri, %10 FBS ve %1 antibiyotiklerle (100 unit/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin)

zenginleştirilmiş glutamin ve yüksek glikoz içeren DMEM besiyerinde, %95 nem ve %5 CO₂ bulunan bir ortamda, 37°C'de çoğaltıldı. Hücre sayımı, Tripan mavisi çözeltisi kullanılarak Cedex XS Analyzer cihazıyla gerçekleştirildi.

3.3.2. Hücre canlılığının belirlenmesi

Hücre canlılığı MTT yöntemi ile belirlendi. EF24 (0.5–32 µM) ve gemsitabin (5-100 µM) farklı konsantrasyonlarda tek başlarına ve birlikte 24 ve 48 saat süresince A549 hücrelerine uygulandı. Hücreler çoğaltıldıktan sonra otomatik hücre sayım cihazı Cedex XS Analyzer ile hücrelerin sayımı yapıldı.

A549 hücreleri %1 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde homojen bir şekilde dağıtıldıktan sonra, 96 kuyulu hücre kültür kaplarına her kuyuya 7.500/100 µL hücre olacak şekilde ekildi. 37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra, EF24 ve gemsitabinin stok solüsyonları %10 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanıp tek başlarına ve birlikte uygulanarak 24 ve 48 saat süreyle 37°C'de %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. DMSO'da çözölen EF24'ün en yüksek konsantrasyonunda, DMSO oranının %0,1' in altında olması sağlanmıştır. İnkübasyon sürelerinin sonunda kuyularda bulunan besiyeri uzaklaştırıldı. Her bir kuyuya 90 µl %10 FBS içeren DMEM besiyeri ve stok MTT çözeltisinden 10 µL eklendi. Hücreler 3 saat 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırıldı. Her bir kuyuya 100 µL DMSO eklenerek canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerinin çözünmesi sağlandı. 96 kuyulu hücre kültür plakası 570 nm dalga boyundaki absorbands değerlerinin belirlenmesi için mikroparka okuyucusuna (Spectramax M5 plate reader) yerleştirildi. Her bir konsantrasyon için deney 6 tekrarlı yapıldı ve her konsantrasyon için ortalama absorbands değerleri hesaplandı. Ajanlarla muamele edilmeyen kontrol hücrelerinin canlılığı (EF24 için DMSO kontrol, gemsitabin için PBS kontrol) %100 olarak kabul edildi. Ajanların uygulandığı hücrelerden elde edilen absorbands değerleri kontrol hücrelerine oranlanarak hücre canlılığı yüzde olarak belirlendi.

3.3.3. Hücre göçü (*in vitro* yara iyileşme deneyi)

Kullanılan ajanların seçilen konsantrasyonlarının [8 µM EF24 ve 10 µM gemsitabin] tek başlarına ve birlikte uygulamalarının hücrelerin göç etme potansiyeline olan etkisi

değerlendirmek için yara iyileşme deneyi yapıldı. Bunun için, hücreler 6 kuyulu plakalara %1 FBS içeren DMEM besiyeri ile ekildi, 24 saat 37°C’de ve %5 CO₂ içeren etüv’de inkübasyona bırakıldı. 200 µL’lik steril pipet ucu kullanılarak hücrelerde yara (çizik) oluşturulup, ayrılan hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için 3 kez PBS ile yıkandı. Hücreler inkübatöre geri yerleştirilmeden önce 0. saatte fotoğraflandı. Hücre ekiminde kullanılan besiyeri, serum içermeyen 2 mL yeni besiyeri ile değiştirildi ve kullanılan ajanların seçilen konsantrasyonları tek başlarına ve birlikte hücrelere uygulandı. Kontrol hücrelerinin ise besiyeri değişimi yapıldı, yaranın kapanması incelendi. Çizik oluşturulan alan 24. ve 48. saatlerde yeniden fotoğraflandı. Fotoğraflar ImageJ programı ile analiz edildi. Hücrelerin % göç oranları şu formüle göre hesaplandı: % alan kapanma oranı = [(0.saat hasar alanı – 24.saat hasar alanı) / 0. saat hasar alanı] X100.

3.3.4. *In vivo* A549 ksenograft fare modelinin oluşturulması

Bu tez çalışmasında *in vivo* ksenograft akciğer kanseri modelini oluşturmak için A549 insan akciğer kanseri hücre hattı kullanıldı. Çalışmada, 20 adet, 6-8 haftalık, 28-30 gram ağırlığında, erkek, Nude CD-1 fareler kullanıldı. Çalışmanın bu kısmının immün sistemi baskılanmış deney hayvanları ile patojenden arındırılmış ortamda yapılması gerektiğinden bu aşama Kobay A.Ş’ de gerçekleştirildi. Bunun için Kobay D.H.L A.Ş. Yerel Etik Kurulu’ndan etik kurul izni alındı (Onay No: 623).

%10 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde *in vitro* olarak çoğaltılan A549 hücreleri (1x10⁶/0,2 ml) PBS içinde subkutan (s.c.) olarak farelere enjekte edildi. Enjeksiyonun ardından sağlık durumlarının ve tümör oluşumunun kontrolü için fareler gūnaşırı izlendi. Tümör hacimleri 80-100 mm³’e ulaştığında fareler 5 gruba (2 sham grubu ve 3 tedavi grubu olacak şekilde gruplar düzenlendi.) ayrılarak (toplam n:20, her grup 4 fare) tedaviye başlandı. Deney grupları aşağıda belirtilmiştir:

Gruplar;

Grup I; (Sham I, PBS) 21 gün boyunca haftada 2 kez 25 mg/kg gemitabinin fareye uygulandığı hacme eşit PBS intraperitoneal (i.p).

Grup II; (Sham II; DMSO) 21 gün boyunca her gün %1’lik DMSO 100 µL hacimde, i.p.

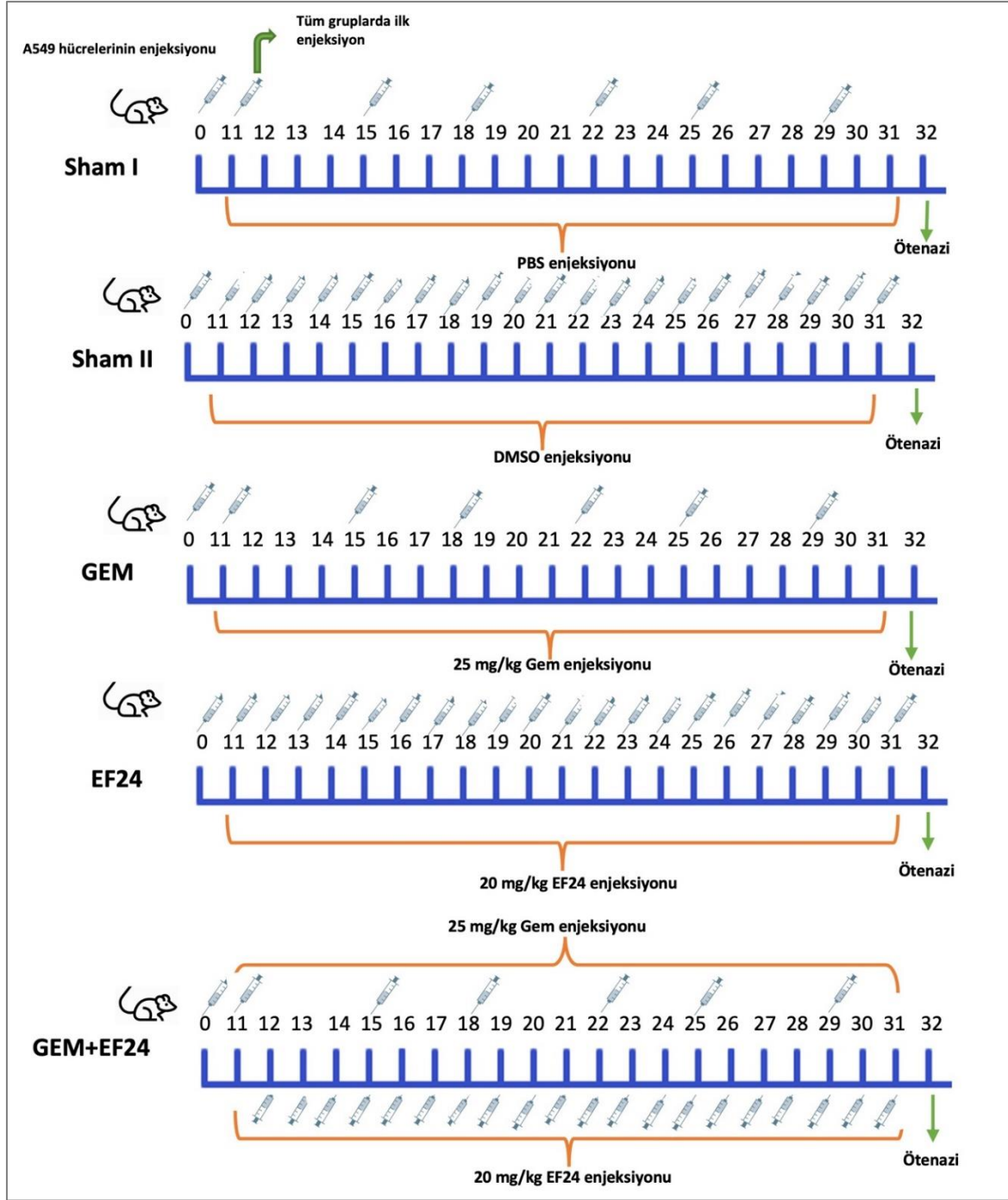
Grup III; Gempitabin uygulanan grup. 21 gn boyunca haftada 2 kez 25 mg/kg, 100 µL hacimde, i.p

Grup IV; EF24 uygulanan grup. 21 gn boyunca her gn 20 mg/kg EF24 100 µL hacimde i.p

Grup V; Gempitabin+EF24 uygulanan grup. 21 gn boyunca haftada 2 kez 25 mg/kg gempitabin ve her gn 20 mg/kg EF24 100 µL hacimde i.p.

Çalışmamızda kullanılan EF24 DMSO'da, gempitabin ise PBS'de çözndğ için ajanların uygulanış şekilleri aynı olmasına karşın farklı çzcler kullanılması nedeniyle çalışmamızda 2 sham grubu kullanılmıştır. Şekil 3.1'de *in vivo* A549 ksenograft deneysel fare modeli ve deneyin akış şeması gösterilmiştir.

Uygulanan ajanların dozları ve uygulama sıklığı, literatr taramalarına gre belirlenmiştir. Chang ve diğrleri oluşturdıkları A549 ksenograft fare modelinde, grupları EF24'n farklı dozlarıyla (5, 10, 20 mg/kg) tedavi etmiş ve 20 mg/kg doz uygulanan grupta nekroz lezyonlarının oluştüğnı tespit etmişlerdir [95]. Benzer şekilde Liu ve diğrleri, oluşturdıkları Hepa1-6 fare modelini 20 mg/kg EF24 ile 21 gn boyunca tedavi etmişlerdir [87]. Çalışmamızın *in vivo* kısmında oluşturdüğmız A549 ksenograft fare modeline uygulanan EF24 dozu ve sresi bu çalışmalar referans alınarak, gempitabin dozu ise Iwanski ve diğrlerinin çalışmaları esas alınarak belirlenmiştir [96].



Şekil 3.1. *In vivo* A549 ksenograft deneysel fare modeli ve deneyin akış şeması

Tümör hacimleri 80-100 mm³'e ulaştığında ilaç uygulamalarına başlanmıştır. EF24 her gün, gempitabin haftada 2 kez intraperitoneal enjeksiyonla tedavi gruplarına uygulanmıştır. İlaç uygulamaları 100 µL' lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir.

Tümör büyüklüğü her hafta kaliper ile ölçülüp, tümör hacmi standart formül ile hesaplandı: (genişlik² X uzunluk) / 2 [97]. 21 günlük tedavinin sonunda, hayvanlara derin anestezi altında

intrakardiyak kan alma yöntemi ile ötenazi uygulandı. Ötenazi sonrası hayvanlardan tümör dokularının yanı sıra karaciğer, akciğer, böbrek, beyin, dalak, kalp dokuları ve kalp kanı da alındı. Hayvanlardan alınan dokular steril distile su ile yıkandıktan sonra tümör dokularının bir kısmı DNaz ve RNaz içermeyen 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak -80°C derin dondurucuya konulup moleküler analizlerin yapılacağı güne kadar muhafaza edildi. Tümör dokularının bir kısmı histopatolojik inceleme için %10' luk formaldehite alındı ve hematoxilen-eozin boyaması yapılarak incelendi.



(a) A549 hücrelerinin fareye enjeksiyonu



(b) Farede tümör oluşumu



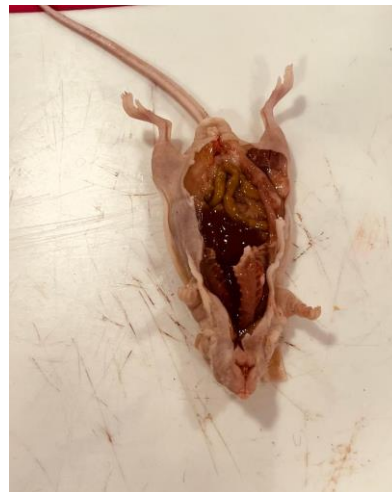
(c) Tümör büyüklüğünün ölçümü



(d) İlaç enjeksiyonu



(f) Tümör rezeksiyonu



(g) Diğer dokuların alınması

Resim 3.1. *In vivo* A549 ksenograft fare modeli deney aşamaları

3.3.5. Tümör dokularından protein eldesi

50 mg tümör dokusu tartılıp mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine kaspaz-3 aktivite tayin kiti içinde bulunan 200 µL lizis buffer eklendi ve buz üzerinde dokular homojenize edildi. Homojenize hale gelen ekstrakt 12.000 rpm’de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatant ayrı bir tüpe alınarak protein miktar tayini için kullanıldı.

3.3.6. Tümör dokularında protein miktarının belirlenmesi

Tümör dokusundan elde edilen total protein miktarlarının belirlenmesi için BCA Protein Assay kiti kullanıldı. Kitin içerisinde bulunan konsantrasyonu bilinen sığır serum albümininden (BSA) seyreltmeler uygulandı. Standartlar ve protein örnekleri, 562 nm’ de mikrolaka okuyucuda (Spectramax M5 plate reader, Molecular Devices) absorbans değerleri ölçülerek standart eğri oluşturuldu. Proteinlerin konsantrasyonları, standart eğri kullanılarak hesaplandı.

3.3.7. Tümör dokularında kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi

EF24 ve gemsitabinin ayrı ayrı ve birlikte uygulamalarının deneysel akciğer kanseri fare modelinde apoptotik yolak üzerindeki etkileri incelendi. Tümör doku örneklerinde kaspaz-3 aktivitesini belirlemek için kolorimetrik kaspaz-3 kiti kullanıldı. Kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi, kit içeriğinde bulunan protokolün uygulanması ile gerçekleştirildi. Absorbans değerleri 405 nm’ de mikrolaka okuyucu kullanılarak belirlendi.

3.3.8. Tümör dokularında total NFκB p65 ve fosforile NFκB P65 (pS536) protein konsantrasyonlarının karşılaştırılması

NF kappa B (NFκB) düzeyinin tespiti için NFκB p65 (pS536) + NFκB p65 total simplestep Elisa (Abcam) kiti kullanıldı. Kit protokolüne uygun şekilde doku lizatları ve pozitif kontrol çözeltileri hazırlandı. Kuyulara 50 µL doku lizatı ya da kontrol çözeltisi eklenmiş, ardından 50 µL antikor kokteyli ilave edildi. Numuneler oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kuyulardaki sıvılar tamamen uzaklaştırıldı ve her kuyu üç kez 350 µL 1X Wash Buffer PT ile yıkandı. Daha sonra kuyulara 100 µL TMB Substrat çözeltisi eklenmiş ve 15 dakika inkübe edildi. Sürenin sonunda 100 µL durdurma solüsyonu

eklenerek reaksiyon sonlandırıldı ve 450 nm dalga boyunda absorbans değerleri mikropilaya okuyucusunda ölçüldü.

3.3.9. Tümör dokularında Malondialdehid (MDA) düzeyinin belirlenmesi

MDA tayini, Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. Van Ye TM ve diğerlerinin (1993), metoduna göre çalışıldı [98]. Numune tüplerine fosfat tamponu, etanol, tiyobarbitürük asit (TBA), trikloroasetik asit (TCA) ve numune eklendi. Numune körü ve standart körü tüplerine ise TBA hariç diğer reaktifler eklendi. Standart tüpüne fosfat tamponu, TBA, TCA ve etanol eklenerek 30 dakika kaynar su banyosunda (85-100 °C) inkübe edilmesini takiben çeşme suyu altında soğutulurak 5000 g' de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları ayrıldı. Daha sonra numune, standart kör tüplerine ve standart tüpüne TBA eklendi ve iyice karıştırılarak spektrofotometrede 532 nm' de her bir tüpün absorbansı kendi körüne karşı okundu. Sonuçlar MDA düzeyleri, 1,1,3,3-Tetraetoksi propan standardı ile oluşturulan standart grafiğin eğimi kullanılarak $\mu\text{mol MDA/mg protein biriminde}$ hesaplandı. Hesaplama şu formüle göre yapıldı: $\text{MDA (mol/L)}: \{(\text{Abs})N/(\text{Abs})St\} \times f$.

3.3.10. Tümör dokularında katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

Tümör dokusu numunelerindeki katalaz enzim aktivitesi tayini Gazi Üniversitesi Yaşam Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. Aebi metoduna göre çalışıldı [99]. Metot; katalaz enzimi ile katalizlenen $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ reaksiyonu sonucu parçalanmış H_2O_2 'nin 240 nm'deki absorbans değişiminin izlenmesi prensibine dayanır. Spektrofotometre küvetine tamponlanmış H_2O_2 çözeltisi konuldu. 240nm'de absorbans değişimi bir süre takip edildi. Absorbans değişimi durduktan sonra numune ilave edilerek karıştırıldı. Absorbans değişimi 0. ve 5. dakikalar arasında takip edildi. İlk okunan (0. dakika) absorbans kör olarak değerlendirildi. Katalaz tayini sonucu elde edilen sonuçlar protein miktarlarına bölünerek spesifik aktivite (IU/mg protein) olarak belirlendi.

3.3.11. Histopatolojik inceleme

Histopatolojik değerlendirme Bursa Uludağ Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Hayvanlardan alınan tümör dokuları parafin blokların hazırlanması ve boyama işlemleri için işleme alınmıştır. Dokular, formalin solüsyonunda

tespit edilmiştir. Tespit işleminin ardından dokular sırasıyla dereceli alkol ve ksilenden geçirilmiş, ardından parafine gömülerek bloklanmaya hazır hale getirilmiştir. Parafine alınan bu bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler hazırlanmış ve lamalar üzerine yayılmıştır. Kesitler hematoksilin-eozin ile boyanmıştır. Boyama işlemi sırasında lamalar önce 60 °C’de 2 saat bekletilmiş ardından ksilen ve farklı konsantrasyonlardaki alkol havuzlarında bekletilmiştir. Daha sonra, kesitler hematoksilinle 7 dakika boyanmış, akarsuda yıkanmış, ardından eozinde 2 dakika bekletilerek tekrar akarsuda yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kesitler ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

3.3.12. İstatistiksel analiz

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizinde “SPSS 23.0” programı kullanıldı. P değerinin <0.05 olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hücre canlılığı deney sonuçlarının analizinde Student’s t-testi uygulandı. *In vitro* yara iyileşmesi deneyinden elde edilen fotoğraflar, Image J programı kullanılarak kantitatif olarak analiz edildi. Elisa testi sonuçlarına göre gruplar arasındaki farklılıkların analizinde Mann-Whitney U testi uygulandı.

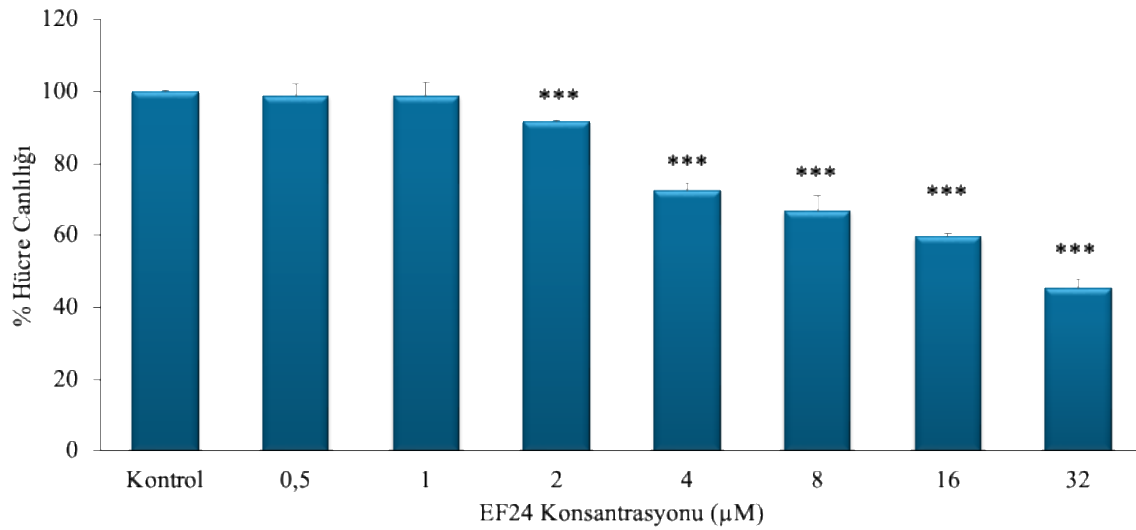
4. BULGULAR

4.1. *In vitro* Deney Bulguları

4.1.1. EF24'ün A549 hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi

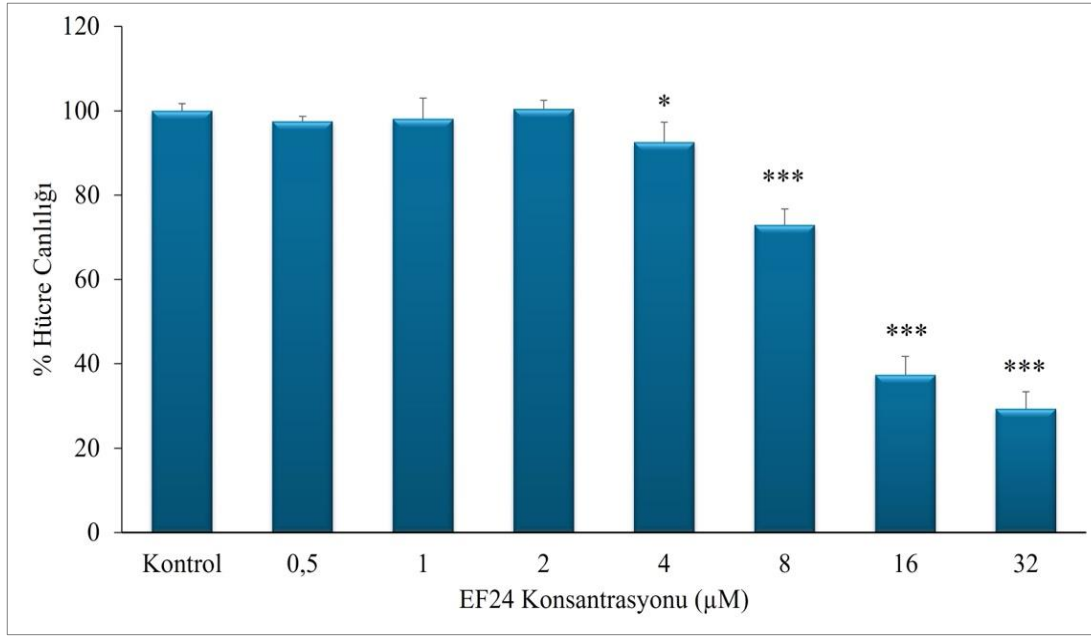
EF24'ün değişen süre ve konsantrasyon aralığında A549 hücrelerine uygulanmasının hücre canlılığına olan etkileri değerlendirildi ve istatistiksel analizleri yapıldı.

EF24 artan konsantrasyonlarda 24 saat A549 hücrelerine uygulandı. Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, 2 μ M EF24 ve üstü konsantrasyonlarda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azaldığı ve bu azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. Hücre canlılığının 0,5-1 μ M'da %99, 2 μ M'da %92, 4 μ M'da %73, 8 μ M'da %67, 16 μ M'da %60, 32 μ M'da %45 olduğu belirlendi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. EF24'ün artan konsantrasyonlarının 24 saat A549 hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrol grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri ***: $p < 0.001$

EF24 artan konsantrasyonlarda 48 saat A549 hücrelerine uygulandı. Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, 4 μ M EF24 ve üstü konsantrasyonlarda hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azaldığı ve bu azalmaların istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. Hücre canlılığının 0,5-2 μ M aralığında %97-100, 4 μ M'da %93, 8 μ M'da %73, 16 μ M'da %37, 32 μ M'da %29 olduğu belirlendi (Şekil 4.2).

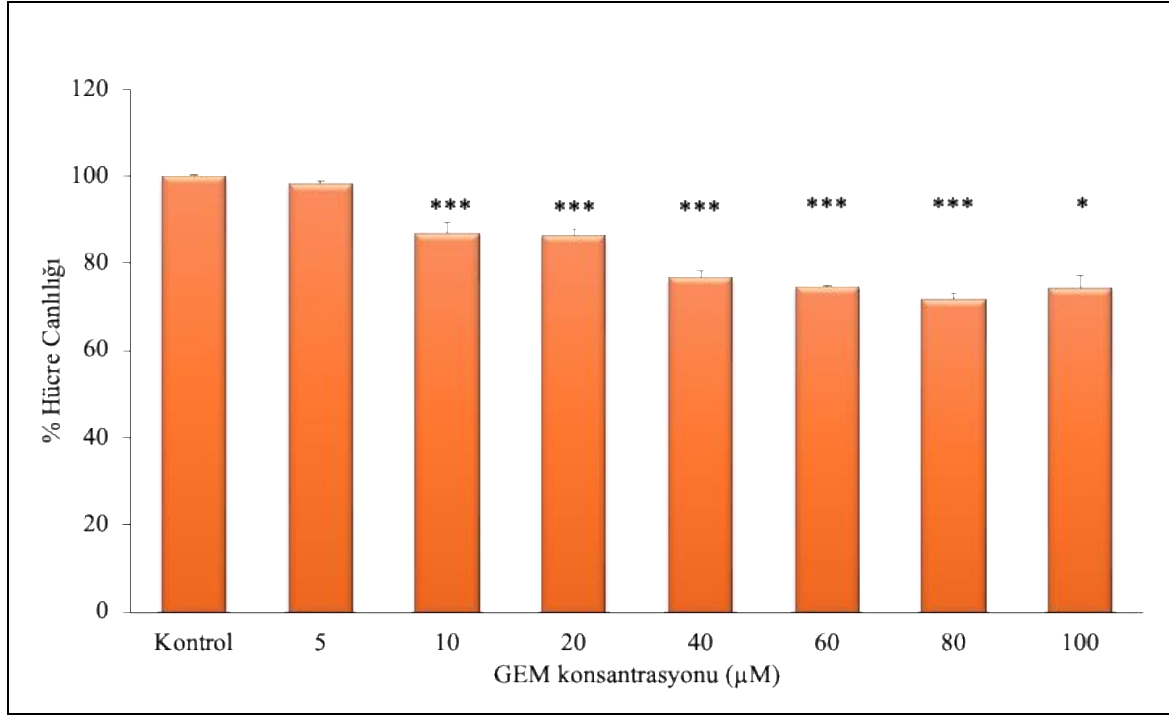


Şekil 4.2. EF24'ün artan konsantrasyonlarının 48 saat A549 hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrol grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri *: $p<0.05$, ***: $p<0.001$

4.1.2. Gemsitabinin A549 hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemiyle belirlenmesi

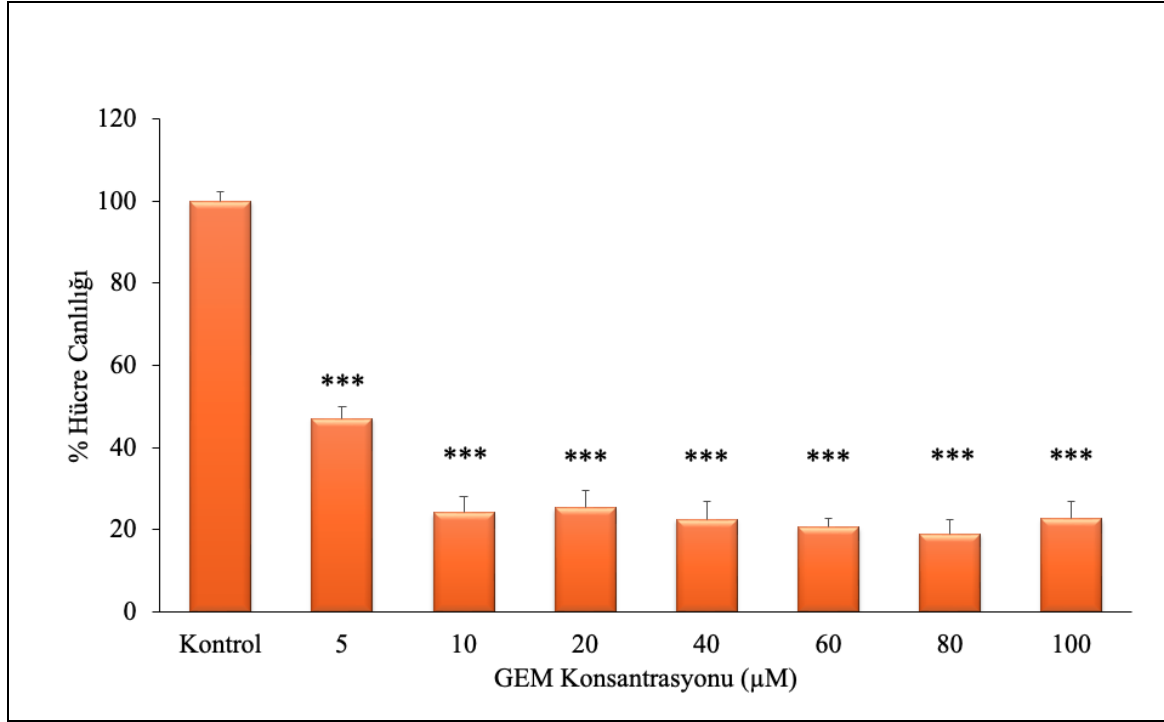
Gemsitabinin değişen süre ve konsantrasyon aralığında A549 hücrelerine uygulanmasının hücre canlılığına olan etkileri değerlendirildi ve istatistiksel analizleri yapıldı.

Gemsitabin artan konsantrasyonlarda 24 saat A549 hücrelerine uygulandı. Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, 10-100 µM gemsitabin konsantrasyonlarında hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görüldü. Hücre canlılığı, 5µM'da %98, 10µM'da %87, 20µM'da %86, 40µM'da %77, 60µM'da %75, 80µM'da %72 ve 100µM'da %74 olduğu belirlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Gemsitabinin artan konsantrasyonlarının 24 saat A549 hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrol grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri *:p<0.05, ***:p<0.001

Gemsitabin artan konsantrasyonlarda 48 saat A549 hücrelerine uygulandı. Kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, uygulanan tüm gemsitabin konsantrasyonlarında hücre canlılığının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı tespit edildi. Hücre canlılığı, 5µM’da %47, 10µM’da %24, 20µM’da %25, 40µM’da %23, 60µM’da %21, 80µM’da %19 ve 100µM’da %23 olduğu belirlendi (Şekil 4.4).

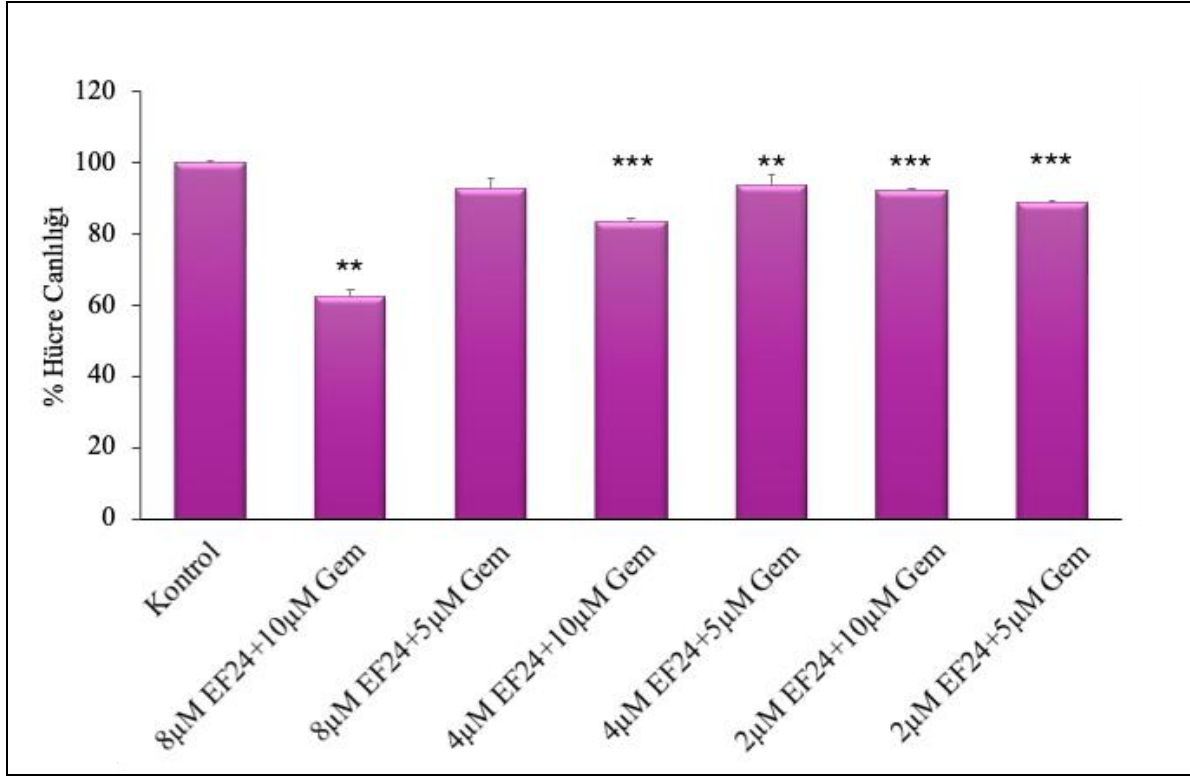


Şekil 4.4. Gemsitabinin artan konsantrasyonlarının 48 saat A549 hücrelerine uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrol grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri ***: $p < 0.001$

4.1.3. EF24 ve gemsitabinin birlikte uygulamalarının A549 hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT yöntemi ile belirlenmesi

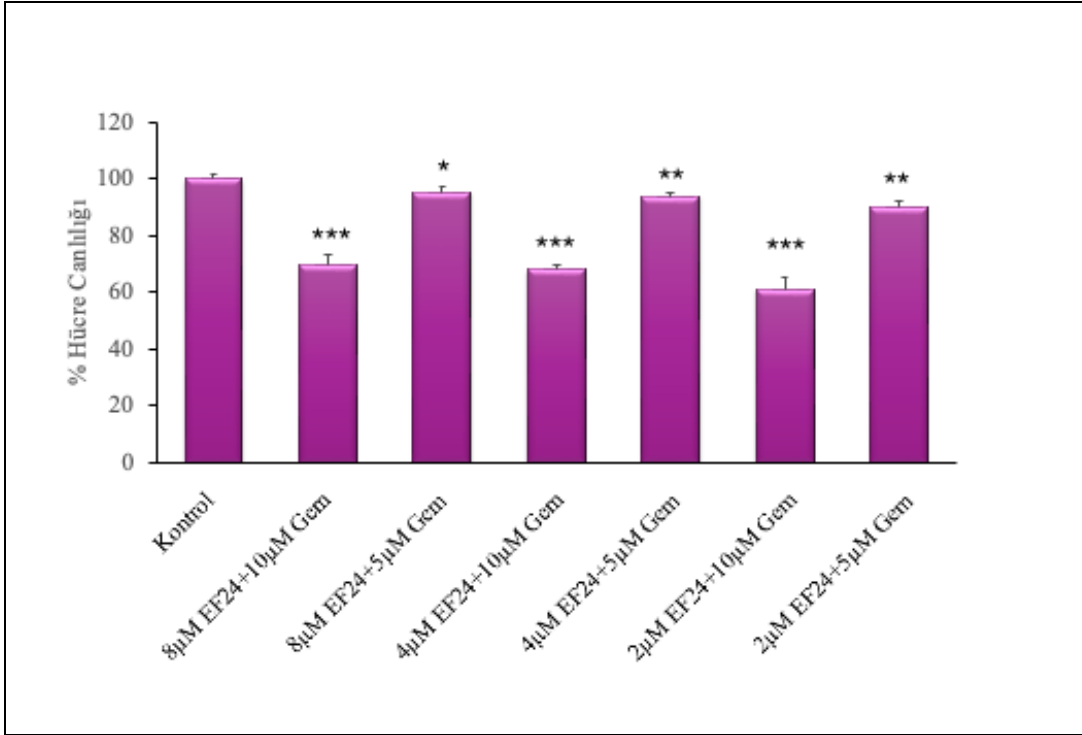
EF24 ve gemsitabinin değişen süre ve konsantrasyonlarda birlikte A549 hücrelerine uygulanmasının hücre canlılığına olan etkileri değerlendirildi ve istatistiksel analizleri yapıldı.

A549 hücrelerine tek başına uygulanan ajanların sonuçları değerlendirildikten sonra, EF24'ün 8, 4 ve 2µM, gemsitabinin 5 ve 10µM konsantrasyonları birlikte uygulama deneyleri için seçildi. A549 hücrelerine 24 saat süresince seçilen EF24 ve gemsitabin konsantrasyonları uygulandı. Hücre canlılığının 8µM EF24+10µM gemsitabinde %62, 8µM EF24+5µM gemsitabinde %93, 4µM EF24+10µM gemsitabinde %83, 4µM EF24+5µM gemsitabinde %94, 2µM EF24+10µM gemsitabinde %92, 2µM EF24+5µM gemsitabin uygulamasında ise %89 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. A549 hücrelerine EF24 ve gemsitabinin 24 saat süresince birlikte seçilen konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrol grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri **:p<0.01; ***:p<0.001

A549 hücrelerine 48 saat süresince seçilen EF24 ve gemsitabin konsantrasyonları uygulandı. Hücre canlılığının 8µM EF24+10µM gemsitabinde %70, 8µM EF24+5µM gemsitabinde %95, 4µM EF24+10µM gemsitabinde %68, 4µM EF24+5µM gemsitabinde %94, 2µM EF24+10µM gemsitabinde %61, 2µM EF24+5µM gemsitabin uygulamasında ise %90 olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.6).

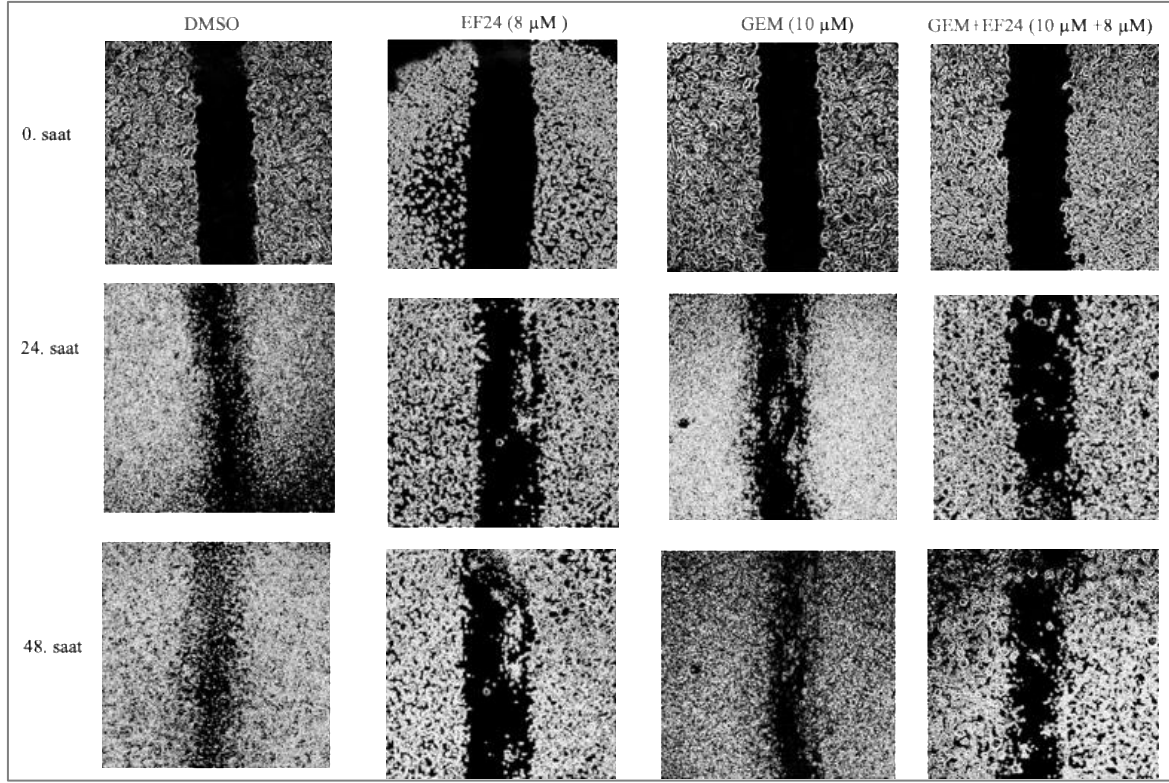


Şekil 4.6. A549 hücrelerine EF24 ve gempitabinin 48 saat süresince birlikte seçilen konsantrasyonlarda uygulanması sonucu belirlenen hücre canlılık oranları. Kontrol grubu ile karşılaştırma sonucu anlamlılık değerleri *:p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001

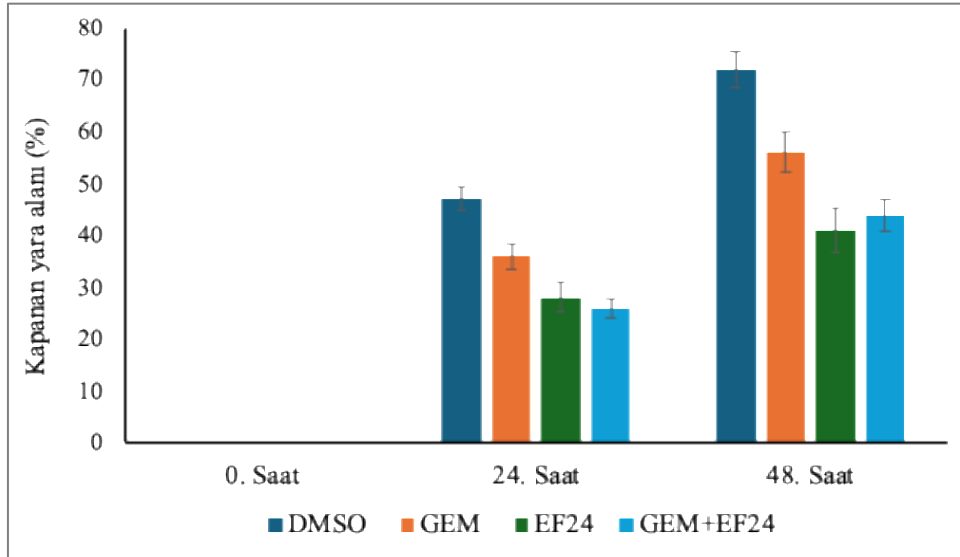
4.1.4. A549 hücrelerinde EF24 ve gempitabinin *in vitro* yara iyileşmesi üzerine olan etkilerinin belirlenmesi

EF24 ve gempitabinin seçilen konsantrasyonlarının A549 hücrelerinin göç yeteneğine etkisinin olup olmadığının belirlenmesi için *in vitro* yara iyileşmesi deneyi yapıldı. Pipet ucuyla hücrelerde yara oluşturulduktan sonra ajanlar tek başlarına ve birlikte hücrelere uygulandı. 0. saatte çekilen fotoğraftan sonra, 24 ve 48. saatlerde de aynı alanlar invert mikroskop altında fotoğraflandı. Fotoğraflar Resim 4.1' de gösterilmiştir. Hücrelerin göç yeteneği, yara oluşturulan alana hücrelerin hareketi ile değerlendirildi. Image J programı ile yapılan analizler sonucunda % yara kapanma oranları hesaplandı. % kapanma oranlarına ait sonuçlar Şekil 4.7' de gösterilmiştir.

Tek başına 8 µM EF24 uygulanan hücrelerin göç etme yeteneğinin, tek başına 10 µM GEM ve 10 µM GEM+8 µM EF24' ün birlikte uygulandığı hücreler ve DMSO uygulanan hücrelere göre azaldığı görüldü. Hücrelerin göç etme yetenekleri 24. ve 48. saatte sırasıyla: EF24 uygulanan hücrelerde %28 ve %41, DMSO kontrol grubunda %47 ve %72, GEM grubunda %36 ve %56, GEM+EF24 grubunda ise %26 ve %44 olarak hesaplandı.



Resim 4.1. Seçilen ajan konsantrasyonlarının A549 hücrelerinin göç etme yeteneği üzerine olan etkisinin yara iyileşme deneyi ile gösterilmesine ait fotoğraflar (Büyütme X 200)

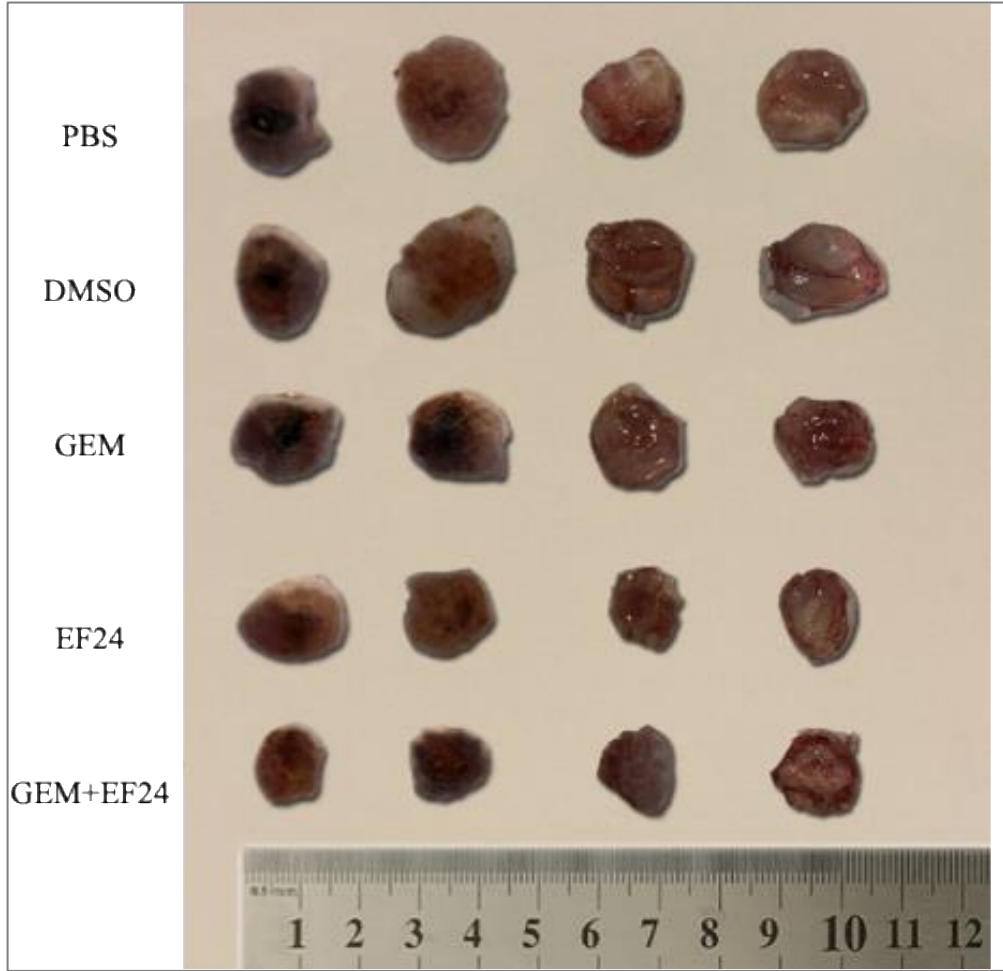


Şekil 4.7. Seçilen ajan konsantrasyonlarının A549 hücrelerindeki yara kapanma oranları

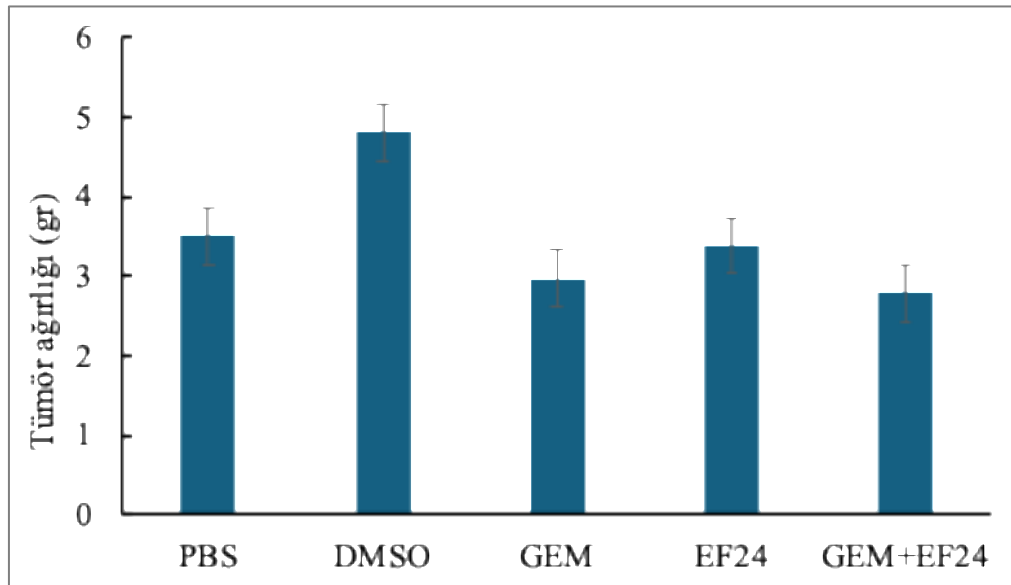
4.2. *In vivo* Bulgular

4.2.1. *In vivo* A549 ksenograft fare modelinde tedavi gruplarındaki tümör gelişiminin değerlendirilmesi

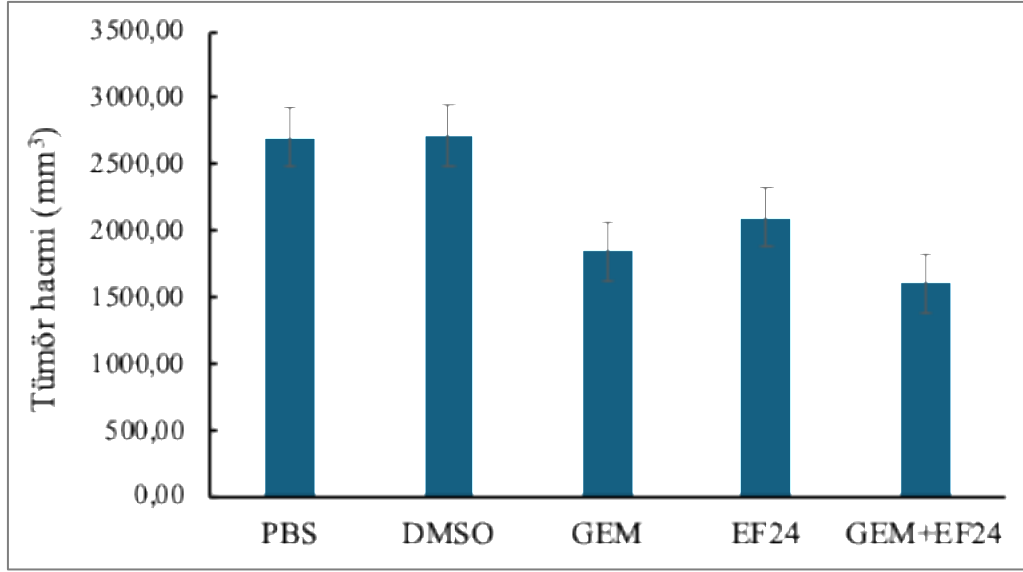
Ortalama 11 gün sonunda tümör hacimlerinin 80-100 m³'e ulaştığı belirlenen fareler 5 gruba ayrıldı ve sabit zaman çizelgesine göre 21 gün boyunca tedavi uygulandı. Tedavinin başında ve sonunda farelerin ağırlıkları ölçüldü ve bir fark gözlenmedi. Farelerden alınan kalp kanından yapılan hemogram analizi sonucunda farelerde bir enfeksiyona rastlanmadı. Her bir grupta yer alan farelerden rezekte edilen tümörlerin büyüklüklerine ait fotoğraf Şekil 4.8'de yer almaktadır. En fazla küçülmenin kombine tedavi uygulanan grupta olduğu gözlemlendi. Her gruptaki farelerden elde edilen tümör dokularının hacimleri ve ağırlıkları hesaplandı. Kombine tedavi grubundaki farelerin tümör hacim ve ağırlıklarının tekli uygulama yapılan gruplar ve Sham gruplarına göre azaldığı gözlemlendi. Ancak, yapılan istatistiksel değerlendirme, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını gösterdi ($p > 0,05$). Her bir grup için ortalama tümör ağırlık ve hacimlerini gösteren grafik Şekil 4.9 ve 4.10'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. Her fareden elde edilen tümörlerin gruplara göre görüntüleri



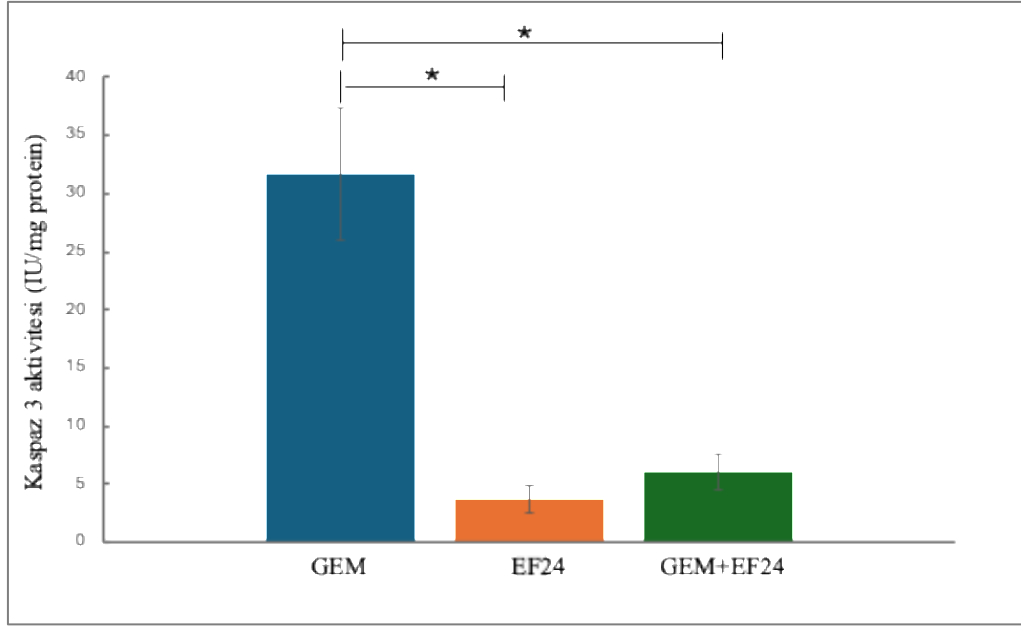
Şekil 4.9. Farelerden rezekte edilen tümör dokularının ortalama ağırlıkları ($p > 0,05$)



Şekil 4.10. Farelerden rezekte edilen tümör dokularının ortalama hacimleri ($p > 0,05$)

4.2.2. Tümör dokularında kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesi

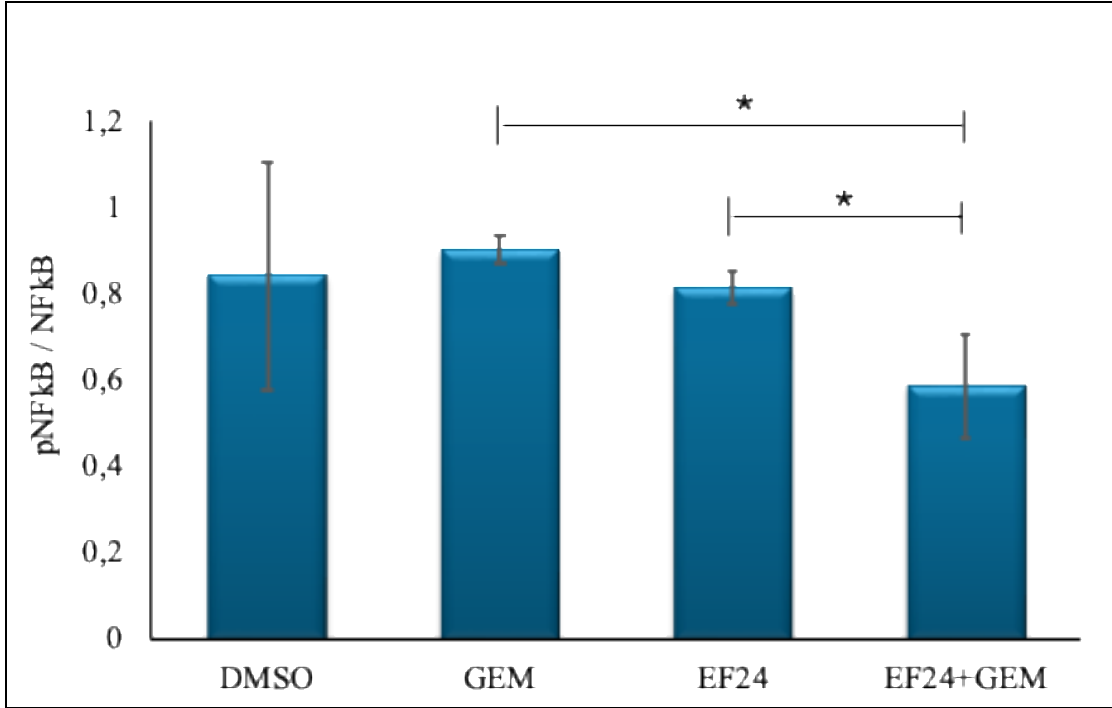
Tümör örneklerindeki kaspaz-3 aktivitesinin belirlenmesinde kolorimetrik kaspaz-3 aktivite kiti kullanıldı. En yüksek kaspaz-3 aktivitesi GEM ile tedavi edilen grupta gözlemlendi. GEM'in tek başına uygulandığı gruptaki kaspaz-3 aktivitesi, kombine tedavi grup ile karşılaştırıldığında, kombine gruptaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0,05$). Bununla birlikte, GEM' in tek başına uygulandığı gruptaki kaspaz-3 aktivitesi, EF24 tedavi grubu ile karşılaştırıldığında da EF24 grubundaki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı ($p < 0,05$). Ayrıca, EF24' ün tek başına uygulandığı grup ile kombine tedavi grubu karşılaştırıldığında, kombine grupta kaspaz-3 aktivitesinde bir artış gözlemlendi, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Tümör dokularındaki kaspaz-3 aktiviteleri (* $p<0,05$)

4.2.3. Tümör dokularında total NF κ B p65 ve fosforile NF κ B p65 (pS536) protein konsantrasyonlarının belirlenmesi

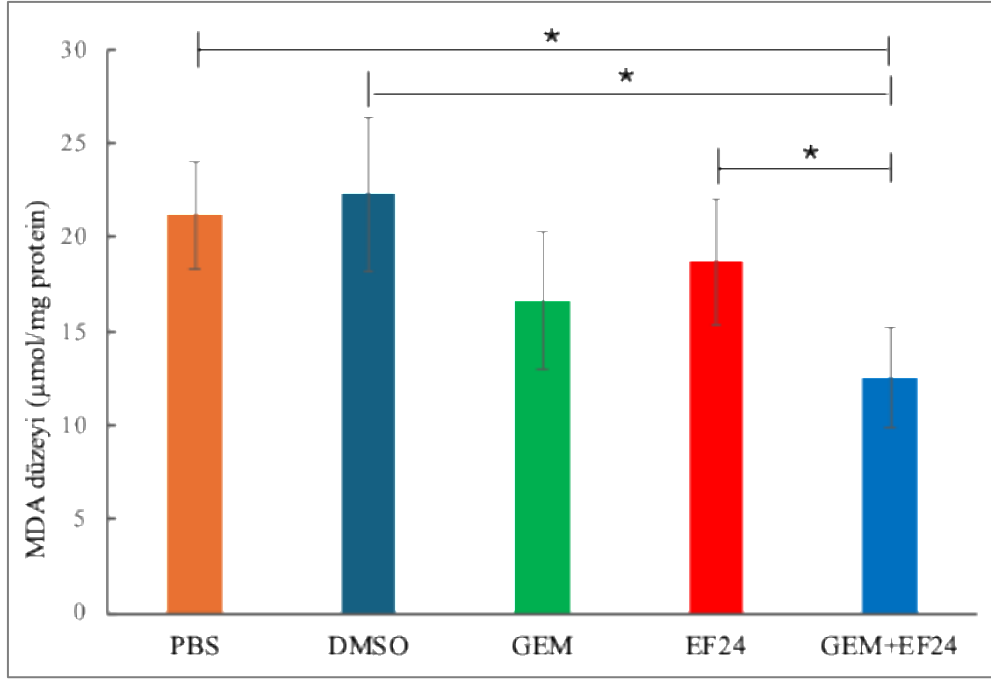
Tümör dokularındaki total NF κ B p65 ve fosforile NF κ B p65 (pS536) (pNF κ B, aktif NF κ B) protein konsantrasyonları ELISA yöntemi ile değerlendirildi. pNF κ B/NF κ B oranlarının, tek başına GEM ve tek başına EF24 ile tedavi edilen gruplarda yüksek olduğu, kombine tedavi alan grupta ise en düşük olduğu belirlendi. Ayrıca, tek başına GEM ve tek başına EF24 ile tedavi edilen gruplardaki pNF κ B/NF κ B oranları, kombine tedavi grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir azalış gösterdi ($p<0,05$). (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. Tümör dokularında belirlenen pNFκB/ NFκB protein konsantrasyonlarının oranı. (* $p<0,05$)

4.2.4. Tümör dokularında MDA düzeyinin belirlenmesi

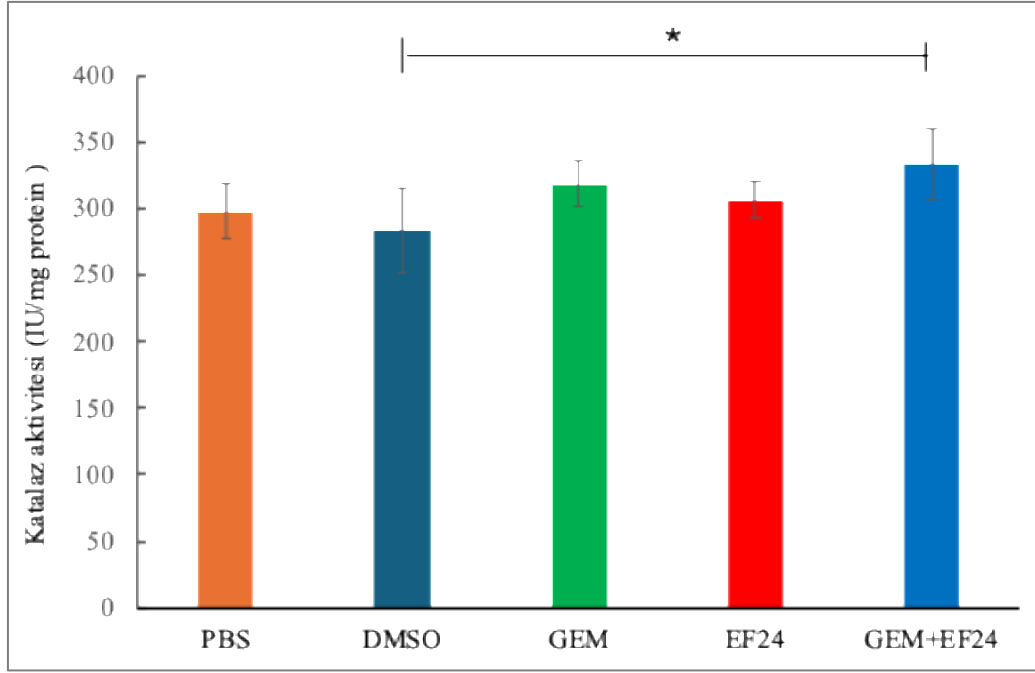
Farelerden elde edilen tümör dokularında, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeylerinin tüm gruplar içinde kontrol gruplarında (Sham I ve Sham II) yüksek, kombine grupta ise en düşük olduğu görüldü. Sham I ve Sham II gruplarındaki MDA düzeyi, kombine tedavi grubu ile karşılaştırıldığında, kombine grupta azaldığı ve bu azalışın anlamlı olduğu saptandı ($p<0,05$). EF24 grubu ve kombine grubunun MDA düzeyi sonuçları karşılaştırıldığında, kombine uygulama yapılan grupta MDA düzeyinin azaldığı ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,05$). (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Tümör dokularında belirlenen MDA düzeyleri (*p<0,05)

4.2.5. Tümör dokularında katalaz enzim aktivitesinin belirlenmesi

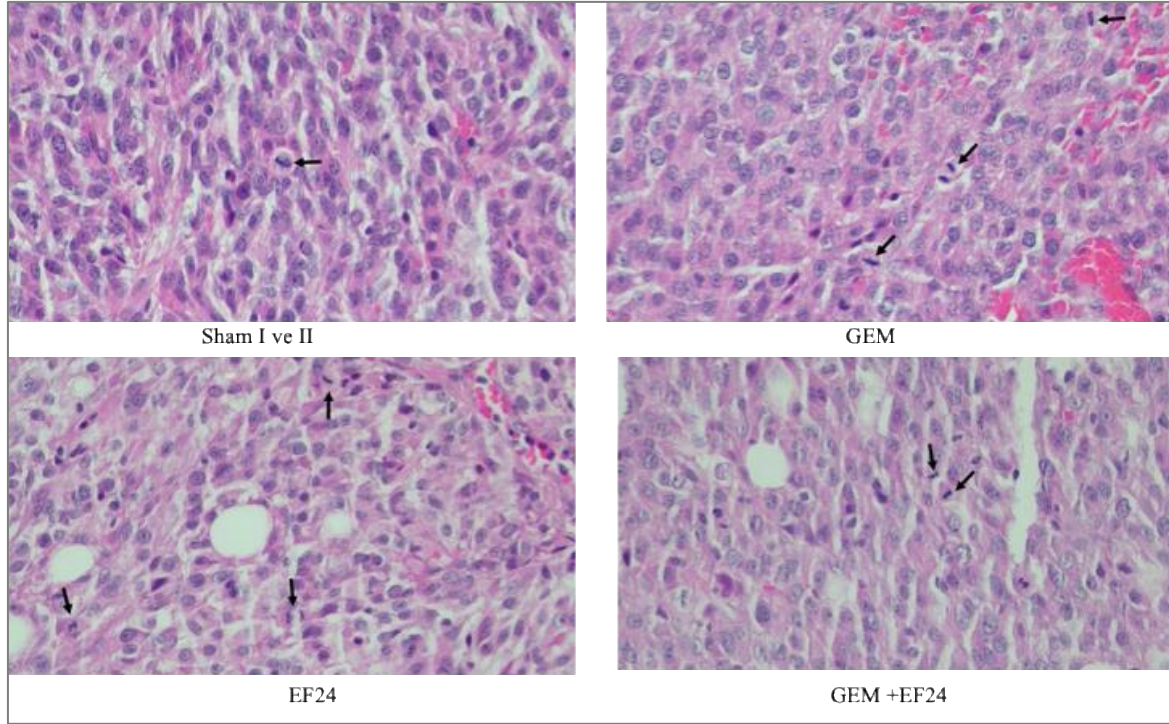
Tümör dokularında gerçekleştirilen katalaz enzim aktivite tayini sonucunda, tüm gruplar içinde en yüksek enzim aktivitesinin kombine tedavi uygulanan grupta olduğu görüldü. Sham II grubu ile karşılaştırıldığında enzim aktivitesindeki bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi (p<0,05). (Şekil 4.14.)



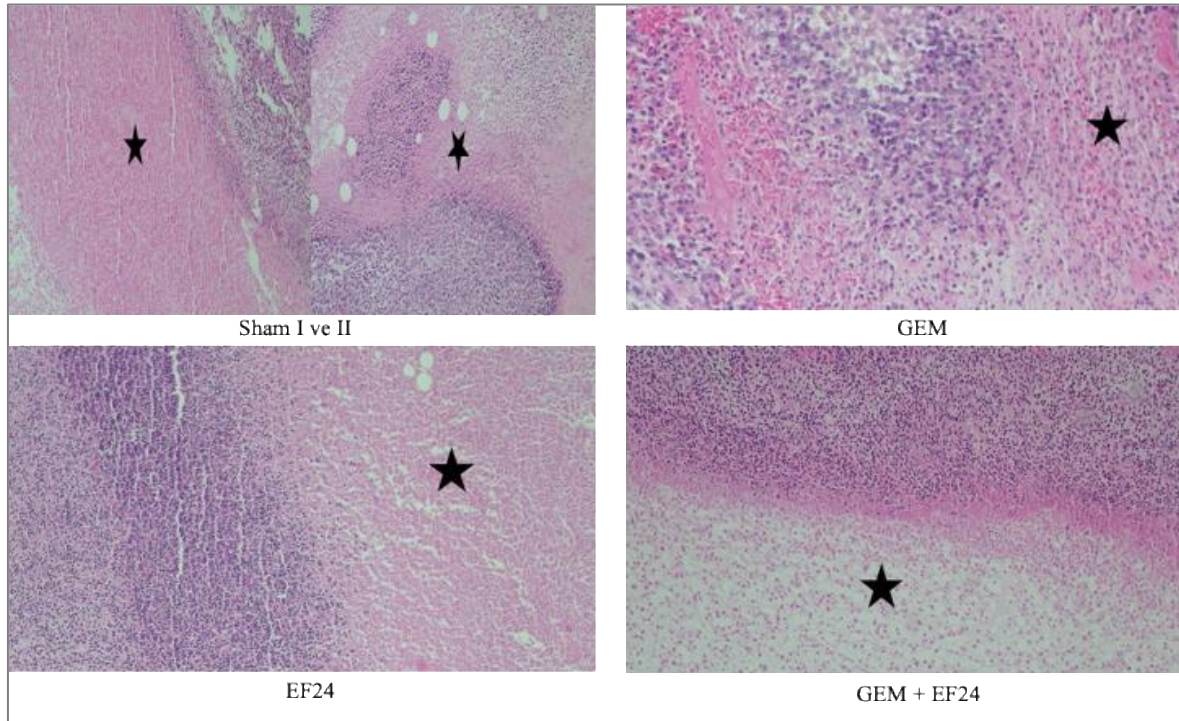
Şekil 4.14. Tümör dokularında belirlenen katalaz enzim aktivitesi (* $p < 0,05$)

4.2.6. Histopatolojik değerlendirmeler

Tümör dokularının incelenmesi hematoksilen-eozin yöntemi ile yapılmıştır. İnceleme sonucunda tümör hücrelerinin; mekik şekilli, pembe sitoplazmalı, yuvarlak-oval şekilli veziküler çekirdeklere, çok sayıda belirgin çekirdekçiklere sahip olduğu görüldü. Tümöral hücrelerde belirgin pleomorfizm ve çekirdek boyutlarında belirgin farklılık (anizonükleozis) gözlemlendi. Mitotik aktiviteler incelenen alanlardaki mitoz bölünme görülen hücre sayılarına göre skorlanmıştır. Farklı gruplardan alınan tümör doku kesitlerinde mitoz Resim 4.2 ve gösterilmiştir. Tümörlerdeki nekroz oranları da belirlenmiştir. Nekroz alanları Resim 4.3’ de gösterilmiştir. Sham gruplarında ortalama %32,5, GEM grubu %11,25, EF24 grubu %31,25, GEM+EF24 grubunda %27,5 olarak hesaplanmıştır.



Resim 4.2. Farklı gruplardan alınan tümör doku kesitlerinde mitozun gösterilmesi. (H&E, büyütme X400) (oklar mitoz bölünmeyi göstermektedir)



Resim 4.3. Farklı gruplardan alınan tümör doku kesitlerinde nekrozun gösterilmesi. (H&E, büyütme X10) (yıldızlar nekrozu göstermektedir)

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri, küresel olarak en yüksek insidans ve mortalite oranına sahip kanser türü olup, kansere bağlı ölümlerin başlıca nedenidir. KHDAK, tüm akciğer kanseri olgularının yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır. KHDAK tedavisinde hedefe yönelik veya immünoterapötik ajanlarla önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen hastaların çoğu için en yaygın tedavi rejimi kemoterapidir ve 5 yıllık sağkalım oranları hala istenilen düzeyde değildir. Yüksek ölüm oranı ve düşük sağkalım, büyük ölçüde KHDAK hücrelerinin normal dokulara invazyon yeteneği ve uzak organlara metastaz yapma kapasitesinden kaynaklanmaktadır [100]. Gempitabin, KHDAK için birinci basamak tedavi ilacı olarak onaylanmış bir deoksisitidin analogudur. Kanser hücreleri üzerindeki etkisini DNA replikasyonunu durduran ve sonuç olarak apoptoza yol açan trifosfat metaboliti (dFdCTP) aracılığıyla göstermektedir [101]. Bununla birlikte, gempitabine bağlı ilaç direnci ve anemi, lökopeni gibi yan etkiler kemoterapötik etkinliğini sınırlamaktadır [97]. Bu direnç gempitabinin hücre içine alımının metabolik olarak düzenlenmesi ve antiapoptotik sinyal yollarının aktif hale gelmesiyle ortaya çıkmaktadır [102, 103]. Farklı ajanların kombinasyonu, sinerjistik terapötik etkinliği artırmak için etkili bir strateji olabilir. Bu ajanlar, çeşitli moleküler mekanizmalar üzerinden etki ederek birlikte uygulandıklarında daha güçlü bir antikanser yanıtı ortaya çıkarabilir [104]. Bu nedenle, alternatif tedavi yaklaşımlarına olan ihtiyaç giderek artmaktadır. Kemoterapötik ajanların sitotoksik etkilerini güçlendirmek, bu ajanlara karşı gelişen direnci azaltmak ve hastalarda görülen yan etkileri en aza indirmek amacıyla, fitokimyasal ajanların kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanımı üzerine çalışmalar yaygınlaşmıştır. *Curcuma longa* bitkisinin köksapından elde edilen hidrofobik bir polifenol olan kurkuminin sentetik analogu EF24, bu fitokimyasal ajanlardan biridir [77]. Hızlı emilim, geniş doku dağılımı göstererek optimal biyoyararlanım ve hedef dokularda uzun süreli maruziyet sağlar. Ayrıca biyolojik bariyerleri aşma ve tümör bölgelerinde birikme yeteneği, kanser tedavisinde önemli bir avantaj sunmaktadır [78].

Bu doktora tez çalışmasında; EF24' ün, A549 insan akciğer kanser hücrelerinde gempitabin aracılı hücre ölüm cevabına olan etkilerinin *in vitro* ve *in vivo* olarak belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bugüne dek yapılan *in vitro* çalışmalarda farklı kanser hücrelerinin EF24 duyarlılıklarının değişken olduğu görülmüştür. Bu çalışmalarda, EF24' ün adrenokortikal karsinom, küçük

hücreli dışı akciğer, over, kolorektal, karaciğer, servikal, kolanjiyokarsinom, gastrik, üçlü negatif meme kanseri (TNMK) ve osteosarkom hücre hatlarında hücre canlılığı üzerine olan etkileri araştırılmış ve konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı gösterilmiştir [76, 79, 87, 95, 105-110]. Bertazza ve diğerleri, adrenokortikal karsinom hücre hatlarında EF24' ün IC50 değerini, 24 saat sonunda SW13 hücreleri için $6,5 \pm 2,4 \mu\text{M}$, 72 saat sonunda ise H295R hücreleri için $4,9 \pm 2,8 \mu\text{M}$ olarak belirlemişlerdir. [105]. Duan ve diğerlerinin, MDA-MB-231 ve MDA-MB-468 TNMK hücre hatları ile yaptıkları çalışmada, EF24' ün 48 saatin sonunda $4 \mu\text{M}$ ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığını göstermişlerdir [109]. Bir başka çalışmada Lin ve diğerleri, EF24' ün osteosarkom U2OS hücrelerinde $2 \mu\text{M}$ ve üzeri, Saos-2 hücrelerinde ise $1 \mu\text{M}$ ve üzeri konsantrasyonlarda uygulandığında hücre canlılığını konsantrasyona bağlı olarak ve anlamlı şekilde azalttığını göstermişlerdir [110]. Anabilim dalımızda pankreatik BxPC-3 hücre hattı ile yapılan bir çalışmada $0,5 \mu\text{M}$ ve üzeri konsantrasyonlarda EF24' ün hücre canlılığını anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir [111]. Pankreas kanseri hücre hatları (MiaPaCa-2 ve PANC-1) ile yapılan bir başka çalışmada ise $1 \mu\text{M}$ EF24' ün hücre canlılığını %60 oranında azalttığı gösterilmiştir [112]. Anabilim dalımızda yürütülen bir başka çalışmada, akciğer zarından köken alan bir kanser türü olan malign plevral mezotelyoma MSTO-211H hücrelerine EF24' ün farklı konsantrasyonlarının ($0,5\text{--}32 \mu\text{M}$) 24 saat uygulanması sonucunda hücre canlılığının $2 \mu\text{M}$ ve üzeri konsantrasyonlarda azaldığını göstermişlerdir [113].

Literatürde EF24' ün A549 hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlendiği iki çalışmaya rastlanmıştır. İlk çalışmada, Kasinski ve diğerleri 48 saat sonunda EF24 için IC50 değerini $1,31 \mu\text{M}$ olarak belirlemişlerdir [79]. İkinci çalışmada, Chang ve diğerleri A549 hücrelerinde EF24' ün farklı konsantrasyonlarını ($0,5\text{--}16 \mu\text{M}$) 24 ve 48 saat çalışmış, $2 \mu\text{M}$ ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığında anlamlı bir azalma olduğunu göstermişlerdir [95]. Doktora tez çalışmamızda, A549 hücrelerine $0,5\text{--}32 \mu\text{M}$ aralığında EF24 uyguladık ve 24 saatte $2 \mu\text{M}$ ve üzeri, 48 saatte ise, $4 \mu\text{M}$ ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığında konsantrasyona bağlı anlamlı bir azalma belirledik. Bulgularımızın Chang ve diğerlerinin verileri ile uyumlu olduğu görüldü.

Literatürde gempitabinin A549 hücre canlılığı üzerine etkisinin belirlendiği çalışmalarda gempitabinin etkin/IC50 konsantrasyonlarında farklılıklar olduğu görülmüştür. Wu ve diğerleri, gempitabini A549 hücrelerine değişen konsantrasyonlarda 24 saat uygulamış, $5 \mu\text{M}$ ve üzeri konsantrasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı olarak hücre canlılığının

azaldığını belirlemişlerdir [114]. Başka bir çalışmada ise, gempitabin 48 saat A549 hücrelerine uygulanmış, 0.5 μM ve üzeri konsantrasyonların hücre canlılığını anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir [115]. Bir diğer çalışmada ise, 48 saatte gempitabin uygulanan A549 hücrelerindeki IC50 değerinin 2.23 μM olduğu gösterilmiştir [116]. A549 hücre hattı ile yapılan bir başka çalışmada ise, 48 saatte gempitabin uygulanan hücrelerde IC50 değeri 9 μM olarak bulunmuştur [117]. Doktora tez çalışmamızda, 24 saat gempitabin uyguladığımız A549 hücrelerinde 10 μM ve üzeri, 48 saatte ise 5 μM ve üzeri konsantrasyonlarda hücre canlılığında anlamlı azalma tespit ettik. Çalışmalardaki etkin ya da IC50 konsantrasyonlarda gözlenen farkların hücre pasaj numaraları ve/veya kültür koşulları nedeniyle olabileceğini düşünmekteyiz.

Yaptığımız literatür taramasında, gempitabin ile uyarılan hücre ölümünde EF24'ün farklı konsantrasyonlarının KHDAK hücrelerinde etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, kombine tedavi uygulamalarımıza ilişkin elde edilen sonuçlar mevcut literatürle karşılaştıramamıştır.

EF24 ve gempitabinin seçilen konsantrasyonlarının tek başlarına ve birlikte uygulamalarının hücre göçüne olan etkisinin belirlenmesi amacıyla *in vitro* yara iyileşmesi deneyleri yapılmıştır. Bir çalışmada, MCF-7 hücrelerine 24 saat EF24 (5 μM) uygulandığında, kontrol grubuna oranla göç hızının azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca, göç hızının 48 saat sonra büyük ölçüde baskılandığı da belirlenmiştir [118]. Bir başka çalışmada, 24 saat süresince 3 μM EF24, over kanseri hücrelerine (SKOV-3, A2780, OVCAR-3) uygulanmış, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında, EF24'ün tüm hücrelerde hücre göç hızını azalttığı gösterilmiştir [119]. Zhang ve diğerleri, EF24'ün, miR-33b ifadesini artırarak ve eşzamanlı olarak high mobility group AT-hook 2 (HMGA2) ifadesini azaltarak melanoma metastazını baskıladığını göstermiştir [120]. Karaciğer kanser hücre hatları (HCCLM-3, HEPG2) ile yapılan bir başka çalışmada, hücrelere 12 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda EF24 uygulanmış ve 1 μM EF24 uygulanan grubun kontrol grubuna oranla hücre göçünü anlamlı şekilde azalttığı gösterilmiştir [121]. Literatürde EF24'ün A549 hücrelerinin göç etme yeteneğine olan etkisini belirlemeye yönelik tek çalışmaya rastlanmıştır. 24 saat süresince A549 hücrelerine 2 μM EF24 uygulanmış, kontrol hücreleriyle karşılaştırıldığında kullanılan EF24 konsantrasyonunun hücrelerin göç etme yeteneği üzerine etkisinin olmadığı belirlenmiştir [122]. Doktora tez çalışmamızda ise, A549 hücrelerine, 8 μM EF24'ü 24 ve 48 saat uyguladığımızda, hücrelerin göç hızının azaldığını belirledik. Monroe ve diğerlerinin

çalışması ile 24 saat EF24 uyguladığımız A549 hücrelerinden elde ettiğimiz sonuçların farklı olmasının nedeninin EF24 konsantrasyonlarının farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızdaki diğer ajan olan gemsitabinle yapılan bir çalışmadaki *in vitro* yara iyileşme deneyinde, pankreas kanseri hücre hattı Panc-1'e, 24 saat süresince 10 µM gemsitabin uygulanmış, kontrol hücrelerine oranla hücrelerin göç etme yeteneğinde azalma görülmemiştir [123]. Başka bir çalışmada, A549 hücrelerine 24 saat süresince gemsitabin (IC₅₀:6,6 nM) uygulanmış, hücrelerin göç etme hızında kontrol hücrelerine göre belirgin bir fark görülmemiştir [124]. Jiang ve diğerleri, A549 hücrelerine 48 saat 10 µg/mL gemsitabin uygulamışlar ve kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında, gemsitabin uygulanan hücrelerin göç hızında azalma olduğunu göstermişlerdir [97]. Doktora tez çalışmamızda 10 µM gemsitabin uygulanan hücrelerin göç hızında ajan uygulanmayan kontrol grubuna göre azalma belirledik Bulgularımız Jiang ve diğerlerinin çalışması ile uyumludur.

Bununla birlikte, tek başına gemsitabin uygulanan hücreleri, tek başına EF24 ve her iki ajanın birlikte uygulandığı hücrelerle karşılaştırdığımızda, gemsitabin uygulanan hücrelerin göç etme hızında bir azalma belirlemedik. Literatürde her iki ajanın birlikte hücre göç hızına etkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmadığından sonuçlarımız literatürle karşılaştırılamamıştır.

Doktora tez çalışmamızın *in vivo* bölümünde A549 hücrelerini kullanarak akciğer kanseri ksenograft fare modeli oluşturup, gemsitabin aracılı hücre ölümüne EF24' ün etkilerini araştırdık. EF24' ün farklı kanserlerde *in vivo* çalışmalarda antikanser etkinliği araştırılmıştır. Bu çalışmalardan birinde, Liu ve diğerleri, Hepa1-6 fare karaciğer kanseri ortotopik modeli oluşturmuş, 21 gün süresince 20 mg/kg EF24 ile tedavi etmişler ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, EF24 uygulanan farelerde tümör boyutunun ve ağırlığının azaldığını saptamışlardır [87]. Bir başka çalışmada, HuCCT-1 hücreleri ile kolanjiyokarsinom ksenograft fare modeli oluşturulmuş, 21 gün süresince 20 mg/kg EF24 ile tedavi edilmiş, farelerin ortalama tümör ağırlığı kontrol grubuna göre önemli ölçüde azalmış, EF24 tedavisi farelerde belirgin bir toksisiteye sebep olmamış ve farelerin vücut ağırlığında da bir değişiklik gözlenmemiştir [107]. Chang ve diğerleri, A549 fare ksenograft modelini oluşturmuş, EF24'ün farklı dozlarında (5, 10, 20 mg/kg) 17 gün süre ile tedavi etmişler ve doza bağlı olarak tümör hacminde ve ağırlığında net bir azalma olduğunu

saptamışlardır [95]. Doktora tez çalışmamızda, A549 ksenograft fare modeli oluşturulup farelere 21 gün süresince 20 mg/kg EF24 uyguladık. A549 ksenograft farelerden elde edilen tümör dokularının hacimleri ve ağırlıklarını hesaplayıp, kombine tedavi uygulanan grupta diğer gruplara göre tümör hacminde ve ağırlığında azalma olduğunu belirledik. Farklı kanserlere ait hücreler kullanılarak oluşturulan ksenograft modellerinde 20 mg/kg EF24'ün 17-21 gün boyunca uygulanmasının tümör hacmini azalttığı görülmektedir.

Iwanski ve diğerleri, Panc-1 hücreleri ile pankreas kanseri ksenograft fare modeli oluşturmuş ve fareler haftada iki kez 25 mg/kg gempitabin ile 43 gün tedavi edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gempitabin tedavisi alan farelerin tümör hacimleri ve tümör ağırlıklarının azaldığı belirlenmiştir. Ayrıca, farelerin vücut ağırlığı ölçülmüş ve vücut ağırlıklarında herhangi bir değişim gözlenmemiştir [96]. Bir başka çalışmada, A549 ksenograft modeli oluşturulmuş ve farelere haftada iki kez 20 mg/kg gempitabin uygulanmış ve 3-4 hafta tedavi edilmiştir. Kontrol grubuna göre, gempitabin ile tedavi edilen grupta yer alan farelerin tümör hacimleri ve tümör ağırlıklarının düşük olduğu belirlenmiştir [125]. Doktora tez çalışmamızda, A549 fare ksenograftlarını haftada iki kez 25 mg/kg gempitabin ile 21 gün tedavi ettik. Literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumlu olarak, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gempitabin tedavisi alan farelerden elde edilen tümörlerin ağırlık ve hacimlerinin az olduğunu belirledik. Bununla birlikte, farelerin vücut ağırlığında da tedavi süresince bir değişim gözlemedik.

Literatürde, A549 ksenograft modelinde, EF24 ve gempitabinin tek başlarına ve/veya birlikte uygulamasına yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürdeki ulaştığımız tek çalışma pankreas ksenograftı oluşturularak yapılan çalışmadır. MiaPaCa ksenograft fare modelinde, fareler 20 mg/kg gempitabin, 10 mg/kg lipozomlara yüklenen EF24 ve her iki ajan ile birlikte tedavi edilmiştir. Kombine tedavi alan grubun ortalama tümör ağırlığında diğer tedavi gruplarına göre belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Farelerin ortalama vücut ağırlığında da tedavi sebebiyle bir değişim olmadığı belirlenmiştir [126].

Hepa1-6 fare karaciğer ksenograft modeli oluşturulan ve EF24 ile tedavi edilen farelerden elde edilen tümör dokularında, kontrol ile karşılaştırıldığında, apoptotik (prokaspaz-3), antiapoptotik (Bcl-2), ve hücre döngüsü (siklin B1 ve Cdc2) proteinlerinin ifade düzeyinin azaldığı gösterilmiştir [87]. Bir başka çalışmada, HuCCT-1 kolanjiokarsinom fare ksenograft modeli oluşturulmuş ve EF24 ile tedavi edilen farelerden elde edilen tümör

dokularında yapılan incelemede, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, XIAP ifadesinin azaldığı, aktif kaspaz-9 ve kaspaz-3 protein düzeylerinin ise arttığı belirlenmiştir [107]. Doktora tez çalışmamızda, EF24 ile tedavi edilen A549 ksenograftlarından elde edilen tümör dokularında kaspaz-3 aktivitesinin düşük olduğunu belirledik.

Panc-1 fare karaciğer ksenograft modeli oluşturulan ve gemsitabin ile tedavi edilen farelerden elde edilen tümör dokularında, kontrol ile karşılaştırıldığında, anti-apoptotik Bcl-XL ve Bcl-2 protein düzeylerinin azaldığı, proapoptotik kaspaz-3 ve -9'un aktivitesinin arttığı belirlendi [96]. Bir başka çalışmada, A549 ksenograft modeli oluşturulan ve gemsitabin ile tedavi edilen farelerden elde edilen tümör dokularında, kontrol ile karşılaştırıldığında, aktif kaspaz-3 düzeyinin arttığı gösterilmiştir [125]. Doktora tez çalışmamızda, gemsitabin ile tedavi edilen A549 ksenograftlarından elde edilen tümör dokularında kaspaz 3 aktivitesinin yüksek olduğunu belirledik. Bulgularımız Hatami ve diğerlerinin çalışması ile uyumludur.

EF24'ün, IKK β enzimini direkt baskıladığı, böylece, NF κ B'nin aktivasyonunun önlendiği gösterilmiştir [79]. Brown ve diğerleri, kurkumin analoglarının IKK β enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini araştırdıkları *in vitro* çalışmada, EF24'ün IKK β 'yi baskılaması için gereken IC50 (enzimi %50 oranında baskıladığı konsantrasyon) değerinin 72 μ M olduğunu göstermişlerdir [128]. Başka bir *in vitro* çalışmada ise, EF24'ün IKK β 'yi 20 μ M konsantrasyonda %34,5 oranında baskıladığı gösterilmiştir ve bu oranın NF κ B'nin baskılanması için yeterli olmadığı belirtilmiştir [129]. Bu iki çalışmada, *in vitro* olarak IKK β 'nin baskılanması için yüksek EF24 konsantrasyonlarına ihtiyaç olduğu görülmektedir. Literatürde, NF κ B aktivitesini engelleyen EF24 dozunun *in vivo* olarak belirlendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bisht ve diğerleri, MiaPaCa ksenograft farelerden elde edilen tümör dokularında tek başına lipo-EF24 ve gemsitabin tedavisi ile NF κ B aktivasyonunu baskılanmadığını, gemsitabin + EF24 tedavisi alan farelerin dokularında ise NF κ B'nin baskılandığını göstermiştir [126]. Doktora tez çalışmamızda, A549 ksenograft farelerinden elde edilen tümör dokularında, tek başına EF24 ve gemsitabin gruplarında NF κ B'nin baskılanmadığı, ancak, kombine tedavi alan grupta NF κ B'nin baskılandığını belirledik. Bulgularımız Bisht ve diğerleri ile uyumludur. Ancak, Bisht ve diğerlerinin çalışmasında da belirlendiği gibi bizim çalışmamızda da tek başına EF24 tedavisi alan grupta NF κ B aktivitesinin azalmaması dikkat çekicidir. Bunun nedeni yukarıda açıkladığımız gibi, her ne kadar literatürdeki tedavi dozunu kullansak da EF24 tedavisinde kullandığımız doz NF κ B

p65 (pS536) fosforilasyonunun engellenmesinde yetersiz kalmış olabilir. Ayrıca, Marazioti ve diğerleri, A549 hücreleri ile yaptıkları çalışmada IL-1 β ' ya yanıt olarak IKK β ' dan bağımsız kanonik olmayan NF κ B yolunun (p65 proteini bu yolda yer almamaktadır) aktive olduğunu göstermişlerdir [130]. Bir diğer neden ise, Marazioti ve diğerlerinin çalışmasında olduğu gibi A549 hücrelerinin NF κ B'nin kanonik olmayan yolu üzerinden aktivasyonunu sürdürmesi olabilir.

Literatürde A549 fare ksenograftlarının gempitabinle tedavisi sonucu tümör hücrelerinde gözlenen MDA düzeylerinin değişikliğine yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, yapılan literatür taramasında, A549 rat ksenograft modeli oluşturularak gempitabin tedavisi yapılan ve elde edilen tümör dokularındaki MDA düzeylerinin belirlendiği iki çalışmaya rastlanmıştır. İlk çalışmada, Zhang ve diğerleri, A549 rat ksenograftı oluşturmuş ve 10 mg/mL gempitabini trakeal yolla doğrudan akciğerlere 4 gün boyunca uygulamışlardır. Tedavi sonrası ratlardan elde edilen tümör dokuları incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gempitabin uygulanan grupta MDA düzeylerinin yüksek olduğu görülmüştür [131]. Diğer çalışmada ise, A549 rat ksenograftlara gempitabinin haftada 2 kez, 2 hafta süresince 50 mg/kg olacak şekilde i.p olarak uygulanmıştır. Tümör dokuları incelendiğinde, kontrol grubuna göre, gempitabin ile tedavi edilen grupta MDA düzeylerinin yüksek; katalaz enzim aktivitesinin ise kontrol grubuna göre gempitabin grubunda düşük olduğu belirlenmiştir [132]. Doktora tez çalışmamızda ise, A549 fare ksenograftlarından elde ettiğimiz tümör dokuları incelendiğinde; kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, gempitabin uygulanan grupta MDA düzeylerinin düşük, katalaz enzim aktivitesinin ise yüksek olduğunu belirledik. Literatürdeki bu iki çalışma ratlarda oluşturulan A549 ksenograft modeline ait sonuçlar olduğundan, bulgularımız karşılaştırılamamıştır. SGC-7901 gastrik kanser hücreleri ile oluşturulan fare ksenograftları 3mg/kg EF24 ile 14 gün tedavi edildikten sonra elde edilen tümör dokularındaki MDA düzeyleri incelendiğinde; kontrol grubuna göre, EF24 ile tedavi edilen grupta MDA düzeyinin yüksek olduğu gösterilmiştir [133]. Bir başka çalışmada, SGC-7901 fare ksenograftları oluşturulmuş; bir grup fare 3 mg/kg EF24, başka bir grup 6 mg/kg EF24 ile 17 gün boyunca tedavi edilmiştir. Tümör dokularındaki MDA düzeyleri incelendiğinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki tedavi grubunda MDA düzeylerinin arttığı; bu artışın 6mg/kg EF24 ile tedavi edilen grupta daha yüksek olduğu belirlenmiştir [134]. Doktora tez çalışmamızda, EF24 tedavisi alan A549 fare ksenograftlarındaki tümör dokularında, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında MDA düzeylerinin daha düşük olduğunu belirledik. Sonuçlarımız, gastrik kanser ksenograftlarında

yapılan çalışmalardan farklıdır. Bunun nedeni, çalışmamızın A549 akciğer ksenograftları ile yapılması, EF24 tedavisinde kullandığımız konsantrasyonların ve tedavi süresinin farklı olması olabilir. Gemcitabin ve EF24' ü birlikte uyguladığımız gruptan elde ettiğimiz tümör dokularını incelediğimizde ise; kontrol grubu ve tekli uygulamalara göre kombine tedavi uygulanan grupta MDA düzeylerinin düşük, katalaz aktivitesinin ise yüksek olduğunu belirledik. Literatürde her iki ajanın birlikte uygulanarak MDA ve katalaz düzeylerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Chang ve diğerleri, A549 ksenograft farelerden elde edilen tümör dokularının histopatolojik incelemesinde 20 mg/kg doz uygulanan grupta nekroz lezyonlarının oluştuğunu tespit etmişlerdir [95]. Benzer şekilde, doktora tez çalışmamızda, EF4 tedavisi alan gruptan elde edilen tümör dokularında nekrotik alanlar görüldü. Ancak, EF24 tümörlerinde nekroz alanlarının oranı sham grupları ile benzerdi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Akciğer kanseri, son verilere göre erkeklerde en sık, kadınlarda ise ikinci en sık görülen kanser türüdür. Her yıl yaklaşık iki milyon kişi tanı almaktadır. Kansere bağlı ölümlerde ise, erkeklerde birinci, kadınlarda meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Akciğer kanserinin en önemli risk faktörü sigara kullanımıdır. Akciğer kanseri tedavisinde birinci basamak kemoterapide gemsitabin ve platin bazlı ajanlar birlikte uygulanmaktadır. Ancak tedavi sırasında ortaya çıkan ilaç direnci tedavi başarısını engelleyen en önemli faktördür. Son yıllarda, tedavide kullanılan ajanların kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini arttırmak ve/veya sağlıklı dokulardaki toksik etkilerini azaltmak amacıyla kemoterapötik ajanlar ile birlikte fitokimyasallar kullanılmaktadır. En çok çalışılanlardan biri de kurkumindir. Kurkuminin biyoyararlanımını artırmak için çeşitli analogları sentezlenmiştir. Bunlardan biri de EF24' dür ve farklı kanser türleri üzerinde antiproliferatif, antimetastatik ve antianjiyogenik özellikler gösterdiği bilinmektedir. Bu doktora tez çalışmasında, gemsitabin ile uyarılan hücre ölüm cevabına EF24' ün etkisinin *in vitro* ve *in vivo* olarak belirlenmesini amaçladık. Doktora tez çalışmamızın *in vitro* bölümünde, A549 hücrelerine EF24 ve gemsitabin ajanları tek başlarına ve birlikte 24 ve 48 saat uygulanarak hücrelerdeki canlılık oranlarını belirledik. EF24'ün 4 μ M ve üzeri konsantrasyonlarda 24 ve 48 saatte konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığını azalttığını saptadık. Gemsitabinin tek başına uygulandığı A549 hücrelerinde ise, 24 ve 48 saatte konsantrasyona bağlı bir azalma tespit etmedik. Gemsitabinin ve EF24'ün seçilen konsantrasyonlarının 24 ve 48 saatte uygulanması sonucu, EF24'ün 8 μ M, gemsitabinin 10 μ M konsantrasyonu seçilerek, yara iyileşmesi deneyi ile her iki ajanın tek başlarına ve birlikte hücrelerin göç etme yeteneği üzerine olan etkisini belirledik. EF24 tek başına ve gemsitabinle birlikte uygulandığında yara kapanma oranının, gemsitabin uygulanan hücrelerdeki yara kapanma oranından az olduğunu saptadık.

Doktora tez çalışmamızın *in vivo* kısmında ise, A549 hücreleri kullanılarak deneysel akciğer kanseri ksenograft fare modeli oluşturuldu. A549 ksenograftları gemsitabin, EF24 ve gemsitabin+EF24 ile tedavi edildi. Tedavi süresi sonunda, rezekte edilen tümör dokularının hacim ve ağırlıkları ölçüldü. Farelerden elde edilen tümör dokularında kaspaz-3, katalaz enzim aktiviteleri ve pNF κ B/NF κ B oranı ve MDA düzeyleri değerlendirildi. Tümör dokularının histopatolojik incelemesi de yapıldı. Bulgularımızı değerlendirdiğimizde,

gemsitabin tedavisi alan farelerin tümör dokularında kaspaz-3 aktivitesinin yüksek olması, gemsitabinin kaspaz bağımlı apoptozu uyardığını gösterdi.

EF24 ile tedavi edilen gruptan elde edilen tümör dokularında ise, kaspaz-3 aktivitesinin düşüklüğü, pNF κ B/NF κ B ve nekroz oranının kontrol grubundan farklı olmaması, ancak, tümör hacmi ve ağırlığının kontrol grubuna göre düşük olması, EF24'ün apoptotik hücre ölümünü sınırlı olarak uyardığını göstermektedir.

Kombine tedavi edilen farelerden elde edilen tümör dokularındaki sonuçlarımızı değerlendirdiğimizde ise, yüksek kaspaz-3 aktivitesinin görülmemesi, en düşük tümör hacmi ve ağırlığının bu grupta olması, nekroz oranının kontrol grubundan düşük olsa bile bu farkın az olması ve pNF κ B/NF κ B oranının düşük olması nedenleriyle apoptozun sınırlı gerçekleştiğini saptadık. Bulgularımız, EF24'ün, gemsitabinle uyarılan apoptozu baskıladığını göstermektedir.

Tek başına EF24 tedavisi alan ve kombine tedavi alan grupta yer alan farelerin tümör dokularında, apoptozun yanı sıra, hangi hücre ölüm tipinin uyarıldığının belirlenmesi için, ferroptoz, otofaji gibi hücre ölüm yollarının belirteci kabul edilen proteinlerin ifade düzeylerini saptamaya yönelik ek deneysel çalışmaların yapılması gereklidir. Elde edilen tümör dokularında öncelikle otofaji belirteçlerinin çalışılması planlanmaktadır. Bu çalışmadan elde edilecek verilerin, EF24'ün tek başına ve gemsitabinle birlikte hangi hücre ölüm mekanizmasını uyardığı hakkında daha net bilgi verebileceği kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Chaudhry, R., Omole, A. E., and Bordoni, B. (2024). *Anatomy, thorax, lungs*. St. Petersburg, FL: StatPearls Publishing, 245-248.
2. Sun, X., Perl, A. K., Li, R., Bell, S. M., Sajti, E., Kalinichenko, V. V., and Morrissey, E. E. (2022). A census of the lung: CellCards from LungMAP. *Developmental cell*, 57(1), 112-145.
3. Borczuk, A. C., Gorenstein, L., Walter, K. L., Assaad, A. A., Wang, L., and Powell, C. A. (2003). Non-small-cell lung cancer molecular signatures recapitulate lung developmental pathways. *The American Journal of Pathology*, 163(5), 1949-1960.
4. Pass, H. I., Carbone, D. P., Johnson, D. H., Minna, J. D., Scagliotti, G. V., and Turrise, A. T. (2012). *Principles and Practice of Lung Cancer: the official reference text of the International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC)*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 148-151.
5. Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., and Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 74(3), 229-263.
6. İnternet: Türkiye Kanseri İstatistikleri (2018). Web: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdB/Dokumanlar/Istatistikler/Kanse_Rapor_2018.pdf adresinden 20 Aralık 2024'te alınmıştır.
7. İnternet: TÜİK, "Ölüm Nedeni İstatistikleri, 2018". (2019). Web: <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-Nedeni-Istatistikleri-2018-30626> adresinden 20 Aralık 2024'te alınmıştır.
8. Thun, M., Peto, R., Boreham, J., and Lopez, A. D. (2012). Stages of the cigarette epidemic on entering its second century. *Tobacco Control*, 21(2), 96-101.
9. Wéber, A., Morgan, E., Vignat, J., Laversanne, M., Pizzato, M., Rumgay, H., and Bray, F. (2023). Lung cancer mortality in the wake of the changing smoking epidemic: a descriptive study of the global burden in 2020 and 2040. *BMJ Open*, 13(5), e065303.
10. World Health Organization (WHO). (2023). *WHO report on the global tobacco epidemic, 2023: Protect people from tobacco smoke: Executive summary*. Geneva: World Health Organization.
11. Zhang, Y., Vaccarella, S., Morgan, E., Li, M., Etxeberria, J., Chokunonga, E., and Bray, F. (2023). Global variations in lung cancer incidence by histological subtype in 2020: a population-based study. *The Lancet Oncology*, 24(11), 1206-1218.
12. Hill, W., Lim, E. L., Weeden, C. E., Lee, C., Augustine, M., Chen, K., and Swanton, C. (2023). Lung adenocarcinoma promotion by air pollutants. *Nature*, 616(7955), 159-167.

13. World Health Organization (WHO). (2024). *2023 global progress report on implementation of the WHO Framework Convention on Tobacco Control*. Geneva: World Health Organization.
14. Herbst, R. S., Morgensztern, D., and Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*, 553(7689), 446-454.
15. Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C., and Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *European Respiratory Journal*, 48(3), 889-902.
16. Barta, J. A., Powell, C. A., and Wisnivesky, J. P. (2019). Global epidemiology of lung cancer. *Annals of Global Health*, 85(1), 8-24.
17. Erbaycu, A. E. (2020). *The epidemiology and risk factors in lung cancer. Akciğer kanseri* (1. Baskı), Ankara: Türkiye Klinikleri, 1-5.
18. Benowitz, N. L. (2008). Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 83(4), 531-541.
19. Costa, F., and Soares, R. (2009). Nicotine: a pro-angiogenic factor. *Life Sciences*, 84(23-24), 785-790.
20. Boffetta, P., Pershagen, G., Jöckel, K. H., Forastiere, F., Gaborieau, V., Heinrich, J., and Simonato, L. (1999). Cigar and pipe smoking and lung cancer risk: a multicenter study from Europe. *Journal of the National Cancer Institute*, 91(8), 697-701.
21. Öberg, M., Jaakkola, M. S., Woodward, A., Peruga, A., and Prüss-Ustün, A. (2011). Worldwide burden of disease from exposure to second-hand smoke: a retrospective analysis of data from 192 countries. *The Lancet*, 377(9760), 139-146.
22. Alberg, A. J., Brock, M. V., Ford, J. G., Samet, J. M., and Spivack, S. D. (2013). Epidemiology of lung cancer. *Chest*, 143(5), e1-e29.
23. Nelson, H. H., and Kelsey, K. T. (2002). The molecular epidemiology of asbestos and tobacco in lung cancer. *Oncogene*, 21(48), 7284-7288.
24. Ngamwong, Y., Tangamornsuksan, W., Lohitnavy, O., Chaiyakunapruk, N., Scholfield, C. N., Reisfeld, B., and Lohitnavy, M. (2015). Additive synergism between asbestos and smoking in lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*, 10(8), e0135798.
25. Krewski, D., Lubin, J. H., Zielinski, J. M., Alavanja, M., Catalan, V. S., Field, R. W., and Wilcox, H. B. (2005). Residential radon and risk of lung cancer: a combined analysis of 7 North American case-control studies. *Epidemiology*, 16(2), 137-145.
26. Darby, S., Hill, D., Deo, H., Auvinen, A., Barros-Dios, J. M., Baysson, H., and Doll, R. (2006). Residential radon and lung cancer—detailed results of a collaborative analysis of individual data on 7148 persons with lung cancer and 14 208 persons without lung cancer from 13 epidemiologic studies in Europe. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 32(1), 1-84.

27. Alberg, A. J., Yung, R. C., Strickland, P., and Nelson, J. (2002). Respiratory cancer and exposure to arsenic, chromium, nickel, and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Clinics in Occupational and Environmental Medicine*, 2(4), 779-801.
28. Miller, R. A., and Cagle, P. T. (2018). *Lung cancer epidemiology and demographics*. Cham: Springer International Publishing, 15-17.
29. Brenner, D. R., Boffetta, P., Duell, E. J., Bickeboeller, H., Rosenberger, A., McCormack, V., and Hung, R. J. (2012). Previous lung diseases and lung cancer risk: a pooled analysis from the International Lung Cancer Consortium. *American Journal of Epidemiology*, 176(7), 573-585.
30. Brenner, D. R., McLaughlin, J. R., and Hung, R. J. (2011). Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PloS One*, 6(3), e17479.
31. Schwartz, A. G., Cote, M. L., Wenzlaff, A. S., Van Dyke, A., Chen, W., Ruckdeschel, J. C., and Soubani, A. O. (2009). Chronic obstructive lung diseases and risk of non-small cell lung cancer in women. *Journal of Thoracic Oncology*, 4(3), 291-299.
32. Engels, E. A., Biggar, R. J., Hall, H. I., Cross, H., Crutchfield, A., Finch, J. L., and Goedert, J. J. (2008). Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. *International Journal of Cancer*, 123(1), 187-194.
33. Okazaki, I., Ishikawa, S., Ando, W., and Sohara, Y. (2016). Lung adenocarcinoma in never smokers: problems of primary prevention from aspects of susceptible genes and carcinogens. *Anticancer Research*, 36(12), 6207-6224.
34. LoPiccolo, J., Gusev, A., Christiani, D. C., and Jänne, P. A. (2024). Lung cancer in patients who have never smoked—An emerging disease. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 21(2), 121-146.
35. MacKinnon, A. C., Kopatz, J., and Sethi, T. (2010). The molecular and cellular biology of lung cancer: identifying novel therapeutic strategies. *British Medical Bulletin*, 95(1), 47-61.
36. Inamura, K. (2017). Lung cancer: understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in Oncology*, 7, 193.
37. Baldovini, C., Rossi, G., and Ciarrocchi, A. (2019). Approaches to tumor classification in pulmonary sarcomatoid carcinoma. *Lung Cancer: Targets and Therapy*, 10, 131-149.
38. Nicholson, A. G., Tsao, M. S., Beasley, M. B., Borczuk, A. C., Brambilla, E., Cooper, W. A., and Travis, W. D. (2022). The 2021 WHO classification of lung tumors: impact of advances since 2015. *Journal of Thoracic Oncology*, 17(3), 362-387.
39. Travis, W. D., Brambilla, E., Burke, A. P., Marx, A., and Nicholson, A. G. (2015). Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9), 1240-1242.

40. Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U., Yang, Y. W., and Buchanan, P. (2015). Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1856(2), 189-210.
41. Rami-Porta, R., Nishimura, K. K., Giroux, D. J., Detterbeck, F., Cardillo, G., Edwards, J. G., and Asamura, H. (2024). The International Association for the Study of Lung Cancer Lung Cancer Staging Project: Proposals for revision of the TNM stage groups in the forthcoming (Ninth) edition of the TNM classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology*.
42. Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643-649.
43. Johnson, J. L., Pillai, S., and Chellappan, S. P. (2012). Genetic and biochemical alterations in non-small cell lung cancer. *Biochemistry Research International*, 2012(1), 940405.
44. Dawson, M. A., and Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: From mechanism to therapy. *cell*, 150(1), 12-27.
45. Baylin, S. B., and Jones, P. A. (2011). A decade of exploring the cancer epigenome—biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer*, 11(10), 726-734.
46. Turner, B. M. (2002). Cellular memory and the histone code. *Cell*, 111(3), 285-291.
47. Anastasiadou, E., Jacob, L. S., and Slack, F. J. (2018). Non-coding RNA networks in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(1), 5-18.
48. Teschendorff, A. E., Zheng, S. C., Feber, A., Yang, Z., Beck, S., and Widschwendter, M. (2016). The multi-omic landscape of transcription factor inactivation in cancer. *Genome Medicine*, 8(1), 89-104.
49. Van Den Broeck, A., Brambilla, E., Moro-Sibilot, D., Lantuejoul, S., Brambilla, C., Eymin, B., and Gazzeri, S. (2008). Loss of histone h4k20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(22), 7237-7245.
50. Tellez, C. S., Juri, D. E., Do, K., Bernauer, A. M., Thomas, C. L., Damiani, L. A., and Belinsky, S. A. (2011). EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic silencing are early manifestations during carcinogen-induced transformation of human lung epithelial cells. *Cancer Research*, 71(8), 3087-3097.
51. Licchesi, J. D., Westra, W. H., Hooker, C. M., and Herman, J. G. (2008). Promoter hypermethylation of hallmark cancer genes in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Clinical Cancer Research*, 14(9), 2570-2578.
52. Anderson, H., Lund, B., Bach, F., Thatcher, N., Walling, J., and Hansen, H. H. (1994). Single-agent activity of weekly gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study. *Journal of Clinical Oncology*, 12(9), 1821-1826.

53. Hayashi, H., Kurata, T., and Nakagawa, K. (2011). Gemcitabine: efficacy in the treatment of advanced stage nonsquamous non-small cell lung cancer. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 5, 177-184.
54. Peters, G. J., Ruiz van Haperen, V. W., Bergman, A. M., Veerman, G., Smitskamp-Wilms, E., Van Moorsel, C. J., and Braakhuis, B. J. (1996). Preclinical combination therapy with gemcitabine and mechanisms of resistance. *Seminars in Oncology*, 23(10), 16-24.
55. Gandhi, V., and Plunkett, W. (1990). Modulatory activity of 2', 2'-difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arabinosyl nucleosides. *Cancer Research*, 50(12), 3675-3680.
56. Noble, S., and Goa, K. L. (1997). Gemcitabine: a review of its pharmacology and clinical potential in non-small cell lung cancer and pancreatic cancer. *Drugs*, 54, 447-472.
57. Fujita, H., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Itaba, S., Ito, T., Nakata, K., and Tanaka, M. (2010). Gene expression levels as predictive markers of outcome in pancreatic cancer after gemcitabine-based adjuvant chemotherapy. *Neoplasia*, 12(10), 807-817.
58. Shipley, L. A., Brown, T. J., Cornpropst, J. D., Hamilton, M., Daniels, W. D., and Culp, H. W. (1992). Metabolism and disposition of gemcitabine, and oncolytic deoxycytidine analog, in mice, rats, and dogs. *Drug Metabolism and Disposition*, 20(6), 849-855.
59. Amrutkar, M., and Gladhaug, I. P. (2017). Pancreatic cancer chemoresistance to gemcitabine. *Cancers*, 9(11), 157.
60. Binenbaum, Y., Na'ara, S., and Gil, Z. (2015). Gemcitabine resistance in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Drug Resistance Updates*, 23, 55-68.
61. Funamizu, N., Okamoto, A., Kamata, Y., Misawa, T., Uwagawa, T., Gocho, T., and Manome, Y. (2010). Is the resistance of gemcitabine for pancreatic cancer settled only by overexpression of deoxycytidine kinase?. *Oncology Reports*, 23(2), 471-475.
62. Heinemann, V., Xu, Y. Z., Chubb, S., Sen, A., Hertel, L. W., Grindey, G. B., and Plunkett, W. (1992). Cellular elimination of 2', 2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potential. *Cancer Research*, 52(3), 533-539.
63. Moysan, E., Bastiat, G., and Benoit, J. P. (2013). Gemcitabine versus modified gemcitabine: a review of several promising chemical modifications. *Molecular Pharmaceutics*, 10(2), 430-444.
64. Rose, M. G., Farrell, M. P., and Schmitz, J. C. (2002). Thymidylate synthase: a critical target for cancer chemotherapy. *Clinical Colorectal Cancer*, 1(4), 220-229.
65. Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S., Kunnumakkara, A. B., and Aggarwal, B. B. (2008). Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Letters*, 267(1), 133-164.

66. Shao, Z. M., Shen, Z. Z., Liu, C. H., Sartippour, M. R., Go, V. L., Heber, D., and Nguyen, M. (2002). Curcumin exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *International Journal of Cancer*, 98(2), 234-240.
67. Schindler, R., and Mentlein, R. (2006). Flavonoids and vitamin E reduce the release of the angiogenic peptide vascular endothelial growth factor from human tumor cells. *The Journal of Nutrition*, 136(6), 1477-1482.
68. Sun, S., and Fang, H. (2021). Curcumin inhibits ovarian cancer progression by regulating circ-PLEKHM3/miR-320a/SMG1 axis. *Journal of Ovarian Research*, 14(1), 158-171.
69. Pillai, G. R., Srivastava, A. S., Hassanein, T. I., Chauhan, D. P., and Carrier, E. (2004). Induction of apoptosis in human lung cancer cells by curcumin. *Cancer Letters*, 208(2), 163-170.
70. Zhang, H. G., Kim, H., Liu, C., Yu, S., Wang, J., Grizzle, W. E., and Barnes, S. (2007). Curcumin reverses breast tumor exosomes mediated immune suppression of NK cell tumor cytotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(7), 1116-1123.
71. Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews Immunology*, 3(9), 745-756.
72. Tsai, J. R., Liu, P. L., Chen, Y. H., Chou, S. H., Cheng, Y. J., Hwang, J. J., and Chong, I. W. (2015). Curcumin inhibits non-small cell lung cancer cells metastasis through the adiponectin/NF- κ b/MMPs signaling pathway. *PloS One*, 10(12), e0144462.
73. Niedzwiecki, A., Roomi, M. W., Kalinovsky, T., and Rath, M. (2016). Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients*, 8(9), 552.
74. Xia, Y. Q., Wei, X. Y., Li, W. L., Kanchana, K., Xu, C. C., Chen, D. H., and Liang, G. (2014). Curcumin analogue A501 induces G2/M arrest and apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(16), 6893-6898.
75. Adams, B. K., Ferstl, E. M., Davis, M. C., Herold, M., Kurtkaya, S., Camalier, R. F., and Shoji, M. (2004). Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(14), 3871-3883.
76. He, G., Feng, C., Vinothkumar, R., Chen, W., Dai, X., Chen, X., and Wu, W. (2016). Curcumin analog EF24 induces apoptosis via ROS-dependent mitochondrial dysfunction in human colorectal cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 78, 1151-1161.
77. He, Y., Li, W., Hu, G., Sun, H., and Kong, Q. (2018). Bioactivities of EF24, a novel curcumin analog: A review. *Frontiers in Oncology*, 8, 614.
78. Sazdova, I., Keremidarska-Markova, M., Dimitrova, D., Mitrokhin, V., Kamkin, A., Hadzi-Petrushev, N., and Mladenov, M. (2023). Anticarcinogenic potency of EF24: an overview of its pharmacokinetics, efficacy, mechanism of action, and nanoformulation for drug delivery. *Cancers*, 15(22), 5478.

79. Kasinski, A. L., Du, Y., Thomas, S. L., Zhao, J., Sun, S. Y., Khuri, F. R., and Fu, H. (2008). Inhibition of I κ B kinase-nuclear factor- κ B signaling pathway by 3, 5-bis (2-fluorobenzylidene) piperidin-4-one (EF24), a novel monoketone analog of curcumin. *Molecular Pharmacology*, 74(3), 654-661.
80. Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H., and Hu, H. (2020). Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 209.
81. Wang, W., Mani, A. M., and Wu, Z. H. (2017). DNA damage-induced nuclear factor-kappa B activation and its roles in cancer progression. *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*, 3, 45-59.
82. Neri, A., Chang, C. C., Lombardi, L., Salina, M., Corradini, P., Maiolo, A. T., and Dalla-Favera, R. (1991). B cell lymphoma-associated chromosomal translocation involves candidate oncogene *lyt-10*, homologous to NF- κ B p50. *Cell*, 67(6), 1075-1087.
83. Higgins, K. A., Perez, J. R., Coleman, T. A., Dorshkind, K., McComas, W. A., Sarmiento, U. M., and Narayanan, R. (1993). Antisense inhibition of the p65 subunit of NF-kappa B blocks tumorigenicity and causes tumor regression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(21), 9901-9905.
84. Rasmi, R. R., Sakthivel, K. M., and Guruvayoorappan, C. (2020). NF- κ B inhibitors in treatment and prevention of lung cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110569.
85. Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
86. Zakeri, Z., and Lockshin, R. A. (2008). Cell death: history and future. *Advances in Experimental Medicine and biology*, 615, 1-11.
87. Liu, H., Liang, Y., Wang, L., Tian, L., Song, R., Han, T., and Liu, L. (2012). In vivo and in vitro suppression of hepatocellular carcinoma by EF24, a curcumin analog. *PloS One*, 7(10), e48075.
88. Lomonosova, E., and Chinnadurai, G. (2008). BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview. *Oncogene*, 27(1), 2-19.
89. Dewson, G., and Kluck, R. M. (2010). Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton*, 2, 9-22.
90. Chipuk, J. E., and Green, D. R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization?. *Trends in Cell Biology*, 18(4), 157-164.
91. Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: Critical control points. *Cell*, 116(2), 205-219.
92. Favalaro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., and De Laurenzi, V. (2012). Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY)*, 4(5), 330-349.

93. Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
94. Lieber, M., Todaro, G., Smith, B., Szakal, A., and Nelson-Rees, W. (1976). A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *International Journal of Cancer*, 17(1), 62-70.
95. Chang, M., Shang, M., Yuan, F., Guo, W., and Wang, C. (2021). EF24 exerts cytotoxicity against NSCLC via inducing ROS accumulation. *Cancer Cell International*, 21, 531-544.
96. Iwanski, G. B., Lee, D. H., En-Gal, S., Doan, N. B., Castor, B., Vogt, M., and Koeffler, H. P. (2010). Cucurbitacin B, a novel in vivo potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of pancreatic cancer. *British Journal of Pharmacology*, 160(4), 998-1007.
97. Jiang, S., Wang, R., Zhang, X., Wu, F., Li, S., and Yuan, Y. (2020). Combination treatment of gemcitabine and sorafenib exerts a synergistic inhibitory effect on non-small cell lung cancer in vitro and in vivo via the epithelial-to-mesenchymal transition process. *Oncology Letters*, 20(1), 346-356.
98. Van Ye, T. M., Roza, A. M., Pieper, G. M., Henderson, J., Johnson, C. P., and Adams, M. B. (1993). Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. *Journal of Surgical Research*, 55(5), 553-558.
99. Aebi, H. (1974). Catalase. In: *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press, 673-677.
100. Bremnes, R. M., Veve, R., Hirsch, F. R., and Franklin, W. A. (2002). The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung cancer*, 36(2), 115-124.
101. Huang, P., and Plunkett, W. (1995). Induction of apoptosis by gemcitabine. *Seminars in Oncology*, 22(11), 19-25.
102. Achiwa, H., Oguri, T., Sato, S., Maeda, H., Niimi, T., and Ueda, R. (2004). Determinants of sensitivity and resistance to gemcitabine: The roles of human equilibrative nucleoside transporter 1 and deoxycytidine kinase in non-small cell lung cancer. *Cancer Science*, 95(9), 753-757.
103. Bergman, A. M., Pinedo, H. M., and Peters, G. J. (2002). Determinants of resistance to 2', 2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Resistance Updates*, 5(1), 19-33.
104. Swarnakar, N. K., Thanki, K., and Jain, S. (2014). Enhanced antitumor efficacy and counterfeited cardiotoxicity of combinatorial oral therapy using Doxorubicin-and Coenzyme Q10-liquid crystalline nanoparticles in comparison with intravenous Adriamycin. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(6), 1231-1241.
105. Bertazza, L., Barollo, S., Mari, M. E., Faccio, I., Zorzan, M., Redaelli, M., and Pezzani, R. (2019). Biological effects of EF24, a curcumin derivative, alone or combined with mitotane in adrenocortical tumor cell lines. *Molecules*, 24(12), 2202.

106. Tan, X., Sidell, N., Mancini, A., Huang, R. P., Wang, S., Horowitz, I. R., and Wieser, F. (2010). Multiple anticancer activities of EF24, a novel curcumin analog, on human ovarian carcinoma cells. *Reproductive Sciences*, 17(10), 931-940.
107. Yin, D. L., Liang, Y. J., Zheng, T. S., Song, R. P., Wang, J. B., Sun, B. S., and Liu, L. X. (2016). EF24 inhibits tumor growth and metastasis via suppressing NF-kappaB dependent pathways in human cholangiocarcinoma. *Scientific Reports*, 6(1), 32167.
108. Zou, P., Xia, Y., Chen, W., Chen, X., Ying, S., Feng, Z., and Liang, G. (2016). EF24 induces ROS-mediated apoptosis via targeting thioredoxin reductase 1 in gastric cancer cells. *Oncotarget*, 7(14), 18050-18064.
109. Duan, Y., Chen, H. L., Ling, M., Zhang, S., Ma, F. X., Zhang, H. C., and Lv, X. A. (2022). The curcumin analog EF24 inhibits proliferation and invasion of triple-negative breast cancer cells by targeting the long noncoding RNA HCG11/Sp1 axis. *Molecular and Cellular Biology*, 42(1), e00163-21.
110. Lin, H., Chen, X., Zhang, C., Yang, T., Deng, Z., Song, Y., and Jin, D. (2021). EF24 induces ferroptosis in osteosarcoma cells through HMOX1. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 136, 111202.
111. Saglam, A. S. Y., Yilmaz, A., Onen, H. I., Alp, E., Kayhan, H., and Ekmekci, A. (2016). HDAC inhibitors, MS-275 and salermide, potentiates the anticancer effect of EF24 in human pancreatic cancer cells. *EXCLI Journal*, 15, 246.
112. Lagisetty, P., Subramaniam, D., Sahoo, K., Anant, S., and Awasthi, V. (2012). Anticancer Activity of an Imageable Curcuminoid 1-[2-Aminoethyl-(6-hydrazinopyridine-3-carbamidyl)-3, 5-bis-(2-fluorobenzylidene)-4-piperidone (EFAH). *Chemical Biology & Drug Design*, 79(2), 194-201.
113. Onen, H. I., Yilmaz, A., Alp, E., Celik, A., Demiroz, S. M., Konac, E., and Menevse, E. S. (2015). EF24 and RAD001 potentiates the anticancer effect of platinum-based agents in human malignant pleural mesothelioma (MSTO-211H) cells and protects nonmalignant mesothelial (MET-5A) cells. *Human & Experimental Toxicology*, 34(2), 117-126.
114. Wu, H. M., Shao, L. J., Jiang, Z. F., and Liu, R. Y. (2016). Gemcitabine-induced autophagy protects human lung cancer cells from apoptotic death. *Lung*, 194(6), 959-966.
115. Zhao, C., Gao, W., and Chen, T. (2014). Synergistic induction of apoptosis in A549 cells by dihydroartemisinin and gemcitabine. *Apoptosis*, 19, 668-681.
116. Tuya, N., Wang, Y., Tong, L., Gao, W., Yu, R., and Xue, L. (2017). Trichosanthin enhances the antitumor effect of gemcitabine in non-small cell lung cancer via inhibition of the PI3K/AKT pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(6), 5767-5772.
117. Soltanian, S., and Sheikhabaei, M. (2021). Effect of menadione and combination of gemcitabine and cisplatin on cancer stem cells in human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line A549. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 20(1), 105-117.

118. Li, J., Wang, S. H., Liu, Y. T., Zhang, Q., and Zhou, G. Z. (2023). Inhibition of autophagic flux by the curcumin analog EF-24 and its antiproliferative effect on MCF-7 cancer cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 37(4), e23307.
119. Zhang, D., Wang, Y., Dong, L., Huang, Y., Yuan, J., Ben, W., and Guan, Y. (2013). Therapeutic role of EF 24 targeting glucose transporter 1-mediated metabolism and metastasis in ovarian cancer cells. *Cancer Science*, 104(12), 1690-1696.
120. Zhang, P., Bai, H., Liu, G., Wang, H., Chen, F., Zhang, B., and Song, E. (2015). MicroRNA-33b, upregulated by EF24, a curcumin analog, suppresses the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and migratory potential of melanoma cells by targeting HMGA2. *Toxicology Letters*, 234(3), 151-161.
121. Zhao, R., Tin, L., Zhang, Y., Wu, Y., Jin, Y., Jin, X., and Li, X. (2016). EF24 suppresses invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells in vitro via inhibiting the phosphorylation of Src. *BioMed Research International*, 2016(1), 8569684.
122. Monroe, J. D., Hodzic, D., Millay, M. H., Patty, B. G., and Smith, M. E. (2019). Anti-cancer and ototoxicity characteristics of the curcuminoids, CLEFMA and EF24, in combination with cisplatin. *Molecules*, 24(21), 3889.
123. Quint, K., Tonigold, M., Di Fazio, P., Montalbano, R., Lingelbach, S., Rückert, F., and Neureiter, D. (2012). Pancreatic cancer cells surviving gemcitabine treatment express markers of stem cell differentiation and epithelial-mesenchymal transition. *International Journal of Oncology*, 41(6), 2093-2102.
124. Effendi, W. I., Nagano, T., Tachihara, M., Umezawa, K., Kiri, T., Dokuni, R., and Nishimura, Y. (2019). Synergistic interaction of gemcitabine and paclitaxel by modulating acetylation and polymerization of tubulin in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Management and Research*, 3669-3679.
125. Hatami, E., Nagesh, P. K., Jaggi, M., Chauhan, S. C., and Yallapu, M. M. (2020). Gambogic acid potentiates gemcitabine induced anticancer activity in non-small cell lung cancer. *European Journal of Pharmacology*, 888, 173486.
126. Bisht, S., Schlesinger, M., Rupp, A., Schubert, R., Nolting, J., Wenzel, J., and Feldmann, G. (2016). A liposomal formulation of the synthetic curcumin analog EF24 (Lipo-EF24) inhibits pancreatic cancer progression: towards future combination therapies. *Journal of Nanobiotechnology*, 14(5), 57-731-15.
127. Lin, H., Chen, X., Zhang, C., Yang, T., Deng, Z., Song, Y., Huang, L., Li, F., Li, Q., Lin, S., & Jin, D. (2021). EF24 induces ferroptosis in osteosarcoma cells through HMOX1. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 136, 111202.
128. Brown, A., Shi, Q., Moore, T. W., Yoon, Y., Prussia, A., Maddox, C., Liotta, D. C., Shim, H., & Snyder, J. P. (2013). Monocarbonyl curcumin analogues: heterocyclic pleiotropic kinase inhibitors that mediate anticancer properties. *Journal of medicinal chemistry*, 56(9), 3456–3466.
129. Jin, R., Chen, Q., Yao, S., Bai, E., Fu, W., Wang, L., Wang, J., Du, X., Wei, T., Xu, H., Jiang, C., Qiu, P., Wu, J., Li, W., & Liang, G. (2018). Synthesis and anti-tumor activity

- of EF24 analogues as IKK β inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 144, 218–228.
130. Marazioti, A., Lilis, I., Vreka, M., Apostolopoulou, H., Kalogeropoulou, A., Giopanou, I., Giotopoulou, G. A., Krontira, A. C., Iliopoulou, M., Kanellakis, N. I., Agalioti, T., Giannou, A. D., Jones-Paris, C., Iwakura, Y., Kardamakis, D., Blackwell, T. S., Taraviras, S., Spella, M., & Stathopoulos, G. T. (2018). Myeloid-derived interleukin-1 β drives oncogenic KRAS-NF- κ B addiction in malignant pleural effusion. *Nature communications*, 9(1), 672
 131. Zhang, T., Chen, Y., Ge, Y., Hu, Y., Li, M., & Jin, Y. (2018). Inhalation treatment of primary lung cancer using liposomal curcumin dry powder inhalers. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 8(3), 440–448.
 132. Zahran, I., Moustafa, E., Fouda, M., Salem, F., & Omran, M. (2023). Sulforaphane Can Intensify The Antitumor Effect Of Gemcitabine By Targeting Cancer Stem Cells In Non-small Cell Lung Cancer Via Suppressing TGF- β 1/TNF- α Factor. *Egyptian Journal of Chemistry*, 66(2), 291-306
 133. Chen, X., Dai, X., Zou, P., Chen, W., Rajamanickam, V., Feng, C., Zhuge, W., Qiu, C., Ye, Q., Zhang, X., & Liang, G. (2017). Curcuminoid EF24 enhances the anti-tumour activity of Akt inhibitor MK-2206 through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in gastric cancer. *British journal of pharmacology*, 174(10), 1131–1146.
 134. Zou, P., Xia, Y., Chen, W., Chen, X., Ying, S., Feng, Z., Chen, T., Ye, Q., Wang, Z., Qiu, C., Yang, S., & Liang, G. (2016). EF24 induces ROS-mediated apoptosis via targeting thioredoxin reductase 1 in gastric cancer cells. *Oncotarget*, 7(14), 18050–18064.

EKLER

EK-1. Kobay D.H.L. A.Ş. Yerel Etik Kurul Kararı



pKOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
BAŞVURU BİLGİLERİ	Protokol Numarası	623
	Protokol Adı	Akciğer kanseri deneysel fare modelinde gemsitabin ve EF24'ün hücre sağ kalımı ve ölüm mekanizmalarına olan etkilerinin belirlenmesi
	Başvuru Tarihi	13.06.2022
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı	Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji
	Yardımcı Araştırmacılar	Ela KESEN BOZTAŞ
KARAR BİLGİLERİ	Onay Numarası	623
	Onay Tarihi	17.06.2022
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı	35 adet, erkek, Nude CD1
	Onay Bilgileri	Proje amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntem yönünden incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.
KOBAY DHL. A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ	Etik Kurul Başkanı A.Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL	e- imzalı
	Etik Kurul Başkan Yardımcısı Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Prof. Dr. Belma GÜMÜŞEL	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Doç. Dr. M. Kürşat DERİCİ	e- imzalı
	Sorumlu Veteriner Hekim Orkun TARKUN	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Biyolog Fatma Nur İNÇEH	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Hekim Murat Okan HATİPOĞLU	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Biyolog Canan ÇAKIR ÇOBAN	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Zeynep AYDIN TARAKÇI	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Adil KİŞ	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Uzman Dilem YÖYEN ERMİŞ	e- imzalı
	Etik Kurul Üyesi Ali VAROL	e- imzalı

Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.

Merkez Ofis : Uzun Çarşı Caddesi, 1308. Sokak No:6 (Odtü Teknokent) Yenimahalle - Ankara

Şube Ofis : İ.O.S.B 21.Cadde 520.Sokak No:2/2 Yenimahalle - Ankara

Telefon : 0 (312) 394 70 94 | Faks : 0(312) 995 06 94

www.kobay.com.tr- bilgi@kobay.com.tr

EK-2. Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası

	
KOBAY DENEY HAYVANLARI LAB. SAN. VE	
TİC. A.Ş.	
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU	
DENEY HAYVANLARI KULLANIM SERTİFİKASI	
Sayın ELA KESEN BOZTAŞ	
23/05/2022 - 03/06/2022 tarihleri arasında Kobay Deney Hayvanları Lab. San. ve Tic. A.Ş. HADYEK tarafından Ankara ilinde düzenlenen “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası” eğitimini başarı ile tamamlayarak A kategorisi sertifikası almaya hak kazanmıştır.	
Veteriner Hekim	
AYŞE BEGÜM BUĞDAYCI AÇIKKOL	
HADYEK Başkanı/Sorumlu Yönetici	
	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KESEN BOZTAŞ, Ela
Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı	2006
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü Ortaöğretim Alan Öğretmenliği	2005
Lisans	Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2003
Lise	50. Yıl Süper Lisesi	1999

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2009-halen	Tez İleri Teknolojiler ve Sav.San. Tic. Ltd. Şt.	Moleküler Biyoloji Birim Sorumlusu
2007-2009	Makro Sağlık	Uygulama Uzmanı
2003-2007	Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Kesen Boztaş, E., Demiröz, Ş. M., and Önen, H. İ. (2024). The mechanistic role of curcumin and itanalogs in NSCLC: An evaluation of cell death in preclinical studies. *Malignancy Spectrum*,1(4), 263-274.

Poster Bildirisi:

1. Kesen, E., Bektaş, M., Oğuz, D., İdilman, R. Bozkaya, H., ve Bozdayı, M. (2006). *Hepatit B Virüs İnfeksiyonlu Hastalarda ACE, TGF β 1, TNF α - 238, VDR 8 Gen Polimorfizmleri*. 23. Ulusal Gastroenteroloji Kongresi, İstanbul
2. Kesen, E., Bektaş, M., Oğuz, D., İdilman, R. Bozkaya, H., Yurdaydın, C., and Bozdayı, M. (2008). *Angiotensin Converting Enzyme Insertion-Deletion (ACE ID) Patterns are Associated with Outcome of Hepatitis B Virus Infection*. 18. World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologist. İstanbul (3. lük ödülü)
3. Emir, F., Kesen, E., Bektaş, M., İdilman., R., Bozdayı, M., and Yurdaydın, C. (2007). *Complete Genome Sequences and Phylogenetic Analysis of Hepatitis D Virus (HDV) Isolated from Turkish Patiesnt with Chronic HDV Infection*. American Association for The Study of Liver Disease (AASLD). United States of America.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..