



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

**DOKTORA
TEZİ**

**EF-24 VE SİSPLATİNİN APOPTOTİK ETKİLERİNİN
FARE MALİGN PLEVRA MEZOTELYOMA
HÜCRELERİNDE İN VİTRO VE İN VİVO
OLARAK BELİRLENMESİ**

İLKNUR PORSUK DORU

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

EYLÜL 2020



**EF-24 VE SİSPLATİNİN APOPTOTİK ETKİLERİNİN FARE MALİGN
PLEVRAL MEZOTELYOMA HÜCRELERİNDE İN VİTRO VE İN VİVO
OLARAK BELİRLENMESİ**

İlknur PORSUK DORU

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

EYLÜL 2020

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.

(İmza)

İlknur PORSUK DORU

07/09/2020

EF-24 VE SİSPLATİNİN APOPTOTİK ETKİLERİNİN FARE MALİGN PLEVRAL
MEZOTELYOMA HÜCRELERİNDE İN VİTRO VE İN VİVO OLARAK BELİRLENMESİ
(Doktora Tezi)

İlknur PORSUK DORU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Eylül 2020

ÖZET

Malign plevral mezotelyoma (MPM), plevranın mezotel hücrelerinden köken alan, prognozu kötü, günümüzde uygulanan tedavilere yanıtı sınırlı bir kanser türüdür. Nadir görülen bir kanser olarak tanımlanan MPM'nin insidansı son yıllarda artış göstermiştir. Bu nedenle, terapötik potansiyeli olabilecek yeni aday molekül veya ajanların belirlenebilmesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Difenil difloroketon (EF24) kurkumin analoğu sentetik bir bileşiktir. Farklı insan kanserlerinde tek başına ya da klasik kemoterapötiklerle birlikte uygulandığı çalışmalarda, EF24'ün kanser hücrelerinde programlı hücre ölümünü uyardığı belirlenmiştir. Bu tez çalışmasının amacı, EF24 ve sisplatin tek başlarına ve birlikte kullanılmasıyla apoptotik yolak üzerindeki etkilerinin değerlendirilerek terapötik potansiyelinin belirlenmesidir. Bu tez çalışmasında, EF24 ve sisplatinin farklı konsantrasyonlarda tek başlarına ve birlikte 24 ve 48 saat boyunca AB12 fare MPM hücrelerine uygulanması ile elde edilen hücre canlılık oranları MTT yöntemiyle belirlendi. 6-8 haftalık dişi BALB/c farelere, (1×10^5) AB12 hücresi subkütanöz uygulandı. Tümör gelişimi gözlenen fareler her grupta eşit sayıda olacak şekilde ($n=4$) kontrol grubu, sham I (PBS kontrol), sham II (DMSO kontrol), sisplatin, EF24 ve sisplatin+EF24 (kombine) tedavi grupları olmak üzere 6 gruba ayrıldı. Tümör dokularındaki antiapoptotik ve apoptotik yolakta görevli bazı genlerin (Bcl-2, Bcl211, Casp3, Casp8 ve Casp9) mRNA düzeyindeki ifade değişimleri nicel gerçek zamanlı PCR yöntemi ile belirlendi. Bcl-2, Bcl211 ve Casp3 protein miktarları ise ELISA yöntemi ile saptandı. MTT sonuçlarına göre EF24 uygulanan hücrelerde hücre canlılığının konsantrasyona bağlı bir şekilde, sisplatin uygulanan hücrelerde ise konsantrasyona ve zamana bağlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Sisplatin ve EF24'ün birlikte kullanımının hücrelerde sisplatinin etkisini arttırdığı belirlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kombine ve sisplatinin tek başına uygulandığı grupta, Bcl-2 mRNA ifadesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Bcl211, Casp3 ve Casp8 genlerinin mRNA ifade düzeyinde gruplar arasında ve kontrole göre bir fark belirlenmedi ($p>0.05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kombine ve sisplatinin tek başına uygulandığı grupta belirlenen Casp9 mRNA ifade düzeyindeki azalış anlamlıydı ($p<0.05$). Bcl-2 protein miktarının, kontrol ve sisplatin uygulanan gruba göre kombine grupta anlamlı olarak arttığı saptandı ($p<0.05$). Bcl211 ve Casp3 protein miktarlarında ise, gruplar arasında bir fark belirlenmedi ($p>0.05$). Çalışmamız sonucunda EF24'ün ve sisplatinin tek başına birlikte kullanımın apoptotik yolak üzerindeki etkisinin olup olmadığı gösterildi. EF24'ün in vivo olarak farklı konsantrasyonlarının araştırılmasının apoptotik yolak üzerindeki etkisinin ortaya çıkarılmasında yararlı olacağı düşünülebilir. Bu ajanın diğer hücre ölüm yolları üzerindeki etkisinin araştırılması bu ajanın terapötik potansiyelinin belirlenmesine katkı sağlayacaktır.

Bilim Kodu: 1055.1

Anahtar Kelimeler: EF24, sisplatin, malign plevral mezotelyoma, apoptoz

Sayfa adedi: 81

Danışman: Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN

DETERMINATION OF APOPTOTIC EFFECTS OF EF24 AND CISPLATIN ON MURINE
MALIGN PLEURAL MESOTHELIOMA CELLS IN VITRO AND IN VIVO

(Ph. D. Thesis)

İlknur PORSUK DORU

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

September 2020

ABSTRACT

Malign pleural mesothelioma (MPM) is a type of cancer that is rooted in the mesothelial cells of the pleura, having bad prognosis, and recalcitrant to the therapies administered nowadays. Even if it is described as a rarely seen cancer, its incidence has increased in the recent years. Hence, there is an increasing number of studies aimed at determining new candidate molecule and agents with therapeutic potential. Diphenyl difluoroketone (EF24) is a curcumin-like synthetic compound. In some studies, in which EF24 was administered either alone or in combination with the standard chemotherapeutics at various human cancers, it was seen that EF24 stimulate apoptosis. The aim of this study is the determination of therapeutic potential of EF24 and cisplatin by evaluating their effects on apoptotic pathway either alone or in combination with each other. In this thesis study, the cell viability rates that are obtained by administering EF24 and cisplatin alone and in combination for 24 and 48 hours to AB12 murine MPM cells were determined by the MTT method. AB12 cells (1×10^5) were subcutaneously administered to 6-8 week-old female mice. Tumor progression being monitored, the mice were divided into 6 groups in equal numbers ($n=4$), a control group and the treatment groups sham I (PBS control), sham II (DMSO control), cisplatin, EF24, and cisplatin+EF24 (combined). The expression variations in mRNA levels of some genes (Bcl-2, Bcl2l1, Casp3, Casp8, and Casp9), operating in the anti-apoptotic and apoptotic pathways in the tumor tissues, were determined by the quantitative real time PCR method. The amounts of proteins Bcl-2, Bcl2l1, and Casp3 were determined by ELISA method. According to the MTT outcomes, the cell viability of the EF24-administered cells decreased in a concentration-dependent manner and the cell viability of the cisplatin-administered cells decreased in a concentration- and time-dependent manner. It was also observed that combined use of cisplatin and EF24 increases the effect of cisplatin. Compared to the control group, the increases in Bcl-2 mRNA expression levels of both the combined and cisplatin-alone groups were found statistically significant ($p<0.05$). No difference was detected across groups in mRNA expression levels of the genes Bcl2l1, Casp3, and Casp8 compared to the control ($p>0.05$). Compared to the control group, the decreases in Casp9 mRNA expression levels of the combined and cisplatin-alone groups were statistically significant ($p<0.05$). It was detected that the amount of protein Bcl-2 in the combined group significantly increased compared to the control and the cisplatin-alone groups. No difference was detected in the amounts of proteins Bcl2l1 and Casp3 across groups ($p>0.05$). As a result of this study, it was shown whether or not combined and individual use of EF24 and cisplatin have any effect on the apoptotic pathway. In vivo investigation of different concentrations of EF24 is considered to be useful in revealing its effect on the apoptotic pathway. Investigation of the effects of this agent on the other cell death pathways will also contribute to the determination of its therapeutic potential.

Science Code : 1055.1

Key Words : EF24, cisplatin, malign pleural mesothelioma, apoptosis

Page Number : 81

Advisor : Assoc. Prof. Dr. Hacer İlke ÖNEN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilgisini ve deneyimlerini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ece KONAÇ'a,

Doktora eğitimim boyunca hoşgörüsü, bilgisi, becerisi, tecrübesi ve sabrıyla her daim bana yol gösteren ve yanımda olan, bilime ve insanlığa bakış açısıyla bana ilham veren, iyi bir akademisyen olmam yolunda desteklerini esirgemeyen, daima örnek alacağım değerli danışman hocam Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN'e,

Tez çalışmamın gerçekleştirilmesinde değerli katkılar sunan, bilgisini ve hoşgörüsünü esirgemeyen ve desteğini her zaman hissettiğim hocam Sayın Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a,

Benden desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Dr. Çiğdem DÖNMEZ'e ve Ana bilim Dalımız araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili annem, babam ve kardeşlerime,

Minicik kalbiyle bana çok şey öğreten ve hala öğreneceğim çok şey olduğunu hatırlatan, eşsiz bir duygu olan annelik duygusunu tattıran sevgili kızım Ayşe İzgi DORU'ya, birçok zorlu süreci beraber aştığımız, tez çalışmalarım sırasında sabrını ve desteğini esirgemeyen, her anımda yanımda olan değerli eşim, yol arkadaşım Nusret DORU'ya teşekkür ederim.

Çalışmamız Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı ve 219S168 proje kodu ile TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Programı tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Plevra.....	3
2.2. Plevra Tümörleri.....	4
2.3. Malign Plevral Mezotelyoma	5
2.3.1. Epidemiyoloji	6
2.3.2. Etiyoloji	8
2.3.3. İdiyopatik (Spontan) mezotelyoma	10
2.3.4. Patogeneze	11
2.3.5. Malign mezotelyomada görülen epigenetik değişiklikler	12
2.3.6. Histopatoloji	13
2.3.7. Prognoz	13
2.3.8. Tedavi	14

	Sayfa
2.4. Polifenoller ve Kanser	15
2.4.1. Kurkumin	16
2.4.2. EF24	17
2.5. Apoptoz	18
2.5.1. Apoptoz ve kanser	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Gereç	21
3.1.1. AB12 hücre hattı	21
3.1.2. Kullanılan cihazlar	21
3.1.3. Kullanılan sarf malzemeler	22
3.1.4. Kullanılan kimyasal malzemeler	22
3.1.5. Kullanılan kitler	23
3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı	23
3.3. Yöntemler	25
3.3.1. Hücre kültürü	25
3.3.2. MTT yöntemi ile hücre canlılığının belirlenmesi	25
3.3.3. <i>İn vivo</i> MPM fare modelinin oluşturulması	26
3.3.4. Dokuların patolojik değerlendirmesi	29
3.3.5. Tümör dokularından total RNA izolasyonu	29
3.3.6. Ters transkriptaz PCR (RT-PCR) yöntemi	30
3.3.7. Apoptotik (Casp3, Casp8, Casp9) ve anti-apoptotik (Bcl-2 ve Bcl2l1) genlerin ifadelerinin nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile değerlendirilmesi	31
3.3.8. Nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu karışımları	35
3.3.9. Tümör dokularından protein eldesi	38

Sayfa

3.3.10. Protein miktarının belirlenmesi	38
3.3.11. Kaspaz-3 miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi.....	38
3.3.12. Bcl-2 miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi	39
3.3.13. Bcl2l1 miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi	40
3.3.14. İstatistiksel analiz.....	41
4. BULGULAR	43
4.1. EF24 ve sisplatin'in AB12 hücrelerinde hücre canlılığı üzerine olan etkilerinin MTT yöntemi ile değerlendirilmesi.....	43
4.2. <i>In vivo</i> Bulgular	47
4.2.1. <i>In vivo</i> MPM fare modelinin oluşturulması.....	47
4.2.2. Dokuların patolojik değerlendirmesi.....	49
4.2.3. EF24 ve sisplatin'in anti-apoptotik (<i>Bcl-2</i> , <i>Bcl2l1</i>) ve apoptotik (<i>Casp3</i> , <i>Casp8</i> , <i>Casp9</i>) genlerin mRNA ifade düzeyleri üzerine etkisinin değerlendirilmesi..	50
4.2.4. Kaspaz-3 protein miktarının değerlendirilmesi	52
4.2.5. Bcl-2 protein miktarının değerlendirilmesi	53
4.2.6. Bcl2l1 protein miktarının değerlendirilmesi.....	54
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	65
EKLER.....	77
EK-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı.....	78
ÖZGEÇMİŞ	80

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Plevra tümörlerinin DSÖ 2015'e göre histolojik sınıflandırması	5
Çizelge 3.1. RT-PCR tepkime karışımı	31
Çizelge 3.2. cDNA sentezi için otomatik ısı döngü cihazında gerçekleştirilen program	31
Çizelge 3.3. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu için gerekli bileşenler ve miktarları	36
Çizelge 3.4. Light Cycler (LC) 480 Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu programı	37

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Plevra bölümleri ve kavitesi	4
Şekil 2.2. Kurkumin ve EF24'ün kimyasal yapısı	17
Şekil 2.3. Apoptozun içsel ve dışsal yollarının şematik gösterimi	19
Şekil 3.1. <i>In vivo</i> MPM fare modeli ve deneyin akış şeması.....	28
Şekil 3.2. <i>Casp3</i> genine ait primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	32
Şekil 3.3. <i>Casp8</i> genine ait primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	33
Şekil 3.4. <i>Casp9</i> genine ait primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	33
Şekil 3.5. <i>Bcl-2</i> genine ait primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	34
Şekil 3.6. <i>Bcl2l1</i> genine ait primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	34
Şekil 3.7. <i>Gapdh</i> genine ait primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	35
Şekil 4.1. AB12 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) sisplatin ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları	43
Şekil 4.2. AB12 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) EF24 ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.....	44
Şekil 4.3. AB12 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 24 saat EF24 ve sisplatin ile birlikte inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.....	45
Şekil 4.4. AB12 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat sisplatin ile birlikte inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları	45
Şekil 4.5. AB12 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat EF24 ile birlikte inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları	46
Şekil 4.6. AB12 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat EF24 ve sisplatin ile birlikte inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları.....	47
Şekil 4.7. Anti-apoptotik (<i>Bcl-2</i> , <i>Bcl2l1</i>) ve apoptotik (<i>Casp3</i> , <i>Casp8</i> , <i>Casp9</i>) genlerin	

Şekil	Sayfa
mRNA ifade düzeylerinde görülen değişiklikler	51
Şekil 4.8. Tümör dokularındaki kaspaz 3 miktar değişimleri.....	52
Şekil 4.9. Tümör dokularındaki bcl-2 miktar değişimleri	53
Şekil 4.10. Tümör dokularındaki bcl2l1 miktar değişimleri.....	54

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. AB12 hücrelerinin farelere sağ taraftan s.c. enjeksiyonu (a) ve farede tümör oluşumu (b).....	48
Resim 4.2. Fareye uygulanan i.p. enjeksiyon	48
Resim 4.3. Tümör rezeksiyonları.....	49
Resim 4.4. Epitelyal ve sarkomatöz alanlar içeren bifazik mezotelyoma	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

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

Kısaltmalar**Açıklamalar**

AAMR	Age adjusted mortality rate (yaş ayarlı ölüm Oranı)
AB12	Fare malign mezotelyoma hücre hattı
ABD	Amerika birleşik devletleri
AKT	Protein kinase B (Protein kinaz B)
AMV	Avian myeloblastosis virüs (Avian myeloblastosis Virüsü)
APC	Adenomatoz polipozis coli
B16	Fare melanoma hücre hattı
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)
BCL2L1	BCL2-like 1 (BCL2 benzeri 1)
BH	BCL-2 homoloji
BSA	Bovine serum albümin (Sığır serum albümini)
BxPC-3	İnsan pankreas kanser hücre hattı
CACO-2	İnsan epitel kolorektal adenokarsinom hücreleri
Casp3	Caspase 3 (Kaspaz 3)
Casp8	Caspase 8 (Kaspaz 8)
Casp9	Caspase 9 (Kaspaz 9)
CCND2	Cyclin D2 (Siklin D2)
CDDP	Cisplatin
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid (Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit)
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A (Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A)
CDKN2B	Cyclin dependent kinase inhibitor 2B (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2B)
DEPC	Dietilpirokarbonat

Kısaltmalar**Açıklamalar**

DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DMM	Difüz malign mezotelyoma
DMSO	Dimethyl sulfoxide (Dimetil sülfoksit)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoksiribonükleik asit)
DNaz	Deoksiribonükleaz
DNTM	Deoxyribonucleic acid methyltransferase (Deoksiribonükleik asit metiltransferaz)
DNTM1	Deoxyribonucleic acid methyltransferase 1 (Deoksiribonükleik asit metiltransferaz 1)
DNTM3a	Deoxyribonucleic acid methyltransferase 3a (Deoksiribonükleik asit metiltransferaz 3a)
DNTM3b	Deoxyribonucleic acid methyltransferase 3b (Deoksiribonükleik asit metiltransferaz 3b)
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate (Deoksiribonükleik asit trifosfat)
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
DTT	Dithiothreitol (Ditiotreitol)
EF24	Difenil difloroketon
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (Enzim bağlı immünosorbent deneyi)
ERK	Extracellular signal regulated kinase (Hücre dışı sinyal düzenlenmiş kinaz)
FBS	Fetal bovine serum (Fetal sığır serumu)
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrojenaz)
HAT	Histone acetyltransferase (Histon asetiltransferaz)
HDAC	Histone deacetylase (Histon deasetilaz)
HE	Hematoksilen eozin boyama
HRP	Horseradish peroxidase (Yaban Turpu Peroksidazı)
IARC	International agency for research on cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı)

Kısaltmalar**Açıklamalar**

IC₅₀	Inhibitory concentration 50 (İnhibitör konsantrasyon 50)
İ.p.	Intraperitoneal
LC	Light cyclers
MCL1	Myeloid cell leukemia 1 (Miyeloid hücre 1)
MPM	Malign plevral mezotelyoma
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Mesajcı ribonükleik asit)
MS	Milattan sonra
MS-275	Entinostat
MSTO-21H	İnsan malign mezotelyoma hücre hattı
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (Metiltiyazoldifenil-tetrazolyum bromid)
n	Gözlem sayısı
NF-κB	Nuclear factor kappa B (Nükleer faktör kappa B)
OD	Optical density (Optik yoğunluk)
P	P-değeri
PBS	Phosphate buffered saline (Fosfat Tamponlu Tuz)
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PEM	Pemetrexed (pemetrekset)
PI3K	Phosphoinositide 3 kinase (Fosfoinositid 3 kinaz)
PMN	Polymorphonuclear leukocyte (Polimorfonükleer lökosit)
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction (Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu)
RASSF1	Ras association domain-containing family member 1 (Ras ilişkili alan içeren protein ailesi 1)
REST	Relative expression software tool (Görelî ifade yazılım aracı)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonükleik asit)
RNaz	Ribonükleaz

Kısaltmalar**Açıklamalar****ROS**

Reactive oxygen species (Reaktif oksijen türleri)

RT-PCR

Reverse transcription poymerase chain reaction (Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu)

RTK

Receptor tyrosine kinases (Reseptör tirozin kinaz)

S.C.

Subkütanöz

SEER

Surveillance, epidemiology, and end results

SV40

Simian virüs 40

ODTÜ

Ortadoğu Teknik Üniversitesi

UPL

Universal probe library

1. GİRİŞ

Malign plevral mezotelyoma (MPM) prognozu kötü ve tedaviye dirençli bir kanser türüdür. Hastaların ortalama yaşam süresi 9-12 ay arasında değişmektedir. 5 yıldan fazla yaşayan hasta sayısı %5' den azdır. MPM nadir görülen bir kanser olarak tanımlanırken, son yıllarda ise insidansının tüm dünyada arttığı belirlenmiştir. Dünya sağlık örgütü, 1994-2008 yılları arasında yaşa göre düzeltilmiş MPM mortalite hızını milyonda 4.9 olarak saptamıştır. Ülkemizde ise, 2013-2033 yılları arasında 2511 yeni olgunun görülmesi beklendiği bildirilmiştir.

MPM gelişiminde çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır. Asbest, erionit, simian virüs 40 ve radyasyon bu risk faktörleri arasında sayılabilir. Bu risk faktörleriyle herhangi bir ilişkinin gözlenmediği olgular, idiyopatik (spontan) MPM olguları olarak sınıflandırılmaktadır. Sanayileşmiş ülkelerde idiyopatik MPM olgularının görülme sıklığının artışı gözlenmiştir.

Günümüzde MPM tedavisinde, cerrahi, kemoterapi ve radyoterapiyi içeren birleştirilmiş tedavi rejimi en iyi uzun dönem sonuçları sağlamaktadır. Artan insidans ve kötü prognozu göz önünde bulundurulduğunda, yeni tedavi stratejileri geliştirmek için MPM'nin moleküler patogenezi ile ilgili ek çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Sisplatin gibi tek bir ajanla kemoterapi MPM'nin tedavisinde kullanılsa da sisplatinin pemetreksed veya raltitrekset gibi kemoterapötiklerle birlikte kullanılması ortalama sağ kalımı arttırmaktadır. Bununla birlikte, kemoterapötiklerin yeni ilaçlar veya moleküllerle birlikte kullanılması araştırmaları MPM'nin tedavisine klinik yararlar sağlayacaktır.

Bir kurkumin analogu olan difenil difloroketon (EF24) antikanser çalışmalarında etkinliği araştırılan bir bileşiktir. Kurkumine göre biyoyararlanımının daha fazla olduğu belirtilmiştir. Çeşitli kanserlerde hücre çoğalması, apoptoz ve metastaz üzerinde *in vitro* ve *in vivo* etkisi gösterilmiştir. Ancak, bu ajanın *in vivo* olarak MPM' de apoptotik yollar üzerindeki etkisinin belirlenmesine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu doktora tez çalışmasının amacı; EF24'ün tek başına ve klasik kemoterapötik olan sisplatinle birlikte uygulandığında AB12 MPM hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerinin olup olmadığının *in vitro* ve *in vivo* şartlarda belirlenmesidir. Buna ek olarak, MPM' de sisplatin ile uyarılan apoptozun üzerine EF24'ün etkisinin belirlenmesi ile ilgili olarak *in vivo* şartlarda şimdiye kadar çalışılmadığı için bu çalışma ayrı bir önem arz etmektedir. Bir diğer amacımız ise, apoptotik yollarda yer alan molekülleri protein düzeyinde araştırıp bu ajanların birlikte uygulamalarının terapötik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesidir.

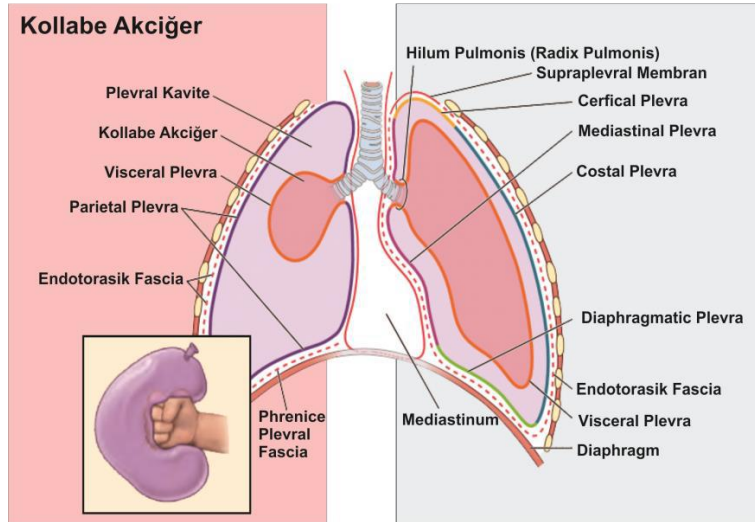
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Plevra

Plevra, akciğer parankimi, mediasten, diyafram ve göğüs kafesini kaplayan seröz bir membrandır (Wang, 1998). Plevranın görevi solunum sırasında akciğerlerin sorunsuz hareket etmesini sağlayan pürüzsüz, kaygan yüzeyler sağlamaktır. Visseral plevra ve pariyetal plevra olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadır (Jones, 2001). Visseral plevra, interlober fissürler dâhil akciğerlerin tüm dış yüzünü sararken, pariyetal plevra da göğüs kafesi, mediasten ve diyaframın iç yüzeyini kaplar. Kapladığı yüzeylere göre, kostal, mediastinal, servikal ve diyafragmatik pariyetal plevra bölümlerini içermektedir (Şekil 2.1). Kostal plevra göğüs duvarının ön, yan ve arka kısımlarını sararken, diyafragmatik plevra diyaframın üst yüzeyini, mediastinal plevra mediastinumun dış duvarını, servikal plevra ise akciğerlerin apeks bölgesini örter (Yalçın ve diğerleri, 2013).

Hem visseral hem de pariyetal plevra, tek katlı bir mezotel hücre tabakası, bazal membran, kollajen ve elastik doku tabakalarından ve bunlara ek olarak kılcal damarlar ile lenfatiklerden oluşur (Sahn, 1988). Mezotel hücreleri pleomorfiktir. Yassı, küboidal veya silindirik şekle sahiptir. Morfolojilerindeki farklılıklara rağmen bulundukları her yerde tek tabaka halinde bulunurlar. Mezotel hücrelerin kalınlığı 1-4 μm , yüzey çapı ise 16-40 μm arasında değişmektedir. Mezotel hücresi, yaklaşık olarak 0,1 mm çapında ve en fazla 3 μm uzunluğunda yüzey mikrovillusları içerir (Wang, 1974). Visseral plevradaki mikrovillus yoğunluğu pariyetal plevradakinden daha yüksektir. Muhtemelen akciğer ve göğüs duvarı arasındaki sürtünmeyi azaltmak için visseral plevrada daha yüksektir (Andrews ve Porter, 1973). Mezotelyum (mezotel hücre tabakası) birçok önemli işleve sahip dinamik bir hücresel membrandır. Sıvı ve partikül maddenin plevral yüzeyler boyunca hareketi ve taşınması; inflamatuvar medyatörlere cevap olarak lökosit göçü; sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve hücre dışı matris proteinlerinin sentezi; fibrin biriktirme ve temizlemesini uyaran faktörlerin salınımı ve antijen sunumu mezotelyumun işlevleri arasında bulunmaktadır (Mutsaers, 2002).

Visseral ve pariyetal plevra tabakaları arasında 10-20 μm genişliğinde plevral boşluk veya plevral kavite denilen bir alan bulunmaktadır (Wang, 1998). Plevral boşlukta, hacmi normal şartlar altında çoğu memelide 0,1-0,2 ml/kg olan plevra sıvısı denen berrak görünümlü bir sıvı bulunmaktadır. 1,5 g/dl'den az protein konsantrasyonuna sahip olan bu sıvı 1500 adet / μl hücre içermektedir. Bu hücreler, monositler baskın olmakla birlikte, az sayıda lenfosit, makrofaj, mezotel hücresi ve polimorfonükleer lökositlerdir (PMN). Eritrositler bulunmamaktadır (Stauffer ve diğerleri, 1978).



Şekil 2.1. Plevra bölümleri ve kavitesi (Moore ve diğerleri, 2018).

2.2. Plevra Tümörleri

Plevra tümörleri, Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2015 sınıflandırmasında (Travis ve diğerleri, 2015) mezotelyal tümörler, lenfoproliferatif hastalıklar, mezenkimal tümörler olmak üzere 3 ana gruba ayrılarak incelenmektedir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Plevra tümörlerinin DSÖ 2015'e göre histolojik sınıflandırması

MEZOTELYAL TÜMÖRLER	LENFOPROLİFERATİF HASTALIKLAR	MEZENKİMAL TÜMÖRLER
1. Difüz Malign Mezotelyoma A) Epiteloid Mezotelyoma B) Sarkomatoid Mezotelyoma B.1) Desmoplastik Mezotelyoma C) Bifazik Mezotelyoma 2. Lokalize Malign Mezotelyoma A) Epiteloid Mezotelyoma B) Sarkomatoid Mezotelyoma C) Bifazik Mezotelyoma 3. İyi Diferansiye Papiller Mezotelyoma 4. Adenomatoid Tümör	1. Primer Effüzyon Lenfoması 2. Kronik İnflamasyonla İlişkili Diffüz Büyük B Hücreli Lenfoma	1. Epiteloid Hemanjioendotelyoma 2. Anjiosarkom 3. Sinoviyal Sarkom 4. Soliter Fibröz Tümör A) Malign Soliter Fibröz Tümör 5. Desmoid Tip Fibromatozis 6. Kalsifiye Fibröz Tümör 7. Desmoplastik Yuvarlak Hücreli Tümör

2.3. Malign Plevral Mezotelyoma

Malign mezotelyoma, plevra, periton, perikard ve tunika vajinalisin de dâhil olduğu vücut boşluklarını kaplayan, yüzeylerin üzerinde dağınık bir şekilde büyüyen ve DSÖ tarafından mezotelyal hücrelerden kaynaklanan malign bir neoplazma olarak tanımlanmaktadır (Travis ve diğerleri, 2004). Malign plevral mezotelyoma (MPM) pariyetal plevranın ve

visseral plevranın herhangi bir yerinde görülebilmesine karşın, visseral plevrada yaklaşık %80, pariyetal plevrada ise %20 oranında görülür (Mery ve diğerleri, 2014). Plevral tümör ilk olarak 1767'de Joseph Lieutand tarafından rapor edilmiş olmakla birlikte mezotelyomanın mevcudiyeti ilk kez 1931'de Klemperer ve Rabin tarafından tanımlanmıştır (Ribak ve diğerleri, 1988). Ayrı bir kanser olarak yaygın olarak kabul edilmesi neredeyse 30 yıl sürmüştür. Mezotelyoma asbest ilişkisini gösteren ilk çalışma Wagner, Sleggs, ve Marchand, (1960) tarafından yayınlanmıştır. Çalışmada mezotelyomanın, krosidolit asbest madeni alanında yaşayan veya çalışan insanlarda çok yaygın olduğu belirtilmiştir.

2.3.1. Epidemiyoloji

2000'li yılların başından itibaren yapılan epidemiyolojik çalışmalarda 70 yaş ortalamasında mezotelyomanın dünya genelinde bir yılda 43.000 ölümden sorumlu olduğu tahmin edilmiş ve ölümlerin sanayileşmiş ülkelerde daha yaygın olduğu belirtilmiştir (Delgermaa ve diğerleri, 2011). DSÖ'nün verilerine göre (1994–2008 yılları arasında), yaş ayarlı ölüm oranının (AAMR) yıllık %5,4'lük artışla milyonda 4,9 olduğu belirtilmiştir (Delgermaa ve diğerleri, 2011). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) verilerine göre 1988-2002 yılları arasında 120.544 yeni malign mezotelyoma olgusu bildirilmiştir. Bu olguların %58'i Kuzey Amerika bölgesinde, %33'ü Avrupa bölgesinde, %5'i Okyanusya bölgesinde ve %3'ü ise Asya bölgesinde görülmüştür (Soeberg ve diğerleri, 2013).

2018 yılında yayınlanan 2018 globacon kanser istatistikleriyle ilgili makalede dünya çapında 30.443 yeni mezotelyoma olgusunun belirlendiği, 25.576 kişide ise mezotelyoma kaynaklı ölüm görüldüğü belirtilmiştir (Bray ve diğerleri, 2018). Bu tümör tipinin tanısındaki zorluklar nedeniyle, malign mezotelyoma tanısı almış her dört birey için diğer bir bireyin belirlenemediği tahmin edilmektedir. Asbest tüketimi bilinen ülkelerde hastalık raporlama uygulamalarındaki eksiklikler nedeniyle, 1984-2008 yılları arasında Rusya ve Doğu, Güney ve Orta Asya'da yaklaşık 39.000 olgunun eksik bildirildiği belirtilmiştir. Dünya genelinde, MPM insidansı yirminci yüzyılın ortasından bu yana artmaya devam etmekte olup, bu artışlar en fazla Avustralya ile İngiltere'de belgelenmiştir (Park ve diğerleri, 2011). İngiltere'de mezotelyomadan kaynaklanan yıllık ölüm sayısı, 1968'de 153

iken bu sayı 2000'de 1.631'e ve 2001'de 1.848'e yükselmiştir (<http://qix.sagepub.com/cgi/reprint/9/6/859>, 2004). İngiltere'de kaydedilen son verilerde, 1980 ve 2009 yılları arasında erkeklerde görülme sıklığında beş kat artış olduğu ve yıllık insidansının milyonda 29 olduğu belirtilmiştir (Robinson, 2012). Amerika Birleşik Devletleri, İngiltere ve Japonya'da yıllık 5.000 'den fazla kişi MPM tanısı almaktadır. MPM' nin, erkeklerde görülme oranı kadınlardan fazladır (%90'a karşılık %10) (Tischoff ve diğerleri, 2011). Batı toplumlarında malign mezotelyoma, olgu sayısında artış beklenen ve önümüzdeki 20-30 yıl içinde tahmini 300 milyar dolara mal olacak bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Amerika, İngiltere, İtalya ve Güney Kore' de gelecekteki MPM insidansını tahmin eden çalışmalar yürütülmüştür. Güney Kore Çevre Bakanlığı MPM olgu sayısının 2045 yılında zirve yapacağını tahmin etmiştir (Kwak ve diğerleri, 2017). Amerika' da yapılan araştırmada, 2008-2042 yılları arasındaki toplam olgu sayısının 68.000 olarak beklendiği ifade edilmiştir (Price ve Ware, 2009). İngiltere' de ise, 1968-2050 yılları arasında, yaklaşık 90.000 ölüm olacağını ve bunun 65.000 'inin 2001' den sonra gerçekleşeceğini belirtmişlerdir (Hodgson ve diğerleri, 2005). İtalya' da ise, MPM olgularının 2020–2024 döneminde (yaklaşık 7.000 olgu) zirveye ulaşacağı, bu dönemden sonra düşüş yaşanacağı, 2020–2039 yılları arasında İtalya' da yaklaşık 26.000 MPM olgusunun beklendiği tahmin edilmiştir (Oddone ve diğerleri, 2020). Ülkemizde Türkiye Mezotelyoma Çalışma Grubu ve Türk Halk Sağlığı Kurumu tarafından tasarlanan Türkiye Mezotelyoma Sürveyansı ve Çevresel Asbest Teması Kontrol Programı kapsamında yapılan araştırmanın 2017 yılında yayınlanan sonuçlarına göre 2008-2012 yılları arasında 5.617 yeni olgu tanımlanmıştır. 2013-2033 yılları arasında ise, çevresel asbest maruziyetinin devam etmesi nedeniyle, kırsal kesimlerde yaşamakta olan 158.068 kişiden 2.511' nin MPM tanısı alabileceği tahmin edilmiştir. Ülkemizde sanayi kaynaklı (çevresel asbest maruziyeti sonucu) hastalığın görülme yaşı daha erken olup ortalama $61,7 \pm 13,4$ 'dür (Metintaş ve diğerleri, 2017).

Mezotelyoma, hastalığın başlangıcı ile ilk maruziyetten bu yana geçen süre arasındaki uzun inkübasyon süresinden dolayı hemen ortaya çıkmamaktadır. Bu tipik olarak 30 yıldan daha fazla sürmekte olup, yaklaşık 15 yıllık inkübasyon süreleri de tanımlanmıştır (Robinson ve diğerleri, 2005). Hastalığın uzun inkübasyon süresinden dolayı genel olarak

50-70 yaş arasındaki kişilerde görülmekle birlikte, çocukluk çağında da nadir olarak olgular görülmektedir.

DSÖ ve diğer uluslararası kuruluşların inşaat ve üretimde asbest kullanımını durdurma beyanlarına rağmen, gelişmekte olan ülkeler, özellikle de hızlı sanayileşmeye uğrayan Asya ülkeleri, asbest kullanmaya devam etmektedir. Gelişmekte olan ülkelere, yaklaşık 125 milyon insanın asbeste maruz kaldığına inanılmakta ve bu nedenle malign mezotelyoma insidansının da artacağı beklenmektedir (Park ve diğerleri, 2012).

2.3.2.Etiyoloji

MPM'nin asbest ve erionit maruziyeti ile yüksek derecede ilişkili olduğu bilinmektedir. Bu iki faktör MPM etiyojisinde önemli derecede rol oynamaktadırlar. Bunlara ek olarak simian virüs 40 (SV40), radyasyon, genetik yatkınlık gibi faktörler de MPM için risk faktörleri arasında yer almaktadır (Carbone ve diğerleri, 2002). Ayrıca, bilinen risk faktörlerine maruziyeti olmayan olgular spontan (idiyopatik) mezotelyoma grubunu oluşturur (Attanoos ve diğerleri, 2018).

Asbest

MPM'li olguların yaklaşık %80'i asbest maruziyeti ile ilişkilidir (Robledo ve Mossman, 1999). Asbest ile MPM arasındaki ilk ilişki 1960 yılında Wagner tarafından Güney Afrika'daki 33 mezotelyoma olgusunda tanımlanmıştır (Wagner ve diğerleri, 1960). Ülkemizde ise ilk defa asbest ve MPM arasındaki ilişki Yazıcıoğlu, Ilcayto, Balcı, Saylı ve Yorulmaz (1980) tarafından bildirilmiştir. Barış, Simonato, Saracci, Skidmore ve Artvinli (1981) ise, erionit ile MPM arasındaki ilişkiyi Ürgüp ve çevresinde yaptıkları araştırmalarıyla göstermişlerdir. Çevresel asbest teması ülkemizdeki MPM'nin en önemli sebebidir. Amyant olarak da bilinen asbestin birçok kullanım alanı mevcuttur. Isıtma boruları, çatı malzemeleri, su borusu kaplamaları, çimento yapımı, kanalizasyon boruları gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır (Şenyiğit ve diğerleri, 2000).

Asbest terimi altı tip doğal fibröz silikatın genel adını ifade etmektedir. 20. yüzyılda neredeyse tamamen yasaklanmadan önce batı sanayisinde geniş çaplı kullanımı

görülmüştür. Bunun yanı sıra iyi malzeme ve cazip fiyat özelliklerinden dolayı gelişmekte olan bazı ülkelerde hala kullanımına devam edilmektedir. Asbest olarak sınıflandırılan mineraller serpentin ve amfibol olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadır. Serpentin grubunun temel üyesi beyaz asbest olarak da bilinen krizotildir. Amfibol grubu ise krosidolit (mavi asbest), amosit (kahverengi asbest), antofilit, aktinolit ve tremolitten oluşmaktadır (Baumann ve diğerleri, 2013). Amfibol grubundaki asbest lifleri serpentin grubundakilerle karşılaştırıldığında, daha uzun, sert ve yıkıma daha dirençlidirler. Krizotilin solunması üzerine biyolojik yayılma nispeten düşüktür ve lifler akciğerlerden oldukça hızlı bir şekilde temizlenir. Buna karşılık amfibol lifleri, kümülatif maruziyetle orantılı olarak lif konsantrasyonuna bağlı şekilde dokularda daha uzun süre kalır (Britton, 2002). Amfibol lifleri hücrel enzimler tarafından sindirime karşı daha dirençlidir ve akciğerlerde birikir (Carbone 2002).

Yalnızca mesleki asbest teması söz konusu olmayıp çevresel asbest maruziyeti de MPM gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Isı ve su yalıtım özelliklerinden dolayı ülkemizde evlerin çatılarında veya duvarlarında ak toprak ya da geven toprak adıyla asbestli toprak kullanılmaktadır (Metintaş, 2014).

Erionit

Erionit, doğal olarak oluşan asbest olmayan bir zeolittir. 1975-1978 yılları arasında Türkiye'nin İç Anadolu Bölgesi'nin köylerinde ölümlerin %50'sinin mezotelyoma kaynaklı olmasıyla 1979 yılında bölgedeki kaya ve toz örneklerinin incelenmesi sonucu çapı 0,25 μM 'den küçük ve 5 μM uzunluğa kadar erionit liflerinin varlığı belirlenmiştir. Barış ve diğerleri (1987) Anadolu'daki Karain, Karlık ve Sarıhıdır köylerinde yaptıkları araştırmada solunabilir erionit liflerinin köy sokaklarında toz bulutlarının %20-80'ini oluşturduğunu ve yüksek maruziyet düzeylerinin mezotelyoma kaynaklı mortalite ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Kemirgenlerde yapılan *in vitro* ve *in vivo* inhalasyon çalışmaları erionitin potansiyel kanserojenliğini doğrulamıştır (Allen, 2015).

Simian virüs 40

SV40, genellikle Asya makak maymunlarını enfekte eden bir DNA polyoma virüsüdür (Attanoos ve diğerleri, 2018). İnsanların SV40' a büyük ölçekte maruziyeti, 1956-1966 arasında, Avrupa, İngiltere ve ABD'de, maymun böbrek hücre kültürlerinde üretilen kontamine polio aşılarının yaygın olarak dağıtılması sonucu ortaya çıkmıştır (Allen, 2015). SV40 enfeksiyonu ile mezotelyoma onkogenezi arasındaki ilişki, 1960'lı yıllardaki gözlemlerde ortaya çıkarılmıştır. Bu gözlemlerde SV40' ın kemirgenlerde onkojenik olduğu belirtilmiştir. Cicala, Pompetti ve Carbone, (1993) tarafından yapılan çalışmada intraplevral, intraperitoneal veya intrakardiyak canlı SV40 enjeksiyonuna maruz kalan hamsterlerin %70'inde plevral veya peritoneal mezotelyoma geliştiği gösterilmiştir.

Radyasyon

Toraks veya karına radyasyon ya da intravasküler olarak radyoaktif bileşik toryum dioksit parçacıklarını içeren bir süspansiyon olan thorotrastı alan hastalarda mezotelyomanın geliştiği birkaç olgu bildirilmiştir (Roggli ve diğerleri, 1992). Ancak, bunlarda da asbest veya diğer etiyolojik faktörler göz ardı edilmemiştir. Wilm's tümörü nedeniyle çocukluk çağında yoğun radyoterapi alan genç erişkinlerde gelişen mezotelyoma için radyasyon, tek olası nedensel faktör olarak gösterilmiştir (Austin ve diğerleri, 1986). Ratlarla yapılan çalışmalarda radyasyona maruz kalmanın mezotelyomaya sebep olabileceği gösterilmiştir. Yoğun radyasyona maruz kalmanın mezotelyomaya neden olabileceği fikrini desteklemekle birlikte radyasyonun neden olduğu toplam MPM olgu sayısı düşüktür (Carbone, 2002).

2.3.3. İdiyopatik (spontan) mezotelyoma

Asbest maruziyeti dışında yukarıda tartışılan tüm etiyolojiler mezotelyomaların küçük bir kısmını karşılamaktadır. Asbest maruziyetinin neden olduğu mezotelyomadan sonra spontan (idiyopatik) mezotelyoma en büyük paya sahiptir. Kadınlarda malign mezotelyoma ile asbestin ticari formlarının tarihsel kullanımı arasında zamansal bir ilişkinin olmaması (ABD'li kadınlarda 1973'ten 2008'e kadar yaş ayarlı mezotelyoma insidansı istikrarlı olmuştur) (Jane ve diğerleri, 2013) mesleki asbestle ilişkili

mezotelyomalar için bilinen latent sürenin altındaki yaşta olan çocuklarda mezotelyomaların ortaya çıkması (Fraire ve diğerleri, 1988), kapsamlı araştırmalar ve mineral analizi yoluyla liflerin saptanabilmesine rağmen asbest maruziyeti öyküsü olmayan kişilerde malign mezotelyoma olgularının görülmesi ve laboratuvar hayvanlarında malign mezotelyoma dâhil olmak üzere çeşitli tümörlerin spontan oluşumu asbest ile ilgisiz bir şekilde ortaya çıkan spontan mezotelyomalara kanıt olarak gösterilmektedir (Attanoos ve diğerleri, 2018).

Jane ve diğerlerinin (2013) 2003-2008 yılları arasında teşhis edilen MPM olguları ile SEER ve Ulusal Kanser Kayıtları Programının verilerini birleştirerek yaptıkları araştırmada, kadınlarda MPM insidansının sabit olduğunu, erkeklerde görülme oranının düşmeye devam ettiğini saptamışlardır. Ayrıca, olguların %51'inde anatomik bölgeden bağımsız olarak 45 yaş altında görülen MPM'nin kadınlarda erkeklerden daha sık olduğunu görmüşlerdir.

2.3.4. Patogenez

Asbest lifleri soluma şeklinde vücuda alınır. Asbest lifleri alveolar bölgeye ulaştığında, vücudun ilk tepkisi bu lifleri fagositoz aracılığıyla uzaklaştırmaya çalışmaktır. Asbest lifinin boyu alveolar makrofajlar tarafından kolaylıkla fagosit edilebilecek kadar kısa ise fagositoz yoluyla akciğerden etkin bir şekilde uzaklaştırılır. Ancak, lif uzun ve çözünür değilse uzaklaştırılamaz. Amfibol grubu asbest çözünür özellikte değildir. Bunlara ek olarak, kısa boylu liflerde de solunan lifin miktarı pulmoner savunma mekanizmasını baskılayacak kadar fazlaysa uzaklaştırılamadıkları için akciğerde birikir. Asbest lifleri, plevraya lenfatikler veya doğrudan penetrasyon yoluyla ulaşabilirler ve sonuç olarak fibrozis, plevral plaklar ve nihayetinde mezotelyomaya neden olabilirler. Asbest, doğrudan fiziksel etkileşim yoluyla veya asbeste yanıt olarak inflamatuvar hücreler tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) dolaylı etkisiyle DNA hasarına neden olur (Xu ve diğerleri, 2002). İnsan mezotel hücreleri, asbest sitotoksitesine karşı çok hassastır. Bu nedenle, asbest maruziyeti ve tümör gelişimi arasındaki süre boyunca birçok patogenetik olay mezotelyoma gelişimine katkıda bulunmaktadır.

Asbest nedenli MPM'nin moleküler mekanizmaları tanımlanmasına karşın, idiopatik MPM oluşumunda yer alan moleküler mekanizmaların aydınlatılmasına yönelik *in vitro* ve *in vivo* araştırmalar sürmektedir.

2.3.5. Malign mezotelyomada görülen epigenetik değişiklikler

Epigenetik mekanizmalardaki değişiklikler gen ifadesinde değişikliklere neden olduğundan MPM gelişimine sebep olabilmektedir. DNA metilasyonu, düzenleyici proteinlerin DNA'ya bağlanmasının modülasyonu ile genin sessizleşmesine yol açmaktadır (Vandermeers ve diğerleri, 2013). Tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu, onkogenlerin hipometilasyonu ve tekrarlayan elementlerin hipometilasyonu gibi DNA metilasyonları onkogeneze neden olabilmektedir. DNA metilasyonuna, DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) aracılık eder. DNA metilasyonunda rol oynayan üç ana DNMT (DNMT1, DNMT3a ve DNMT3b) bulunmaktadır (Holliday, 1990). 158 mezotelyoma, 18 normal plevra örneğinde kanserle ilişkili 803 genin DNA metilasyonunun karşılaştırıldığı çalışmada, normal plevra ile mezotelyoma örneklerinin DNA metilasyon profilleri arasında farklılıklar belirlenmiştir (Christensen ve diğerleri, 2009). Diğer bir çalışmada ise, 70 MPM örneğinde hücre döngüsü kontrol yolu tümör baskılayıcı genlerinin analizi yapılmış ve APC, CCND2, CDKN2A, CDKN2B, HPPBP1 ve RASSF1 promotörlerinin hipermetile olduğu gösterilmiştir (Christensen ve diğerleri, 2008). DNA metilasyonunun yanı sıra, histonlar ve transkripsiyon sonrası modifikasyonlar kromatin yapısını etkilemektedir. Lizin asetilasyonu ve metilasyonu gibi modifikasyonlar, kromatinin yoğunlaşmasını etkilemekte olup, histonların etkileşimini düzenlemektedir. Histon asetilasyonu ise, lizinin pozitif yükünü nötralize ederek DNA ve histonlar arasındaki etkileşimi zayıflatmaktadır. Histon asetilasyonu sonucu, transkripsiyonu düzenleyici proteinler DNA'ya bağlanabilir (Vandermeers ve diğerleri, 2013). Histon asetilasyonuna, histon asetiltransferaz (HAT)'lar aracılık ederken tam tersi olan deasetilasyon süreci ise histon deasetilaz (HDAC)'lar tarafından katalize edilir (Grotinger ve Schreiber, 2002). HDAC'lar tarafından kromatin yoğunlaşmasının kolaylaştırılması gen transkripsiyonunu önler. Tümör baskılayıcı genlerin heterozigosite kaybıyla sonuçlanır. Bu durum apoptozu, hücre döngüsünün durmasını ve anjiyogenezin baskılanmasını etkilemektedir. MPM hücre hatlarında ve fare ksenograft modellerinde HDAC

baskılanmasının etkinliğini vurgulayan prelinik çalışmalar mevcuttur (Bolden ve diğlerleri, 2006).

2.3.6. Histopatoloji

DSÖ, histolojik tiplerine göre MPM'yi epitelyal (epitelioid), sarkomatöz (sarkomatoid) ve bifazik (miks) olmak üzere 3 gruba ayırmıştır (Travis ve diğlerleri, 2015). MPM olgularının %50'sinde epitelyal tip, %35'inde bifazik tip ve %15'inde ise sarkomatoid tip görölmektedir (Attanoos ve Gibbs, 1997). Histolojik olarak en sık görölen epitelyal tipin çok çeşitli morfolojik paternleri belirlenmiştir. En sık rastlananları ise tubulopapiller, solid ve adenomatoid (mikroglandüler) tip paternlerdir. Bazen bir patern baskın olabilirken, aynı tümörde yaygın olarak birkaç farklı patern de görölebilmektedir. Daha az yaygın paternler arasında küçük hücreli, berrak hücreli ve desiduoid tip bulunmaktadır (Galateau, 2006). İğli fibrosarkom benzeri hücrelerin varlığı ile tanımlanan sarkomatoid MPM, en agresif alt tip olup, genellikle tedaviye karşı oldukça dirençlidir; bu nedenle prognozu kötüdür (Favoni ve Florio, 2011). Bifazik alt tip epitelioid ve sarkomatoid özelliklere sahiptir. Adından da anlaşılacağı gibi hem epitelioid hem de sarkomatoid hücreleri içermekte olup, prognozu genellikle iki tip arasında orta düzeydedir. Difüz malign mezotelyoma'nın (DMM) yaklaşık %35'ini oluşturan bifazik tip MPM hastalarında sıklıkla tanımlanmaktadır (Allen, 2015).

2.3.7. Prognoz

MPM olguları ağırlıklı olarak 65 yaş üstünde görölmekle birlikte hastalık her yaşta ortaya çıkabilir (Acton, 2014). MPM, malignitesi yüksek, agresif bir kanser olarak tanımlanmıştır. Eğer tedavi edilmezse, hastaların ortalama hayatta kalma süresi yaklaşık 9 ile 12 ay arasındadır. Hastaların oğ, tümörün lokal istilasından veya kontralateral metastazından ölmektedir (Jaklitsch ve diğlerleri, 2001). Yapılan araştırmalarda yaş, cinsiyet, tümör histolojisi ve evresi gibi özelliklerin hastalığın prognozunu etkilediğı belirtilmiştir (Van der Bij, 2012). Prognostik faktörler hastalardaki sağkalımı ve terapötik stratejiyi önemli ölçüde etkilemektedir.

2.3.8. Tedavi

Cerrahi, kemoterapi, radyoterapi ve moleküler hedefe yönelik ajanların uygulanması MPM'nin tedavisinde kullanılan başlıca yöntemlerdir. Sağkalımı uzatmak ve yan etkileri azaltmak için bu tedaviler birlikte de kullanılabilirlerdir.

Kemoterapi ve/veya radyoterapi ile kombine bir şekilde de kullanılan cerrahi tedavinin amacı malign hücreleri yok etmeye çalışmaktır. Ağrıyı azaltarak ve plevral efüzyonları kontrol ederek hastadaki semptomları hafifletmeye yardımcı olmak için temel bir seçenektir (Bibby ve diğerleri, 2016). MPM'de cerrahi rezeksiyonun rolü tartışmalıdır ve uygulanabilirliği erken evredeki ve iyi kardiyopulmoner işlevleri olan MPM hastaları ile sınırlıdır (Cao ve diğerleri, 2014).

MPM için radyoterapi nispeten yaygındır. Ameliyat öncesi veya sonrası olarak, diğer tedavilerle birlikte veya tek başına uygulandığında, ağrıyı kontrol etmek, tümörü sınırlamak için faydalı olduğu belirtilmiş, ancak terapötik etkinliğinin yeterli olmadığı bildirilmiştir (Rosenzweig, 2017). MPM'nin akciğerleri çevreleyen, kalbe, omuriliğe ve diğer hayati organlara bitişik olan plevra boyunca yayılmasından dolayı etkili radyasyon dozunun ve radyasyonun yerinin belirlenmenin son derece zor olduğu belirtilmiştir.

Sistemik kemoterapi, cerrahi için uygun olmayan çoğu ileri evre MPM hastasında tek ve birincil tedavi yöntemi ve makul seçenek olmaya devam etmektedir. Sisplatin (CDDP) mezotelyoma tedavisinde kullanılan en etkili monokemoterapötiktir. Karboplatin benzer aktiviteye ve daha az toksisiteye sahip iken diğer bir tekli ajan ise gemsitabindir (Belli ve diğerleri, 2009). Sisplatin ve antifolatlar hariç tek bir ajan olarak kullanıldığında test edilen çoğu ajanın, genellikle %10-20 arasında nispeten düşük yanıt oranlarına sahip olduğu görülmüş ve bu nedenle kombinasyon sitotoksik terapi, yakın geçmişte test edilen birincil kemoterapötik strateji olmuştur (Allen, 2015). Pemetreksed/sisplatin (PEM/CDDP) kombinasyon kemoterapisinin MPM'de sisplatin monoterapisine göre daha etkili olduğunu ilk olarak Vogelzang ve diğerleri (2003) göstermiştir. Kemoterapik ajanların tümör hücreleri üzerine olan etkinliğini arttırmak ve hastalarda gözlenen yan etkileri en aza indirmek ve/veya önlemek için, tek başlarına ya da günümüzde tedavide kullanılmakta

olan ajanlarla birlikte uygulanabilecek yeni terapötik ajanlar araştırılmaktadır (Garland, 2011).

Günümüzde MPM araştırmaları özellikle tümör büyümesi ve ilerlemesinde rol oynayan moleküler yolların belirlenmesi ve bu mekanizmalara karşı koyabilecek yeni bileşiklerin tanımlanması üzerine odaklanmış durumdadır (Favoni ve Florio, 2011). Poliferatif, neo-anjiyogenez ve sağkalım sinyal yollarını (PI3K/AKT, ERK, NF- κ B sinyalizasyonu, mitokondriyal depolarizasyon vs.) baskılamayı amaçlayan tirozin kinaz reseptörleri (RTK) inhibitörleri ve epigenetik modülatörler (histon deasetilaz inhibitörleri) bu alanda çalışılan bileşiklere örnek gösterilebilir (Belli ve diğerleri 2009). Ayrıca, MPM hastalarındaki geleneksel cerrahi, radyolojik ve farmakolojik tedavilere karşı oluşan direnç ve geleneksel kemoterapi sonrası oluşan kötü klinik sonuçları, terapötik yaklaşımlarda olası yeni moleküler hedeflerin belirlenmesi çalışmaları da hız kazanmıştır. Son yıllarda, bilinen ajanların alternatif etki mekanizmalarını aydınlatmak, yeni bileşiklerin *in vitro* aktivitesi hakkında bilgi vermek ve moleküler hedefli tedavinin gelişimi için daha etkili stratejiler önermek için cerrahi olarak çıkarılan MPM tümör örnekleri, hayvan modelleri ve MPM hücre hatları üzerinde birçok prelinik çalışma yapılmaktadır (Favoni ve Florio, 2011).

2.4. Polifenoller ve Kanser

Kanser, dünya çapındaki ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir ve insidansı hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde artmaktadır. 2012 yılında dünya çapında yaklaşık 14,1 milyon yeni kanser olgusu belirlenmiş olup, 2032 yılında bu sayının 25 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Akciğer, mide, kolorektal, karaciğer, meme, prostat ve rahim ağzı kanseri başta olmak üzere yalnızca 2012 yılında yaklaşık 8,2 milyon kansere bağlı ölüm meydana geldiği bildirilmiştir (Zhou ve diğerleri, 2016). Bu durumdan dolayı kanserin önlenmesi veya tedavisiyle ilgili çalışmalara acil ihtiyaç duyulmaktadır. Çoklu ilaç direnci, yüksek toksisite ve kemoterapötik ajanlara bağlı yan etkilerin gelişmesi, kanserin başarılı bir şekilde tedavisinde önemli bir engel teşkil etmektedir (Lee ve diğerleri, 2016). Son 20 yıl içinde birçok araştırma grubu doğal polifenoller ve bunların antikanser etkileri ile ilgili çalışmalara yönelmiştir. Polifenoller, bitki kökenli yiyecek ve içeceklerde (meyveler, sebzeler, baharatlar, soya, kuruyemişler, çay) yaygın olarak

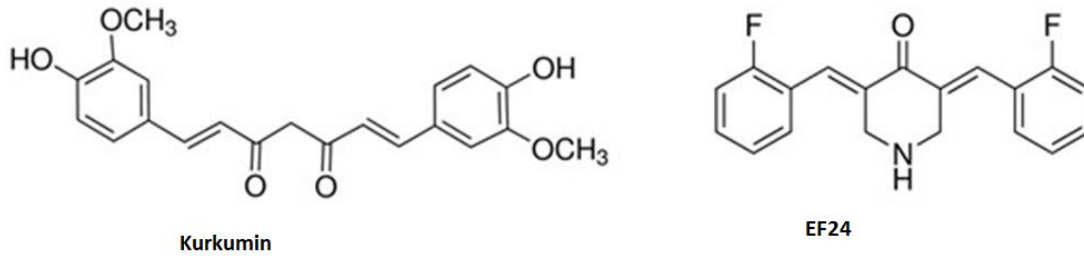
bulunmaktadır (Manach ve diğerleri, 2004). Geleneksel tedavilerden daha etkili ve daha az toksik olan yeni kemopreventif ajanların araştırılmasıyla bu bileşenlere olan ilgi artmıştır. Bu nedenle polifenoller, hücre proliferasyonunun düzenlenmesi, tümör büyümesi, anjiyogenez, metastaz, inflamasyon ve apoptoz gibi antikarsinojenik özellikler açısından incelenmiştir (Niedzwiecki ve diğerleri, 2016). Kimyasal yapılarına bağlı olarak polifenoller flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olmak üzere iki temel sınıfa ayrılmaktadır. Flavonoidlerin ise flavonlar, izoflavonlar, flavanonlar, flavonoller, antosiyanidinler, flavanoller ve kalkonlar gibi alt sınıfları mevcuttur. Kalkon alt sınıfı butein, kurkumin, ksantohumol bileşiklerini içermektedir (Dei Cas ve Ghidoni, 2018).

2.4.1. Kurkumin

Zerdeçal (*Curcuma longa L.*) rizomlarında bulunan polifenoller sınıfına ait olan kurkumin (diferülorometan), Hindistan ve Asya'nın diğer bölgelerinde yemeklerde kullanılmaktadır. Aynı zamanda kozmetikte ve bazı tıbbi preparatlarda da kullanıldığı bilinmektedir. Çeşitli hastalıkların tedavisinde bitkisel ilaç olarak kullanılan ve bu anlamda uzun bir geçmişe sahip olan kurkumin, MS 700'den beri Hint ve Çin geleneksel tıbbında kullanılmaktadır (Rajasekaran, 2011). Antioksidan, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, ve anti-kanser aktivitesi gibi geniş spektrumlu biyolojik ve farmakolojik özellikleri bulunmaktadır. Kurkuminin faydalı etkiler gösterdiği bilinmekle birlikte, en çok kanser üzerindeki etkisi araştırılmaktadır (Devassy ve diğerleri, 2015). Kurkumin anti-kanser etkisini, hücre döngüsünü çeşitli aşamalarda durdurarak ve apoptozu uyarak göstermektedir (Surh ve Chun, 2007). Cheng ve diğerleri (2007) kolon kanseri hücrelerinde (Caco-2 hücreleri) kurkuminin hücre çoğalmasını baskıladığı ve apoptozu uyardığını göstermiştir. Deneysel hayvan modellerinde ise, tümör oluşumunun yanı sıra tümör hücrelerinin çoğalmasını da engellediği belirtilmiştir. Düşük moleküler ağırlığa sahip olması ve toksik etkisinin olmayışı terapötik potansiyeli açısından bu bileşiğe avantaj sağlamaktadır. Ancak zayıf emilimi, hızlı metabolize olması, sistematik olarak elimine edilmesi ve sonuç olarak düşük biyoyararlanımı sebebiyle yeni kurkumin analogları geliştirilmeye çalışılmaktadır (Anand ve diğerleri, 2007).

2.4.2. EF24

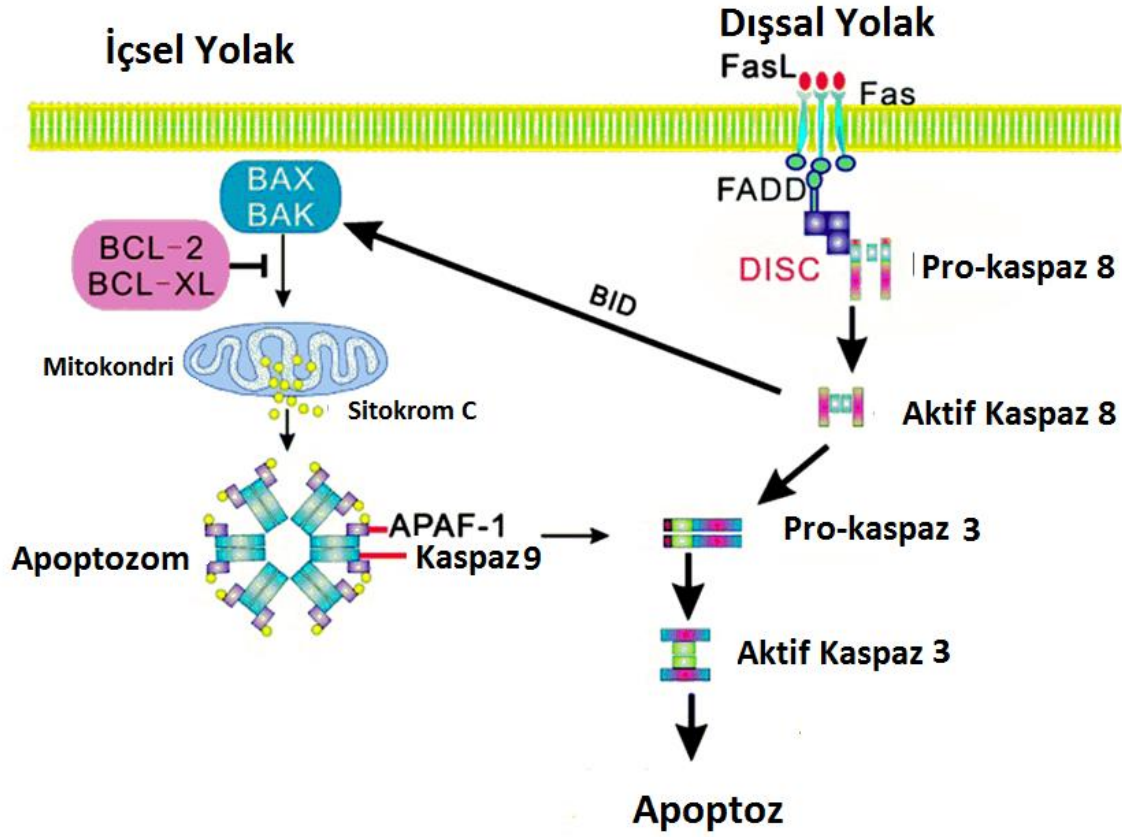
EF24 (difenil difloroketon) bir kurkumin analogudur. İlk olarak, Adams ve diğerleri (2004) tarafından tasarlanmış ve sentezlenmiştir. Kurkumin ve EF24'ün kimyasal yapıları Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Kurkumin ile karşılaştırıldığında, EF24'ün artan bir biyoyararlanım gösterdiği bildirilmiştir. EF24'ün kanser hücrelerine karşı yüksek derecede sitotoksik olduğu ve tümör hücresinin çoğalmasının baskılanmasında sisplatinden daha yüksek bir etki gösterdiği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Adams ve diğerleri, 2004). EF24'ün kanser hücrelerinde, hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptotik yolları aktifleştirdiği gösterilmiştir (Kasinski ve diğerleri, 2008). Çok sayıda kanser türünün hücre ve/veya tümör modellerinde etkinliği gösterilmiştir. *In vitro* deneylerde; osteojenik sarkom (Yang ve diğerleri, 2014), MPM (Önen ve diğerleri, 2015), progresif medüller tiroid kanser (Bertazza ve diğerleri, 2019), pankreas kanser (Sağlam ve diğerleri, 2016) ve lösemi/lenfoma (Santiago ve diğerleri, 2016) hücrelerinin büyümesinin baskılanmasında EF24'ün etkili olduğu gösterilmiştir. *In vivo* deneylerde ise, EF24'ün fare meme kanseri ve kolon kanseri ksenograft modellerinde tümör çoğalmasını engellediği gösterilmiştir. Ayrıca, fare meme kanseri ksenograft modelinde, EF24'ün toksisite düzeyinin düşük olduğu, gözlenmiştir (Adams ve diğerleri, 2004). EF24, tek başına veya diğer ajanlarla kombinasyon halinde, bir anti-kanser terapötik ajan olarak büyük bir potansiyel göstermektedir.



Şekil 2.2. Kurkumin ve EF24'ün kimyasal yapısı (He ve diğerleri, 2018).

2.5. Apoptoz

Kerr, Wyllie ve Currie (1972) tarafından tanımlanan apoptoz, bir hücrenin belirli uyarıları aldıktan sonra aktif olarak ölüme doğru bir yol izlediği durumu tarif etmek için kullanılmaktadır. Apoptoz, hücre homeostazının sürdürülmesi için gerekli olan normal bir fizyolojik süreçtir. Bu süreçte hücre iskeletinin parçalanması ve ardından hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve kaspazlar olarak adlandırılan spesifik proteazların aktivasyonu dahil olmak üzere hem morfolojik hem de biyokimyasal olarak çeşitli hücresel değişiklikler görülmektedir (Wyllie ve diğerleri, 1980). Apoptoz, çeşitli iç ve dış uyarılarla başlatılabilir. Doku gelişimi ve homeostaza ek olarak, çok çeşitli patolojik durumlarda da önemli rol oynamaktadır (Fadeel ve diğerleri, 1999). Apoptozun doğru bir şekilde düzenlenememesi otoimmün hastalıktan kansere kadar değişen ciddi anormalliklere neden olabilir (Ravindran ve diğerleri, 2009). İçsel (veya mitokondriyal) ve dışsal (veya ölüm reseptörü) olmak üzere apoptozda yaygın olarak iki yolak tanımlanmıştır (Şekil 2.3). Dışsal ölüm reseptörü yolağı, adından da anlaşılacağı gibi, ölüm ligandları bir ölüm reseptörüne bağlandığında başlar. İçsel yolak ise hücre içinde başlatılır. Onarılamaz genetik hasar, hipoksi, aşırı yüksek sitozolik Ca^{2+} konsantrasyonları ve şiddetli oksidatif stres gibi iç uyarılar, içsel mitokondriyal yolağın başlamasının bazı tetikleyicileridir (O'Brien ve Kirby, 2008). Bu yolaklar efektör kaspazlar aracılığıyla birleşir (Pfeffer ve Singh, 2018). Hedef proteinleri parçalayan kaspazlar, aktif bölgesinde sistein amino asiti bulunan, substratlarını aspartat amino asidinden sonra kesen proteazlardır. İnsanda tanımlanan 14 kaspaz, başlatıcı, efektör ve inflamatuvar kaspazlar olarak 3 grup altında sınıflandırılmaktadır (Wong, 2011). Bcl-2 protein ailesi ise, içsel yolağın düzenlenmesinden sorumludur. Ailenin bazı üyeleri proapoptotik bazıları ise antiapoptotik proteinler olarak işlev gösterir. Sadece BH3 bölgesi içeren proapoptotikler (BH3 proteini), birden fazla BH bölgesi içeren proapoptotikler (bax ve bak) ve anti apoptotikler (bcl-2, bcl2l1 ve mcl1) olmak üzere 3 grup şeklinde sınıflandırılmaktadır.



Şekil 2.3. Apoptozun içsel ve dışsal yollarının şematik gösterimi (Tan ve diğerleri, 2014).

2.5.1. Apoptoz ve kanser

Kanser, normal bir hücrenin malign bir hale dönüşürken geçirdiği bir dizi değişimin sonucu olarak görülebilen, bu malign dönüşüme neden olan temel değişikliklerden biri de hücre ölümünden kaçıştır (Hanahan ve Weinberg 2000). Bu nedenle, apoptozdan kaçış karsinogenezde önemli rol oynamaktadır. Kanser hücreleri kaspazların işlevlerini baskılayarak apoptozdan kaçabilir. Bir diğer apoptozdan kaçma şekli ise, antiapoptotik proteinlerin hücrede ifadesinin artması ve proapoptotik proteinlerin ifadesinin azalmasıdır. Bcl-2 proteininin aşırı ifadesi, tüm kanserlerin yarısından fazlasında mevcuttur. Bu durum intrinsik apoptotik uyarana dirençli tümör hücrelerinin oluşumuna sebep olmaktadır. (Pfeffer ve Singh, 2018). Proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin ifade miktarlarındaki değişiklikler, kaspazların işlevlerindeki azalmalar ve ölüm reseptör aracılı sinyalin oluşmaması apoptozdan kaçış mekanizmaları arasındadır. Proapoptotik ve antiapoptotik

proteinlerin mutlak miktarından ziyade bunların oranları hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Düşük kaspaz düzeyinin veya kaspaz işlevindeki bozulmanın apoptotik mekanizmayı etkileyebileceği ve karsinogenezle ilişkili olduğu belirtilmektedir (Carneiro ve El-Deiry, 2020).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. AB12 hücre hattı

Bu tez çalışmasında CellBank Australia'dan alınan fare malign plevral mezotelyoma (MPM) hücre hattı olan AB12 (Kod no: CBA-0146) hücreleri kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (DanLaf)
- Cedex XS Analyzer (Roche)
- Çalkalayıcı (Biosan 3D mini shaker)
- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo)
- Derin dondurucu, -30°C (Sanyo)
- Hassas terazi (Precisa)
- Homojenizatör (IKA)
- Invert mikroskop (Zeiss)
- Işık mikroskobu (DCM 4000)
- Karbondioksitli Etüv (Sanyo)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan)
- Hybaid PCR-Sprint otomatik ısı döngü cihazı (Thermo Scientific)
- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071)
- LightCycler® 480 Gerçek Zamanlı PCR cihazı
- Mikropipetler, 10 µl, 100 µl, 1000 µl (Eppendorf)
- Mikroplaka okuyucu (Spectramax M3, Molecular Devices)
- pH metre (WTW 422)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Soğutmasız santrifüj (Heraeus Labofuge 200)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R)

- Spektrofotometre (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific)
- Spin vorteks (Biosan)

3.1.3. Kullanılan sarf malzemeler

- Hücre dondurma ampülü (Greiner)
- Hücre kültür flakları, 25 cm² ve 75 cm² (Nest Scientific)
- Hücre sayımı için tek kullanımlık Slayt (Roche)
- Kaliper (Mitutoyo)
- 0.2, 0.6 ve 1.5 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)
- Santrifüj tüpleri 15 ve 50 ml (Nest Scientific)
- Steril 1 ml İnsülin Enjektörü (Beybi)

3.1.4. Kullanılan kimyasal malzemeler

- Amfoterisin (Capricorn Scientific)
- Sisplatin (Cayman Chemical)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Merck)
- EF-24 (Sigma)
- Etanol (Sigma)
- Fetal sığır serum (FBS) (Capricorn Scientific)
- L-Glutamin içeren DMEM Besiyeri (Capricorn Scientific)
- MTT (Thermo)
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) (Capricorn Scientific)
- Penisilin/Streptomisin (Capricorn Scientific)
- Tripan mavisi boyası (Sigma)
- Tripsin (Capricorn Scientific)
- Kloroform (Merck)
- İzopropanol (Merck)

- Universal Probe Library (UPL) Problemleri (Roche)
- Primerler (Oligomer Biyoteknoloji)

3.1.5. Kullanılan kitler

- Trizol easy-BLUE™ Total RNA Ekstraksiyon Kiti (İntron Biotechnology)
- Power First Strand cDNA Sentez Kiti (İntron Biotechnology)
- BCA Protein Miktar Kiti (Thermo Scientific)
- LightCycler® 480 Probes Master (Roche)
- Mouse Caspase-3 ELISA Kit (Shanghai Coon Koon Biotech)
- Mouse Bcl-2 ELISA Kit (Shanghai Coon Koon Biotech)
- Mouse Bcl2l1 ELISA Kit (Shanghai Coon Koon Biotech)

3.2. Besiyeri ve Çözeltilerin Hazırlanışı

a) %10 FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanışı;

L- glutamin ve yüksek glikoz içeren 450 ml DMEM besiyeri içerisine 50 ml FBS eklenip, antibiyotiklerle (son konsantrasyonu 100 IU/ml penisilin-100 µg/ml streptomisin olacak şekilde) desteklenerek, FBS oranı %10, Penisilin-Streptomisin oranı %1 olan DMEM besiyeri hazırlandı.

b) %1 FBS içeren DMEM besiyerinin hazırlanışı;

L- glutamin ve yüksek glikoz içeren 495 ml DMEM besiyeri içerisine 5 ml FBS eklenip, antibiyotiklerle (son konsantrasyonu 100 IU/ml penisilin-100 µg/ml streptomisin olacak şekilde) desteklenerek, FBS oranı %1, Penisilin-Streptomisin oranı %1 olacak şekilde DMEM besiyeri hazırlandı.

c) MTT karışımının hazırlanması;

Toz halinde bulunan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromit] konsantrasyonu 5 mg/ml olacak şekilde tartılarak, PBS içerisinde çözöldü. Hazırlanan stok çözölti, por çapı 0,20 µm olan filtreden geçirilerek daha az miktarlara ayrılmak suretiyle +4°C’de karanlıkta saklandı.

d) 20 mM EF24 stok çözöltisinin hazırlanması;

5 mg EF24 tartılıp 803 µl DMSO içerisinde çözölp hazırlanarak kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı. Hazırlanan stok çözölti seyreltilip çeşitli konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı.

e) 20 mM Sisplatin stok çözöltisinin hazırlanması;

5 mg sisplatin tartılıp 833 µl PBS içerisinde çözölp hazırlanarak kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı. Hazırlanan stok çözölti seyreltilip çeşitli konsantrasyonlarda hücrelere uygulandı.

f) 110 mg/ml EF24 stok çözöltisinin hazırlanması;

22 mg EF24 tartılıp 200 µl DMSO içerisinde çözölerek hazırlanıp kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı. Hazırlanan stok çözölti seyreltilip çeşitli konsantrasyonlarda farelere uygulandı.

g) 2,9 mg/ml sisplatin stok çözöltisinin hazırlanması;

2,9 mg sisplatin tartılıp 1 ml PBS içerisinde çözölp hazırlanarak kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı. Hazırlanan stok çözölti seyreltilip çeşitli konsantrasyonlarda farelere uygulandı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hücre kültürü

Bu tez çalışmasında kullanılan AB12 fare MPM hücreleri, %10 FBS ve %1 antibiyotiklerle (100 unit/ml penisilin-100 µg/ml streptomisin) desteklenmiş glutamin ve yüksek glikozlu %10 FBS içeren DMEM besiyerinde %95 nem ve %5 CO₂ içeren ortamda 37°C’de kültüre edilerek çoğaltıldı. Tripan mavisi çözeltisi kullanılarak Cedex XS Analyzer cihazı ile hücre sayımı gerçekleştirildi.

3.3.2. MTT yöntemi ile hücre canlılığının belirlenmesi

MTT yöntemi hücre canlılığını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Yöntem sarı renkte çözünür bir tetrazolyum boyası olan MTT'nin dehidrojenaz enzimi aktivitesiyle mor renkli formazan kristallerine indirgenmesi esasına dayanır. MTT analizi sonrasında oluşan boya renginin yoğunluğu ile canlı hücre sayısı arasında uyum olduğu bildirilmiştir (Mosmann, 1983).

AB12 hücrelerinde EF24, sisplatin ve bunların birlikte uygulamalarının hücre canlılığı üzerine olan etkileri kolorimetrik bir yöntem olan MTT testi ile belirlendi. Hücrelerin Cedex XS Analyzer cihazında sayımı gerçekleştirildi. MPM hücreleri %1 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde homojen bir şekilde dağıtıldıktan sonra, 96 kuyulu hücre kültür kaplarına her kuyuya 10.000/100 µl hücre olacak şekilde ekildi. 37°C’de 24 saat inkübe edildikten sonra, EF24 ve sisplatinin 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. Kültür ortamında DMSO’nun son konsantrasyonunun %0,1’i geçmemesine dikkat edildi. İnkübasyon sürelerinin sonunda kuyularda bulunan besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyuya 90 µl %10 FBS içeren DMEM besiyeri ve akabinde stok MTT çözeltisinden 10 µl eklendi. Hücreleri içeren kültür kabı 3 saat 37°C’lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılarak canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristalleri her bir kuyuya 100 µl DMSO’nun eklenmesi suretiyle çözüldü. Mikroplaka okuyucusunda 570 nm dalga boyu ile absorbans değerleri belirlendi. Her bir konsantrasyon için deney 6 tekrarlı

yapılarak elde edilen ortalama absorbans değerleri kullanıldı. Ajanlarla muamele edilmeyen kontrol hücrelerinin canlılığı (EF24 için DMSO ile hazırlanan DMSO kontrol, sisplatin için PBS ile hazırlanan PBS kontrol) %100 şeklinde kabul edildi ve ilaç uygulanan hücrelerden elde edilen absorbans değerleri, kontrol hücrelerine göre oranlanarak hücre canlılığı yüzde olarak belirlendi.

3.3.3. *In vivo* MPM fare modelinin oluşturulması

Bu tez çalışmasında *in vivo* MPM fare modeli oluşturmak için AB12 MPM hücre hattı kullanıldı. Yapılan bu tez çalışmasında ağırlıkça eşleşen 6-8 haftalık dişi BALB/c fareler kullanıldı. Çalışmanın bu bölümü için, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul izni alınmıştır (G.Ü.ET-18.056). %10 FBS içeren DMEM besiyeri içerisinde *in vitro* olarak çoğaltılan AB12 hücrelerinin ($1 \times 10^5/0,1$ ml) serum içermeyen DMEM besiyeri içinde subkütanöz (s.c.) olarak sağ taraftan farelere enjeksiyonu gerçekleştirildi. Enjeksiyon işlemi sonrasında sağlık durumları ve tümör oluşumun izlenmesi açısından fareler gūnaşırı gözlemlendi. Enjeksiyon işleminden sonra 4. haftada bazı farelerde tümör gelişimi gözlenmekle birlikte ajanların uygulanması için tümör çaplarının 200 mm^3 'e ulaşması beklendi. Enjeksiyon işleminden sonra 8. haftada fareler arasında tümör çaplarında farklılıklar gözlemlendiği için her gruptaki ortalama tümör çapının birbirine yakın olmasına dikkat edildi. Deney grupları aşağıda belirtilmiştir:

Grup I: MPM oluşturulmuş ve intraperitoneal (i.p.) PBS verilen grup: Hayvanlara 16 gün boyunca 7 günde 1 kez olmak üzere 3 mg/kg sisplatininin fareye uygulandığı hacme eşit hacimde PBS intraperitoneal (i.p.) olarak verildi (Sham Grup) (n=4).

Grup II: MPM oluşturulmuş ve i.p. DMSO verilen grup: Hayvanlara 16 gün boyunca her gün %1'lik DMSO 200 µl i.p. olarak verildi (Sham Grup) (n=4).

Grup III: MPM oluşturulmuş ve sisplatin ile tedavi edilen grup: Hayvanlara 16 gün boyunca 7 günde 1 kez olmak üzere, 3 mg/kg sisplatin i.p. olarak verildi (n=4).

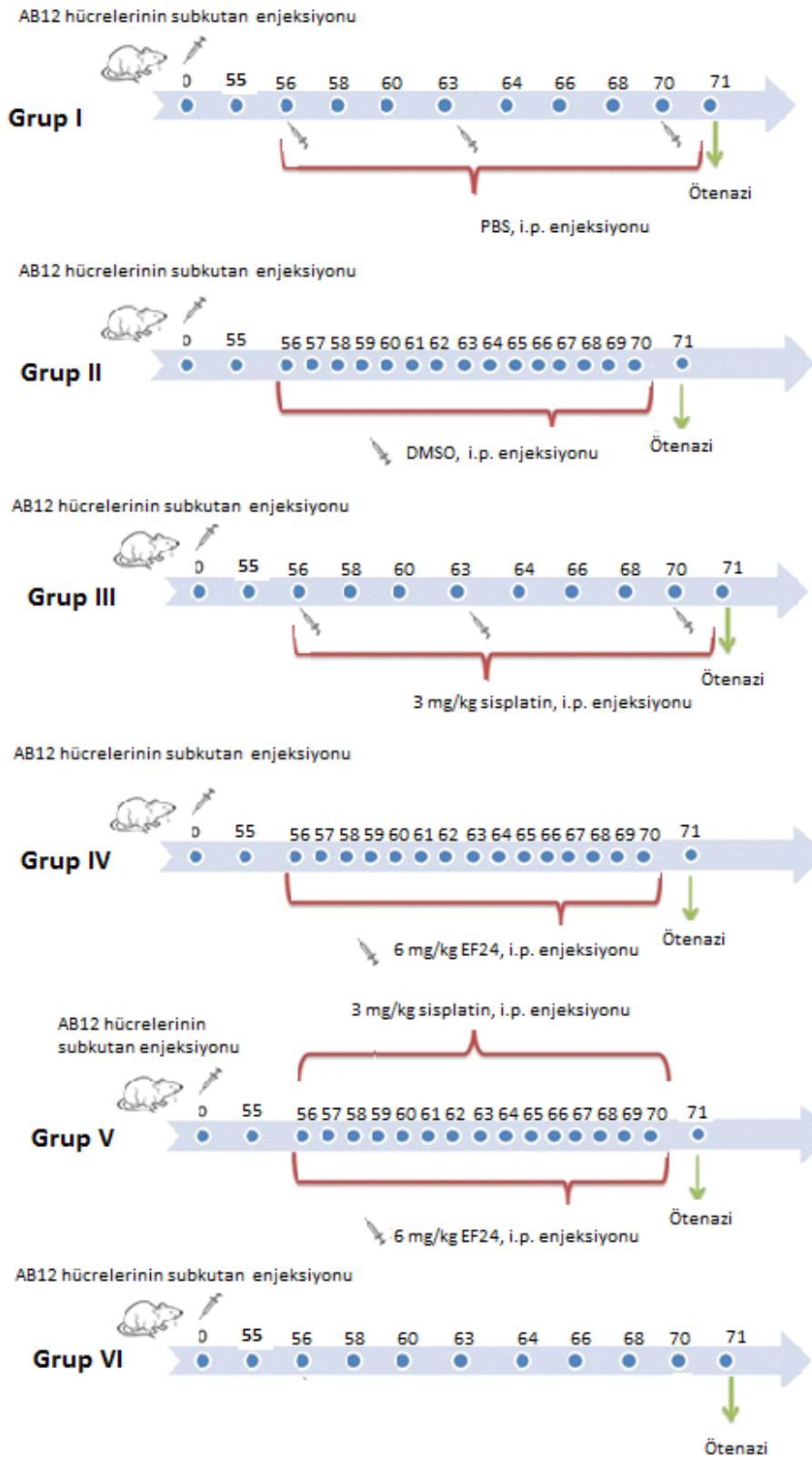
Grup IV: MPM oluşturulmuş ve EF24 ile tedavi edilen grup: Hayvanlara 16 gün boyunca her gün 6 mg/kg EF24 200 µl i.p. olarak verildi (n=4).

Grup V: MPM oluşturulmuş ve hem EF24 ile hem de sisplatin ile tedavi edilen grup:

Hayvanlara 21 gün boyunca her gün 6 mg/kg EF24 200 µl i.p. olarak verildi. Hayvanlara 7 günde 1 kez olmak üzere, 3 mg/kg sisplatin i.p. olarak verildi. (n=4).

Grup VI: MPM oluşturulmuş ve tedavi edilmeyecek olan grup (n=4).

Şekil 3.1’de *in vivo* MPM fare modeli ve deneyin akış şeması gösterilmiştir.



Şekil 3.1. *In vivo* MPM fare modeli ve deneyin akış şeması.

Tümör büyüklüğü her hafta kaliper ile ölçülüp, tümör hacmi standart formül ile hesaplandı: $(Genişlik^2 \times Uzunluk)/2$. Vücut ağırlığındaki değişiklikler her hafta ölçüldü. 16. günün sonunda, hayvanlara anestezi altında intrakardiyak kan alma yöntemi ile ötenazi uygulandı. Ötenazi sonrası hayvanlardan tümör dokularının yanı sıra, karaciğer, akciğer, böbrek ve kalp dokuları da alındı. Dokular steril distile su ile yıkandıktan sonra tümör dokularının bir kısmı DNaz ve RNaz içermeyen 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine alınarak sıvı nitrojende (azotta) dondurulduktan sonra -80°C derin dondurucuya konulup moleküler analizlerin yapılacağı güne kadar muhafaza edilirken, tümör dokularının bir kısmı ve normal dokular ise patolojik inceleme için formaline alındı. Deneyin sonlandırılmasını takiben, farelere EF24 ve/veya sisplatin'in ayrı ayrı ve birlikte uygulamalarının deneysel MPM fare modelinde apoptotik yolak üzerindeki etkilerine bakılmak üzere; tümör dokularındaki apoptotik yolda görevli olan belirli genlerin mRNA ifade düzeyleri qPCR yöntemi ile incelenirken apoptotik protein düzeyleri ELISA kitleri kullanılarak belirlendi.

3.3.4. Dokuların patolojik değerlendirilmesi

Hayvanlardan alınan tümör ve normal dokulardan parafin blokların hazırlanması ve boyama işlemleri Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Alınan tümör ve normal dokular formalin solüsyonu ile tespit edildi. Tespit işleminden sonra sırasıyla dereceli alkol ve ksilenden geçirilerek en son parafine gömülüp bloklanma aşamasına gelecek şekilde doku takip işlemine alındı. Daha sonra parafine gömülerek elde edilen bloklardan 5µm'lik kesitler lamlara yayılarak hematoksilin-eozin ile boyama işlemi yapıldı. Boyama işleminde lamlar 60 °C' de 2 saat bekletildi. Sonrasında, oluşturulan ksilen havuzlarında bekletildi. Ksilende bekletildikten sonra farklı konsantrasyonlarda oluşturulan alkol havuzlarında bekletildi. Sonrasında hematoksilende 7 dk bekletildi. Hematoksilin ile boyama sonrasında sırasıyla akarsuda yıkama, eozinde 2 dk bekletme ve akarsu ile yıkama işlemine tabi tutuldu.

3.3.5. Tümör dokularından total RNA izolasyonu

1,5 ml'lik DNaz ve RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüplerde bulunan tümör dokuları -80°C derin dondurucudan çıkartılıp buz üstünde her dokudan 50–100 mg alındı. Trizol (easy-

BLUE™ Total RNA Extraction Kit) kullanılarak aşağıda yazılı olan protokole göre doku örneklerinden total RNA izolasyon işlemi gerçekleştirildi.

1. 1,5 ml'lik DNaz ve RNaz içermeyen mikrosantrifüj tüplerde 50–100 mg'luk dokulara 1 ml TRIzol eklenip homojenizatör kullanarak doku parçalanıp homojenize edildi.
2. Oda sıcaklığında 5 dk beklendi.
3. 200 µl kloroform eklenip sonrasında tüp sıkıca kapatılıp 15 sn vortekslendi.
4. 5 dk boyunca oda sıcaklığında bekletildi.
5. 4°C'de 13.000 rpm'de 10 dklık süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
6. Santrifüjden sonra en üstteki renksiz sıvı faz boş bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
7. Yeni tüpe alınan sıvının üzerine 400 µl izopropanol (2-propanol) eklendi ve tüp 2-3 defa çevrilerek iyice karıştırıldı.
8. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
9. 4°C'de 13.000 rpm'de 10 dk santrifüj gerçekleştirildi ve üst sıvı mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı.
10. Pelete 1 ml %75'lik etanol eklendi ve tüp 2-3 kez ters çevrilerek karıştırıldı.
11. 13.000 rpm'de 4°C'de 10 dk santrifüj yapıldı. Üst sıvı atıldı ve kalan pelet kuruması için bekletildi.
12. 30-50 µl DEPC'li distile su kullanılarak pelet çözüldü.
13. RNA'ların miktarları ve saflığı NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific) cihazı ile ölçüldü. Ölçümü gerçekleştirilen RNA'lar kullanılıncaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.

3.3.6. Ters transkriptaz PCR (RT-PCR) yöntemi

Power First Strand cDNA Sentez Kiti (Intron Biotechnology) kullanılarak 1 µg total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi. cDNA sentezi sırasında kullanılan malzemeler ve bunlara ait miktarlar Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. RT-PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O	-	RNA miktarına göre değişken
RNaz inhibitörü	10 ünite (U)	1 µl
Reaksiyon Tamponu	1x	4 µl
dNTP	1mM	2 µl
DTT	10 mM	2 µl
AMV Revers Transkriptaz	5 U	0,5 µl
Random hegzamerler	50 µM	1 µl
Total RNA	1 µg	1 µg olacak şekilde

Su, RNA ve primerler ince çeperli 0,2 ml'lik tüplere eklendikten sonra 75 °C'de 5 dk bekletildi. Bekleme süresi dolunca kısa spin attıktan sonra, en az 1 dk buz üzerinde bekletildi. Diğer reaksiyon karışımları 9,5 µl olacak şekilde tüplere eklenip ısı döngü cihazına yerleştirildi. Otomatik ısı döngü cihazı Çizelge 3.2'de belirtilen programa ayarlanarak izole edilen total RNA'lardan cDNA sentez işlemi gerçekleştirildi.

Çizelge 3.2. cDNA sentezi için otomatik ısı döngü cihazında gerçekleştirilen program

	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Ters transkripsiyon	42°C	60 dk	1 döngü
İnaktivasyon	70°C	5 dk	1 döngü
Soğutma	4°C	-	

Otomatik ısı döngü cihazında gerçekleştirilen tepkime sonrasında elde edilen örnekler Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) için kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.3.7. Apoptotik (*Casp3*, *Casp8*, *Casp9*) ve anti-apoptotik (*Bcl-2* ve *Bcl2l1*) genlerin ifadelerinin nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) ile değerlendirilmesi

Apoptotik (*Casp3*, *Casp8*, *Casp9*) ve anti-apoptotik (*Bcl-2* ve *Bcl2l1*) genlerin mRNA ifade düzeyi ODTÜ merkezi laboratuvarında bulunan Light Cyclers-480 (LC) (Roche) cihazının kullanılmasıyla qPCR yöntemi ile değerlendirildi. Amplifikasyonlar, ilgili

bölgeye özgü primerler, UPL probu, LC 480 Master karışımı, cDNA ve steril distile su kullanılarak toplam 10 µl tepkime hacmi ile gerçekleştirildi. Genlerin mRNA ifade düzeylerini normalize etmek için, Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz (*Gapdh*) geninin mRNA ifade düzeyi referans olarak alındı. Her bir gen iki tekrarlı çalışıldı.

a) *Casp3* geninin mRNA düzeyindeki ifadesinin nicel analizi

Casp3 genine ait primerler ve UPL probun dizileri aşağıda belirtilmiştir. Şekil 3.2’de ise UPL probun ve *Casp3* genine ait primerlerin cDNA’daki yerleşimleri belirtilmiştir.

Casp3 F: 5’- TGAAGACATTTTGAATTAATGGA-3’

Casp3 R: 5’- TCACCATGGCTTAGAATCACA -3’

68 numaralı prob dizisi: 5’-AGGAGCAG-3’

5’-TGAAGACATTTTGAATTAATGGA-3’

255 CAGGAATAAAAATGATCTTACTCGTGAAGACATTTTGAATTAATGGATAGTGTTTCTAA

315 GGAAGATCATAGCAAAAGGAGCAGCTTTGTGTGTGTGATTCTAAGCCATGGTGATGAAGG

5’-AGGAGCAG-3’ 3’-ACACTAAGATTCCGTACCACT-5’

Şekil 3.2. *Casp3* genine ait primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSMUST00000211115.1 giriş no’lu dizi). Translasyon başlangıç nükleotidinde göre numaralandırılmıştır.

b) *Casp8* geninin mRNA düzeyindeki ifadesinin nicel analizi

Casp8 genine ait primerler ile UPL probun dizileri aşağıda belirtilmiştir. Şekil 3.3’de ise UPL probun ve *Casp8* genine ait primerlerin cDNA’daki yerleşimleri belirtilmiştir.

Casp8 F: 5’-TTGAACAATGAGATCCCCAAA-3’

Casp8 R: 5’-CCATTTCTACAAAAATTTCAAGCAG-3’

11 numaralı prob dizisi: 5-GCTGGAAG-3’

5'-TTGAACAATGAGATCCCC

328GAAGAAGTGAGCGAGTTGGAATTGAGATCTTTAAGTTCCTTTGAACAATGAGATCCCC

3'-GACGAACTTTAAAAACATCTTTACC-5'

388 AAATGTAAGCTGGAAGATGACTTGAGCCTGCTTGAAATTTTGTAGAAATGGAGAAGAGG

5'-GCTGGAAG-3'

Şekil 3.3. *Casp8* genine ait primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSMUST00000027189.14 giriş no'lu dizi). Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır.

c) *Casp9* geninin mRNA düzeyindeki ifadesinin nicel analizi

Casp9 genine ait primerler ile UPL probun dizileri aşağıda belirtilmiştir. Şekil 3.4'de ise UPL probun ve *Casp9* genine ait primerlerin cDNA'daki yerleşimleri belirtilmiştir.

Casp9 F: 5'- TGTCCATTGAGAAAATTGTGAATATC -3'

Casp9 R: 5'- GCCATGGTCTTTCTGCTCA -3'

64 numaralı prob dizisi: 5'-CAGCCTGG -3'

5'-TGTCCATTGAG

838 AGCCACCTCCAGTTCCTGGGTGCTGTCTATGGGACAGATGGATGCTCCGTGTCATTGAG

5'-CAGCCTGG-3'

898 AAAATTGTGAATATCTTCAACGGGAGCGGCTGCCCCAGCCTGGGAGGGAAGCCCAAGCTC

958 TTCTTCATCCAGGCCTGCGGTGG TGAGCAGAAAGACCATGGC TTTGAGGTGGCCTGCACT

3'-ACTCGTCTTTCTGGTACCG-5'

Şekil 3.4. *Casp9* genine ait primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSMUST00000030747.10 giriş no'lu dizi). Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır.

d) *Bcl-2* geninin mRNA düzeyindeki ifadesinin nicel analizi

Bcl-2 genine ait primerler ve UPL probun dizileri aşağıda belirtilmiştir. Şekil 3.5'de ise UPL probun ve *Bcl-2* genine ait primerlerin cDNA'daki yerleşimleri belirtilmiştir.

Bcl-2 F: 5'- GTACCTGAACCGGCATCTG -3'

Bcl-2 R: 5'- GCTGAGCAGGGTCTTCAGAG -3'

2 numaralı prob dizisi: 5'- CAGGAGAA -3'

5'-GTACCTGAACCGGCATCTG-3'
 527 AGTACCTGAACCGGCATCTGCACACCTGGATCCAGGATAACGGAGGCTGGGATGCCTTG
 5'-TTCTCCTG-3' 3'-GAGACTTCT
 587 TGGAACCTATATGGCCCCAGCATGCGACCTCTGTTTGATTTCCTGGCTGTCTCTGAAGA
 GGGACGAGTCG-5'
 647 CCCTGCTCAGCCTGGCCCTGGTCGGGGCCTGCATCACTCTGGGTGCATACCTGGGCCACA

Şekil 3.5. *Bcl-2* genine ait primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSMUST00000112751.1 giriş no'lu dizi). Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır.

e) *Bcl2l1* geninin mRNA düzeyindeki ifadesinin nicel analizi

Bcl2l1 genine ait primerler ve UPL probun dizileri aşağıda belirtilmiştir. Şekil 3.6'de ise UPL probun ve *Bcl2l1* genine ait primerlerin cDNA'daki yerleşimleri belirtilmiştir

Bcl2l1 F: 5'- TGACCACCTAGAGCCTTGGA -3'

Bcl2l1 R: 5'- GCTGCATTGTTCCCGTAGA -3'

2 numaralı prob dizisi: 5'- CAGGAGAA -3'

5'-TGACCACCTAGAGCCTTG
 483 ATTGGTGAGTCGGATTGCAAGTTGGATGGCCACCTATCTGAATGACCACCTAGAGCCTTG
 GA-3'
 543 GATCCAGGAGAACGGCGGCTGGGACACTTTTGTGGATCTCTACGGGAACAATGCAGCAGC
 5'-CAGGAGAA-3' 3'-AGATGCCCTTGTTACGTCG-5'

Şekil 3.6. *Bcl2l1* genine ait primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSMUST00000007803.11 giriş no'lu dizi). Translasyon başlangıç nükleotidine göre numaralandırılmıştır.

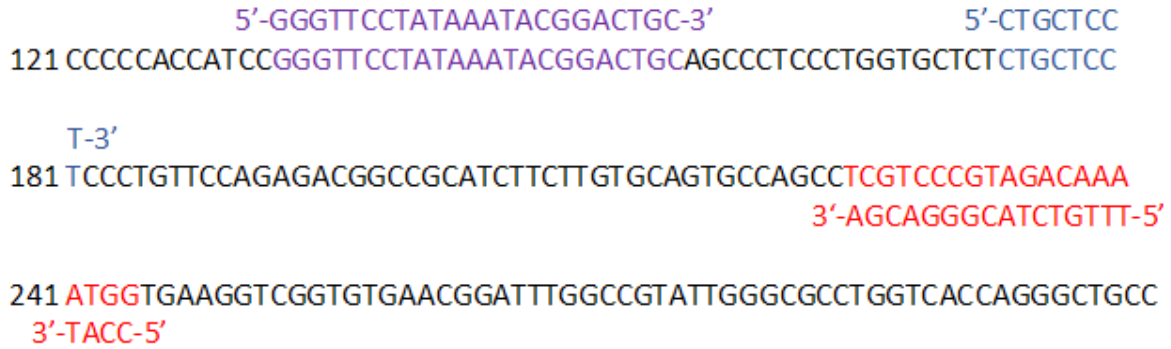
f) *Gapdh* geninin mRNA düzeyindeki ifadesinin nicel analizi

Gapdh genine ait primerler ve UPL probun dizileri aşağıda belirtilmiştir. Şekil 3.7’de ise UPL probun ve *Gapdh* genine ait primerlerin cDNA’daki yerleşimleri belirtilmiştir.

Gapdh F: 5’- GGGTTCCTATAAATACGGACTGC -3’

Gapdh R: 5’- CCATTTTGTCTACGGGACGA -3’

68 numaralı prob dizisi: 5’-AGGAGCAG-3’



Şekil 3.7. *Gapdh* genine ait primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi (Referans: ENSMUST00000118875.7 giriş no’lu dizi). Giriş dizisine göre numaralandırılmıştır.

3.3.8. Nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu karışımları

Casp3, *Casp8*, *Casp9*, *Bcl-2*, *Bcl2l1* ve *Gapdh* genleri için yukarıda gösterilen primerler ve probalar kullanılarak LC 480 cihazında Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu gerçekleştirildi. Tepkime için gerekli olan kimyasal bileşenler ve bunların miktarları Çizelge 3.3’de gösterilmiştir. Kullanılacak olan cDNA 1/10 oranında seyreltilerek kullanıldı.

Çizelge 3.3. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu için gerekli bileşenler ve miktarları

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril dH ₂ O	-	2,8 µl
Primer F (10 pmol/µl)	10 pmol	1 µl
Primer R (10 pmol/µl)	10 pmol	1 µl
UPL prob (100 pmol/µl)	20 pmol	0,2 µl
LC 480 Master karışımı (2x)	2x	10 µl
cDNA		5 µl

qPCR tepkimesi için gerekli bileşenler konulup karışım hazırlandı. Bu karışım 96 kuyulu mikrolakalara bölüştürülüp son olarak kuyuların içine cDNA'ler eklenip üzeri sealing foil ile örtüldü. Mikrolaka 1.500 g'de 2 dk santrifüj işlemine tabi tutuldu. Tüpler LC 480 cihazına yerleştirildikten sonra Çizelge 3.4'de gösterilen amplifikasyon programına uygun şekilde PCR tepkimesi gerçekleştirildi. *Casp3*, *Casp8*, *Casp9*, *Bcl-2*, *Bcl2l1*, ve *Gapdh* genleri için aynı program kullanıldı.

Çizelge 3.4. Light Cyler (LC) 480 Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu programı

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)			
Program Verisi		Değer	
Döngüler		1	
Analiz Modu		-	
Sıcaklık Hedefleri		Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)		95	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)		10:00 dk	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)		4,4	
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)			
Program Verisi		Değer	
Döngüler		45	
Analiz Modu		Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2	Kısım 3
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60	72
İnkübasyon zaman (s:dk:sn)	10 sn	20 sn	1 sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	4,4	2,2	4,4
Program 3. Soğutma			
Program Verisi		Değer	
Döngüler		1	
Analiz Modu		-	
Sıcaklık Hedefleri		Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)		40	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)		10 sn	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)		1,5	

3.3.9. Tümör dokularından protein eldesi

100 mg tümör dokusu alınıp 2 ml'lik mikrosantrifüj tüp içerisine konulup üzerine 500 µl PBS eklendi. Tüp içindeki dokulara 10 sn homojenizatör uygulanıp, 5 sn buzda bekletilerek tam bir homojenizasyon sağlanıncaya kadar bu işlem buz üzerinde birkaç defa tekrar edildi. Homojenize hale gelmiş ekstrakt 13.500 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında protein içeren üst sıvı ayrı bir tüpe alınarak protein miktarı belirlendi.

3.3.10. Protein miktarının belirlenmesi

Tümör dokusundan elde edilen total protein miktarlarının belirlenmesi için BCA Protein Assay kiti kullanıldı. Kit protokolüne göre öncelikle kitin içerisinde bulunan konsantrasyonu bilinen sığır serum albümininden (BSA) seyreltmeler uygulanması yoluyla 25 µg-2.000 µg arasında konsantrasyonlarda 8 adet protein standardı hazırlandı. Kit içeriğinde bulunan diğer maddeler olan A ve B reaktifleri kit protokolünde belirtildiği gibi 50:1 oranında karıştırıldı. 96 kuyulu kültür kaplarının her bir kuyusuna BSA standartlarından ve protein örneklerinden 10'ar µl eklendi. A ve B reaktiflerini içeren karışımdan her bir kuyuya 200 µl eklendi. Bu karışım 37 °C'de 30 dk inkübe edildi. Sonrasında 562 nm'de mikropłaka okuyucusunda absorbans değerleri belirlenerek standart eğri oluşturuldu. Proteinlerin konsantrasyonlarının hesaplanmasında bu standart eğri kullanılarak karşılaştırma yoluyla miktarlar belirlendi.

3.3.11. Kaspaz-3 miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi

AB12 deneysel MPM fare modelinde, EF24 ve sisplatinin kaspaz-3 miktarı üzerindeki etkisinin belirlenmesi için Biotech Mouse Caspase-3 ELISA kiti kullanıldı. Kit protokolünde belirtildiği gibi aşağıda yazılı olan işlem basamakları uygulandı.

1. Kit içeriğinde bulunan 96 kuyulu antikor ile kaplanmış kültür kabının her bir kuyusuna konsantrasyonu bilinen protein standartlarından 50 µl; streptavidin-HRP (streptavidin-yaban turpu peroksidazı)'den 50 µl eklendi. 96 kuyulu antikor ile kaplanmış kültür kabına 40 µl protein örneği, 10 µl anti kaspaz-3 antikor ve 50 µl streptavidin-HRP eklendi. Her

bir örnek için iki tekrarlı çalışıldı. Kuyuların üzeri kapatılıp çalkalayıcıda karıştırılarak 60 dk boyunca 37 °C’de bekletildi.

2. Bekleme süresinden sonra, kültür kabındaki karışım boşaltılıp kuyular kurutuldu.
3. 300 µl yıkama solüsyonu kuyulara eklenip 30 sn beklendi.
4. Bekleme süresi sonunda yıkama solüsyonu döküldü. Yıkama işlemi 5 defa tekrarlandı.
5. Her bir kuyuya kit içeriğinde bulunan kromojen A solüsyonundan 50 µl eklenip ardından 50 µl kromojen B solüsyonu eklendi.
6. Renk gelişimi için ışıktan uzak bir şekilde, 37 °C’de 15 dk inkübe edildi.
7. Reaksiyonu durdurmak için her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu eklendi.
8. Durdurma çözeltisi eklendikten sonra en fazla 10 dk içinde 450 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü.
9. Konsantrasyonu bilinen protein standartlarının OD değerlerine göre oluşturulan, standart eğriden faydalanarak protein örneklerindeki kaspaz-3 miktarı hesaplandı.

3.3.12. Bcl-2 miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi

AB12 deneysel MPM fare modelinde EF24 ve sisplatinin bcl-2 miktarı üzerindeki etkisinin belirlenmesi için Biotech Mouse Bcl-2 ELISA kiti kullanıldı. Aşağıda gösterilen işlem basamakları uygulandı.

1. Kit içeriğinde bulunan 96 kuyulu antikor ile kaplanmış kültür kabının her bir kuyusuna konsantrasyonu bilinen protein standartlarından 50 µl; streptavidin-HRP (streptavidin-yaban turpu peroksidazı)’den 50 µl eklendi. 96 kuyulu antikor ile kaplanmış kültür kabına 40 µl protein örneği, 10 µl anti bcl-2 antikor ve 50 µl streptavidin-HRP eklendi. Her bir örnek için iki tekrarlı çalışıldı. Kuyuların üzeri kapatılıp çalkalayıcıda karıştırılarak 60 dk boyunca 37 °C’de bekletildi.
2. Bekleme süresinden sonra, kültür kabındaki karışım boşaltılıp kuyucuklar kurutuldu.
3. 300 µl yıkama solüsyonu kuyulara eklenip 30 sn beklendi.
4. Bekleme süresi sonunda yıkama solüsyonu döküldü. Yıkama işlemi 5 defa tekrarlandı.
5. Her bir kuyuya kit içeriğinde bulunan kromojen A solüsyonundan 50 µl eklenip ardından 50 µl kromojen B solüsyonu eklendi.
6. Renk gelişimi için ışıktan uzak bir şekilde, 37 °C’de 15 dk inkübe edildi.

7. Reaksiyonu durdurmak için her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu eklendi.
8. Durdurma çözeltisi eklendikten sonra en fazla 10 dk içinde 450 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü.
9. Konsantrasyonu bilinen protein standartlarının OD değerlerine göre oluşturulan, standart eğriden faydalanarak protein örneklerindeki bcl-2 miktarı hesaplandı.

3.3.13. Bcl2l1 miktarının ELISA yöntemi ile belirlenmesi

AB12 deneysel MPM fare modelinde EF24 ve sisplatinin bcl2l1 miktarı üzerindeki etkisinin belirlenmesi için Biotech Mouse Bcl2l1 ELISA kiti kullanıldı. Aşağıda gösterilen işlem basamakları uygulandı.

1. Kit içeriğinde bulunan 96 kuyulu antikor ile kaplanmış kültür kabının her bir kuyusuna konsantrasyonu bilinen protein standartlarından 50 µl; streptavidin-HRP (streptavidin-yaban turpu peroksidazı)'den 50 µl eklendi. 96 kuyulu antikor ile kaplanmış kültür kabına 40 µl protein örneği, 10 µl anti bcl2l1 antikor ve 50 µl streptavidin-HRP eklendi. Her bir örnek için iki tekrarlı çalışıldı. Kuyuların üzeri kapatılıp çalkalayıcıda karıştırılarak 60 dk boyunca 37 °C'de bekletildi.
2. Bekleme süresinden sonra, kültür kabındaki karışım boşaltılıp kuyular kurutuldu.
3. 300 µl yıkama solüsyonu kuyulara eklenip 30 sn beklendi.
4. Bekleme süresi sonunda yıkama solüsyonu döküldü. Yıkama işlemi 5 defa tekrarlandı.
5. Her bir kuyuya kit içeriğinde bulunan kromojen A solüsyonundan 50 µl eklenip ardından 50 µl kromojen B solüsyonu eklendi.
6. Renk gelişimi için ışıktan uzak bir şekilde, 37 °C'de 15 dk inkübe edildi.
7. Reaksiyonu durdurmak için her kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu eklendi.
8. Durdurma çözeltisi eklendikten sonra en fazla 10 dk içinde 450 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü.
9. Konsantrasyonu bilinen protein standartlarının OD değerlerine göre oluşturulan, standart eğriden faydalanarak protein örneklerindeki bcl2l1 miktarı hesaplandı.

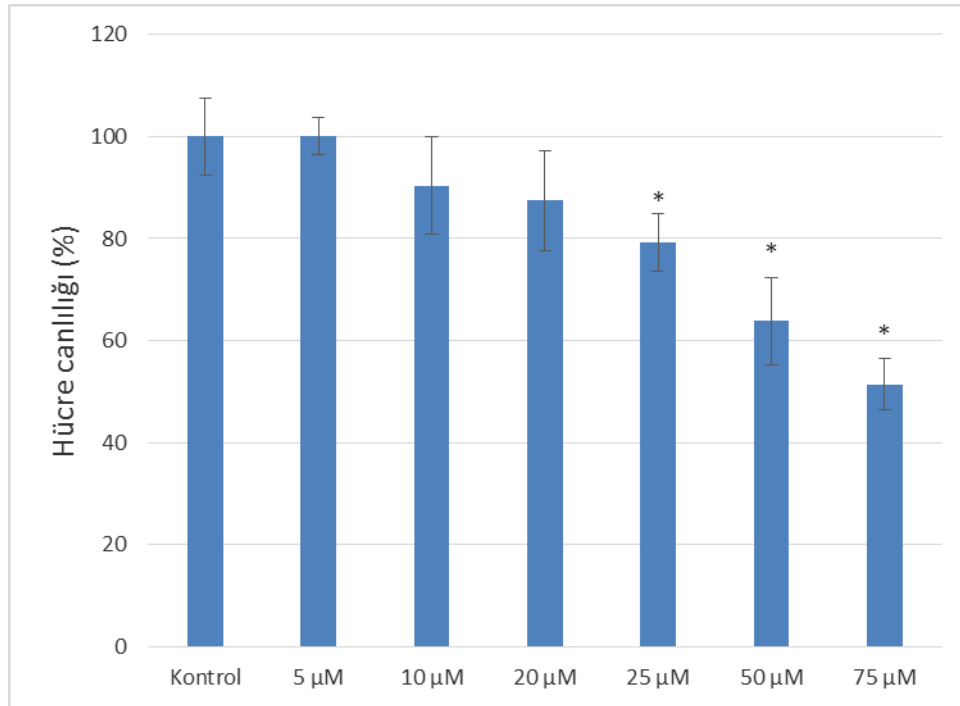
3.3.14. İstatistiksel Analiz

Elde edilen ifade düzeylerine ait verilerin gruplar arasında mRNA düzeyinde farklılık gösterip göstermediği Gapdh housekeeping mRNA gen ifadesi referans alınarak REST 2009 (Relative expression soft ware tool) yazılımı (QIAGEN) kullanılarak hesaplandı. Göreceli gen ifadelerinin hesaplanmasında kullanılan REST programı “Pfaffl” matematiksel yöntemini kullanmaktadır (Pfaffl, 2001). P değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Hücre canlılığı ve elisa testi sonuçlarına göre gruplar arasındaki farklılıklar ise “SPSS 15.0” istatistik programında Student’s t-test ve Mann-Whitney U testinin kullanılmasıyla analiz edilmiştir. Değerlendirme sonucunda $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. EF24 ve Sisplatin'in AB12 Hücrelerinde Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkilerinin MTT Yöntemi ile Değerlendirilmesi

AB12 hücrelerine EF24 ve sisplatinin tek başlarına ve birlikte uygulanmasının hücre canlılığı üzerine olan etkileri MTT yöntemi ile değerlendirildi. Elde edilen verilerin istatistiksel açıdan anlamlı olup olmadığı incelendi.

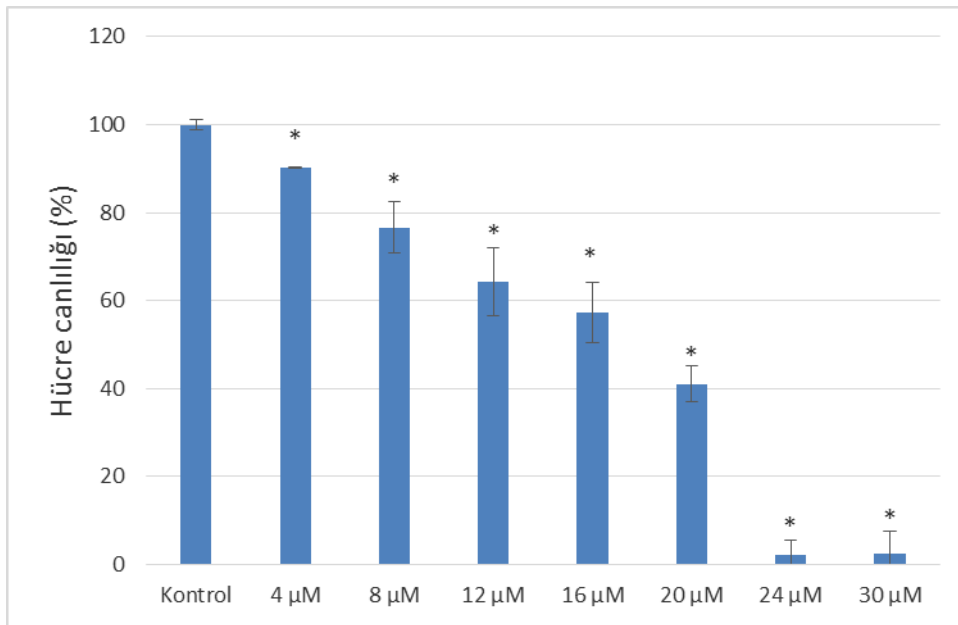


Şekil 4.1. AB12 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) sisplatin ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları. *: $p < 0,05$

Şekil 4.1’de AB12 hücrelerinin sisplatinle farklı konsantrasyonlarda (5-75 µM) 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda oluşan hücre canlılık oranları gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre; 5, 10, 20 µM sisplatin uygulanması sonucunda hücre canlılıklarındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$). 25-75 µM aralığındaki konsantrasyonlarda ise, AB12 hücrelerinin canlılığının konsantrasyona bağlı bir şekilde azaldığı ve sisplatinin çözündürüldüğü PBS ile hazırlanan PBS kontrol ile

karşılaştırıldığında, görülen bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu ($p<0,05$). Kullanılan en yüksek konsantrasyon olan $75 \mu\text{M}$ ' da hücre canlılığının %51 olduğu görüldü.

AB12 hücrelerinin EF24 ile farklı konsantrasyonlarda ($4\text{-}30 \mu\text{M}$) 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda oluşan hücre canlılık oranları Şekil 4.2'de gösterilmektedir. AB12 hücrelerinin canlılığının konsantrasyona bağlı bir şekilde azaldığı görüldü. Bu azalmanın EF24'ün çözündürüldüğü DMSO ile hazırlanan DMSO kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,05$). 24 saatlik uygulama süresi sonucunda en yüksek konsantrasyon olarak kullanılan $30 \mu\text{M}$ 'da hücre canlılığı %3 olarak belirlendi.

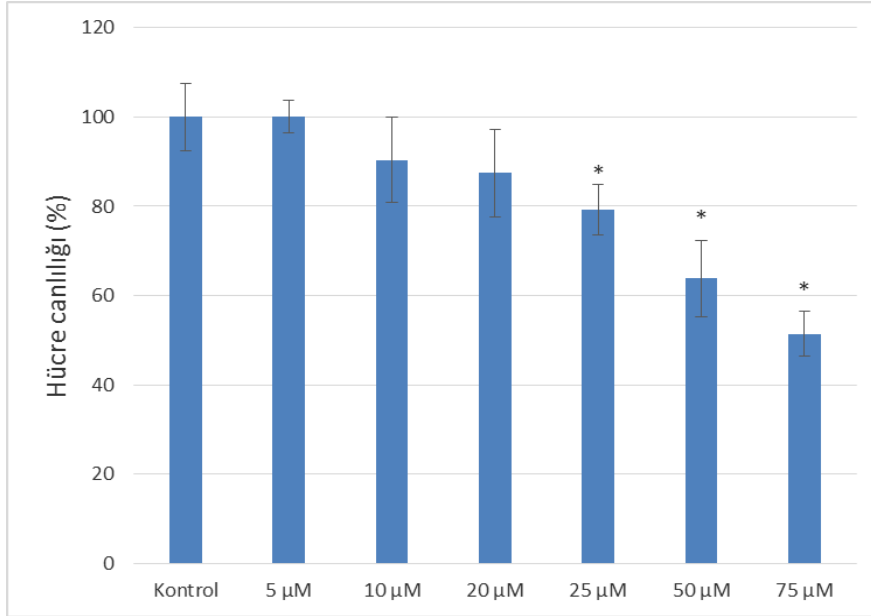


Şekil 4.2. AB12 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) EF24 ile 24 saat inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları. *: $p<0,05$

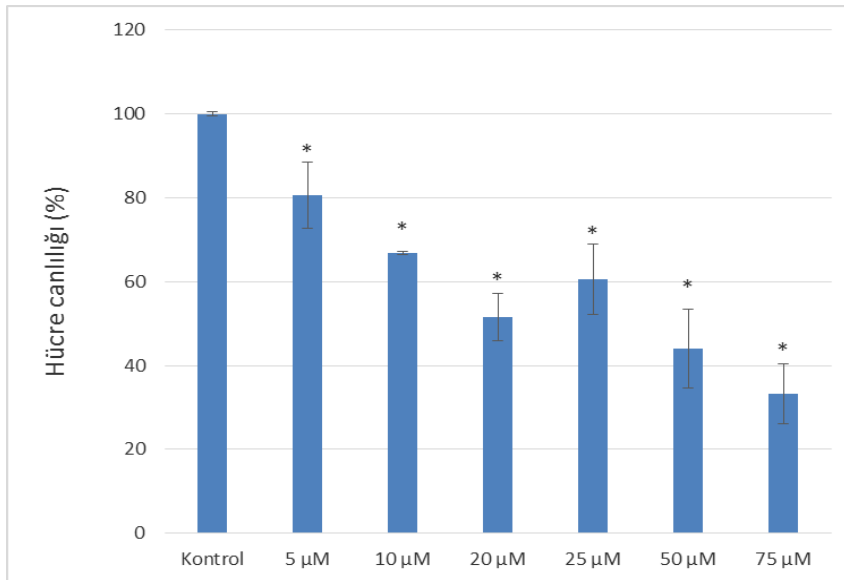
EF24 ve sisplatinin AB12 hücrelerinde 24 saat boyunca birlikte uygulanmaları sonrasında oluşan hücre canlılık oranları Şekil 4.3'de gösterilmektedir. EF24 ve sisplatinin birlikte uygulandığı grupta kontrol, PBS ve DMSO ile hazırlandı.

Şekil 4.3'de gösterildiği gibi AB12 hücrelerine EF24 ve sisplatinin birlikte 24 saat uygulanması ile sisplatinin tek başına aynı sürede uygulanmasıyla elde edilen hücre canlılık

oranları karşılaştırıldığında, EF24 ve sisplatinin birlikte uygulandığı hücrelerdeki canlılık oranının daha düşük olduğu belirlendi.

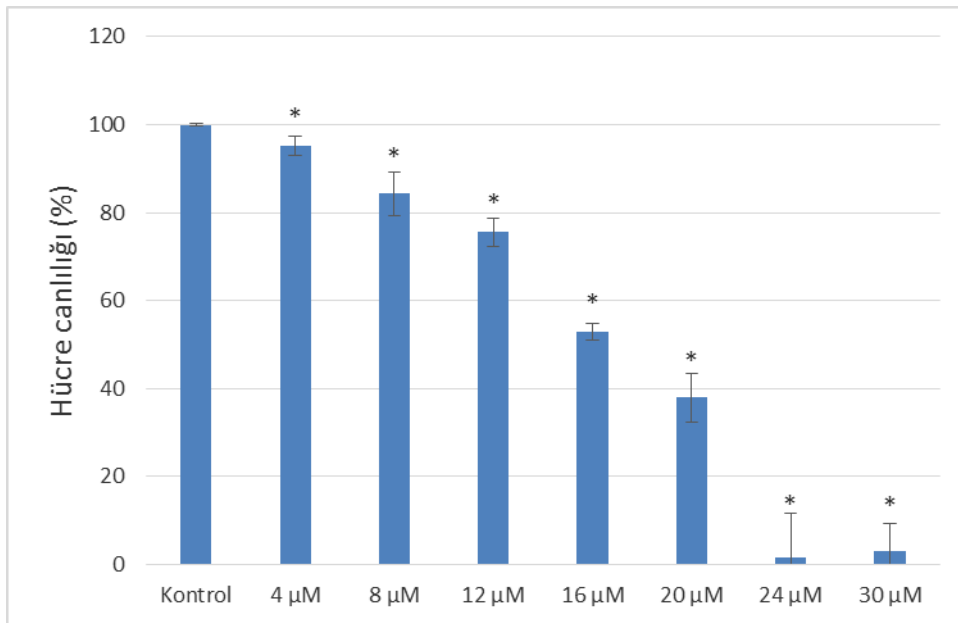


Şekil 4.3. AB12 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 24 saat EF24 ve sisplatin ile birlikte inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları. *: $p < 0,05$



Şekil 4.4. AB12 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat sisplatin ile birlikte inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları. *: $p < 0,05$

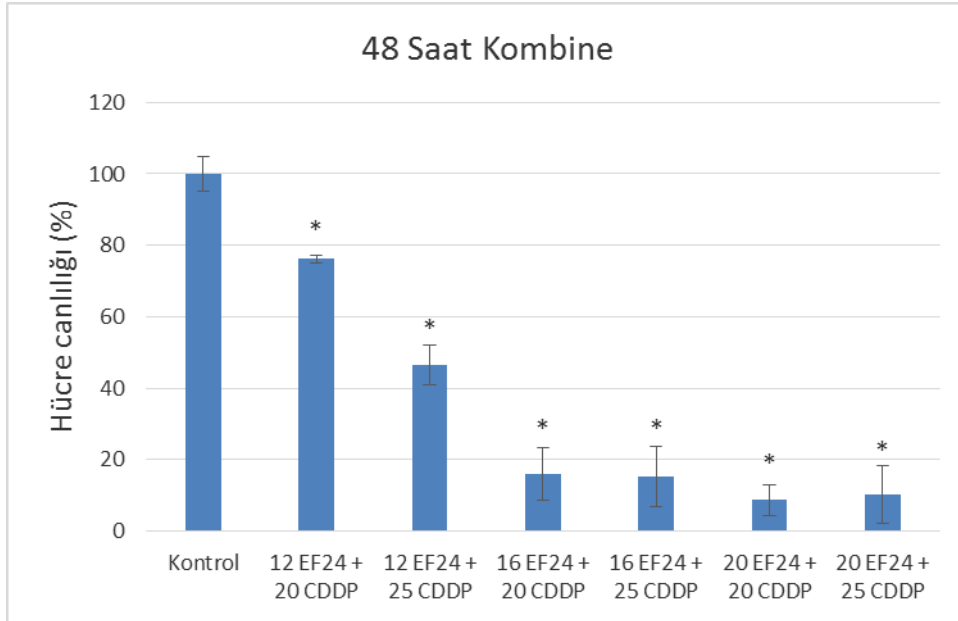
AB12 hücrelerine EF24 ve sisplatinin tek başlarına ve birlikte 48 saat uygulanması sonucu hücre canlılık oranları belirlendi. AB12 hücrelerinin sisplatin ile 5-75 μM aralığındaki konsantrasyonlarda 48 saatlik inkübasyonu sonucunda canlılık oranlarının Şekil 4.4’de gösterildiği gibi konsantrasyona bağlı bir şekilde azaldığı görüldü. Sisplatinin çözündürüldüğü PBS ile hazırlanan PBS kontrolle karşılaştırıldığında hücre canlılığındaki bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,05$). En yüksek konsantrasyon olan 75 μM ’da hücre canlılığının %33 olduğu belirlendi.



Şekil 4.5. AB12 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat EF24 ile birlikte inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları. *: $p<0,05$

4-30 μM aralığındaki EF24 konsantrasyonlarında hücre canlılığının EF24’ün çözündürüldüğü DMSO ile hazırlanan DMSO kontrole göre konsantrasyona bağlı bir şekilde azaldığı ($p<0,05$) görüldü (Şekil 4.5).

EF24 ve sisplatinin birlikte uygulanması sonrasında hücre canlılığının sisplatinin tek başına uygulanmasına göre azaldığı görüldü (Şekil 4.6). EF24 ve sisplatinin birlikte uygulandığı grupta kontrol, PBS ve DMSO ile hazırlandı.



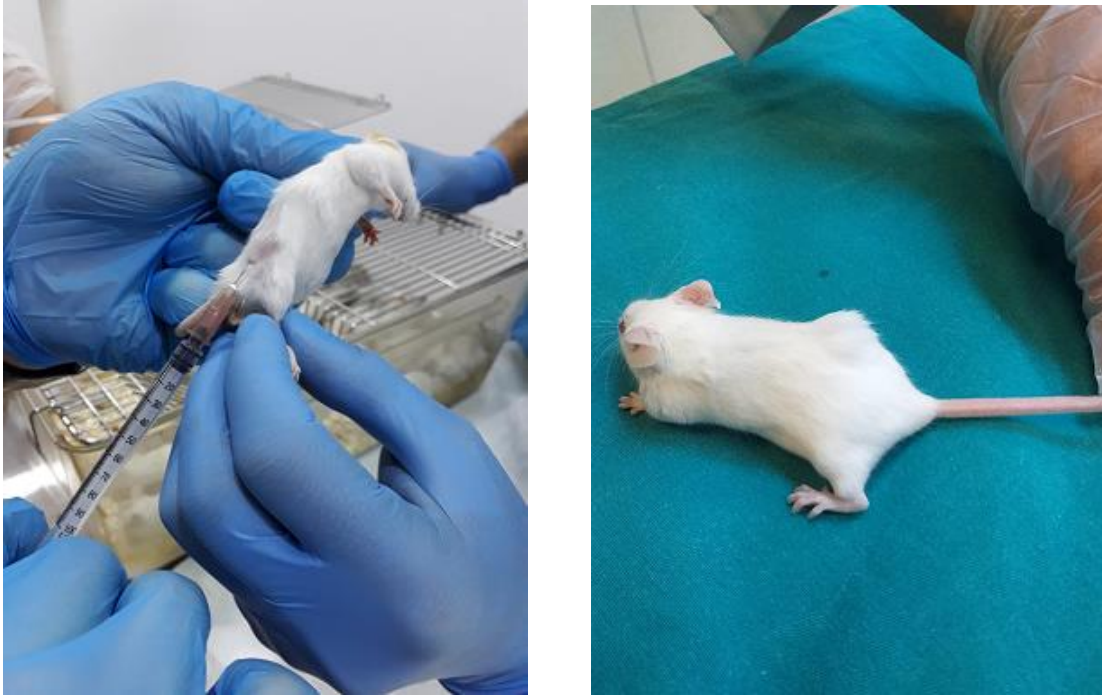
Şekil 4.6. AB12 hücrelerinin (10.000 hücre/kuyu) 48 saat EF24 ve sisplatin ile birlikte inkübasyonu sonunda belirlenen hücre canlılık oranları. *: $p < 0,05$

4.2. In Vivo Bulgular

4.2.1. In vivo MPM fare modelinin oluşturulması

Bu tez çalışmasında AB12 hücreleri subkütanöz olarak sağ taraftan aktarılacak *in vivo* MPM modeli oluşturulmuş farelerde EF24 ve sisplatin'in ayrı ayrı ve birlikte uygulamalarının apoptotik etkileri, qPCR yöntemi ile apoptotik yolda görevli olan belirli genlerin mRNA ifade düzeyleri ve ELISA kitleri ile apoptotik ve anti-apoptotik protein düzeylerine bakılarak araştırılmış ve elde edilen veriler değerlendirilmiştir.

Çalışma çerçevesinde ağırlıkları yaklaşık 20-22 g olan 6-8 haftalık dişi BALB/c fareler kullanılmıştır. AB12 hücrelerinin (1×10^5) farelere sağ taraftan s.c. enjeksiyonu (Resim 4.1 (a)) sonrasında sağlık durumları ve tümör oluşumu gūnaşırı takip edilen farelerde yaklaşık 4. hafta sonunda tümör palpe edilebilir hale geldi (Resim 4.1 (b)). Tümör oluşumundan sonra 6 gruba ayırmak üzere oluşturulan her bir grup için 4 adet dişi fare kullanılmıştır. Oluşturulan gruplarda ajanlar i.p. enjeksiyon şeklinde verildi (Resim 4.2). Ajanlar uygulanmaya başlandıktan sonra 17. günde hayvanlara ötenazi uygulandı. Hayvanların tümör, akciğer, karaciğer, böbrek, kalp dokuları alındı (Resim 4.3).



Resim 4.1. AB12 hücrelerinin farelere sağ taraftan s.c. enjeksiyonu (a) ve farede tümör oluşumu (b)



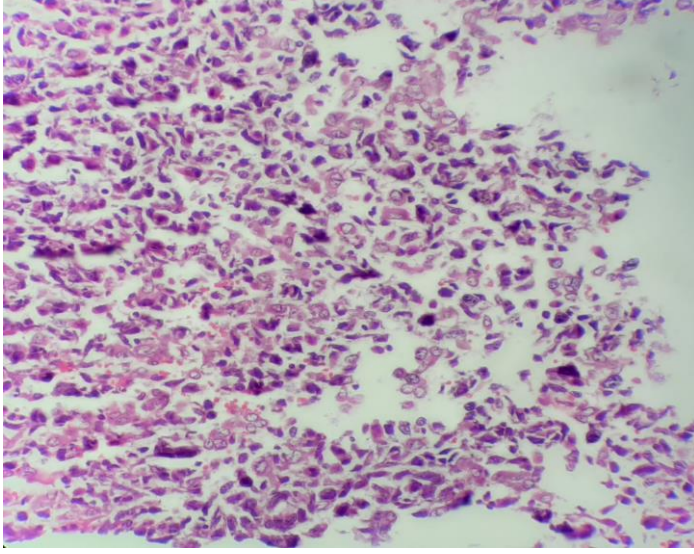
Resim 4.2. Fareye uygulanan i.p. enjeksiyon



Resim 4.3. Tümör rezeksiyonları

4.2.2. Dokuların patolojik değerdendirmesi

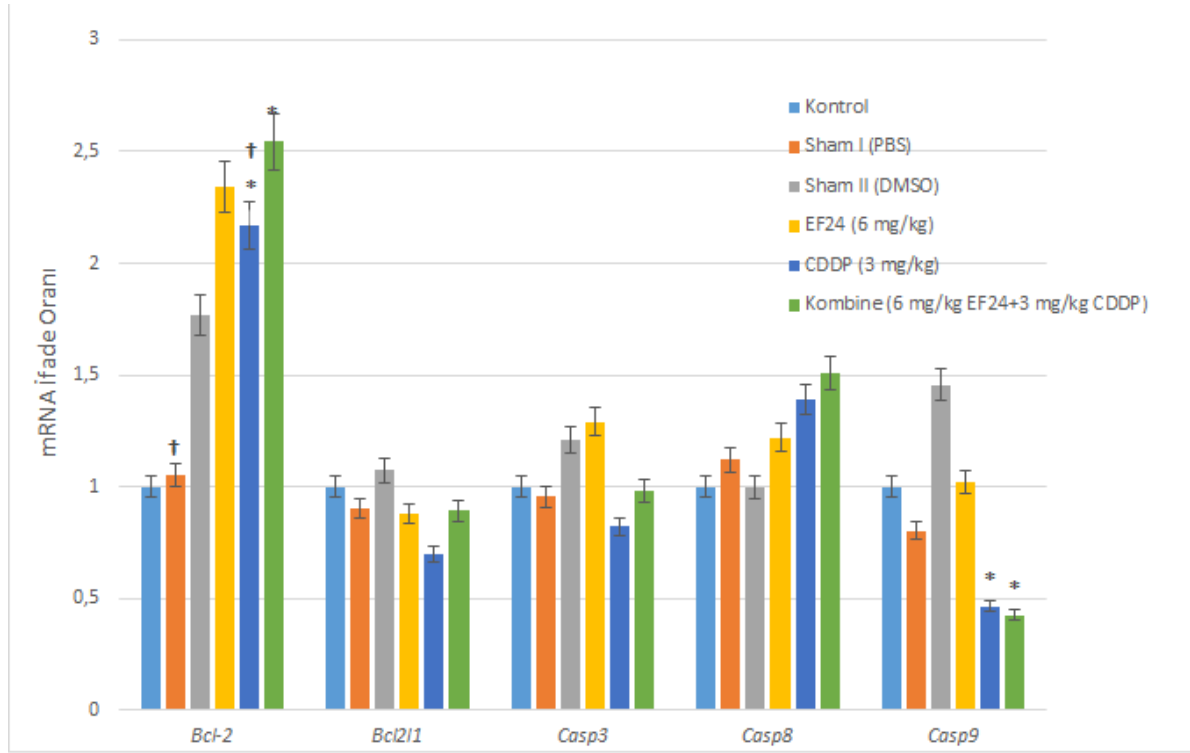
BALB/c farelere AB12 fare MPM hücrelerinin subkütanöz enjeksiyonuyla oluşturulan tümörler ötenazi sonrasında alınıp hematoksilen-eozin boyaması yapılarak patolojik incelemeleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan patolojik incelemede hem epitelyal hem de sarkomatöz histolojik alt tiplere rastlanmıştır olup, tümörün histolojik alt tipi bifazik olarak değerdendirilmiştir (Resim 4.4). Bunun yanı sıra kontrol, sham I, sham II, sisplatin, kombine gruplarında nekrotik hücre oranları sırasıyla %36, %30, %28, %21, %3 şeklinde görülmüştür. EF24 grubunda ise nekrotik alanlara rastlanmamıştır.



Resim 4.4. Epitelyal ve sarkomatöz alanlar içeren bifazik mezotelyoma (HE, X400)

4.2.3. EF24 ve sisplatin'in anti-apoptotik (*Bcl-2*, *Bcl2l1*) ve apoptotik (*Casp3*, *Casp8*, *Casp9*) genlerin mRNA ifade düzeyleri üzerine etkisinin değerlendirilmesi

AB12 hücreleriyle oluşturulan deneysel MPM fare modelinde EF24 ve sisplatinin tek başlarına ve birlikte uygulamalarının tümör hücrelerinde anti-apoptotik (*Bcl-2*, *Bcl2l1*) ve apoptotik (*Casp3*, *Casp8*, *Casp9*) genlerin mRNA ifade düzeyleri üzerindeki etkileri Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon yöntemi ile belirlendi. İlgili genlere ait mRNA ifade düzeyleri Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



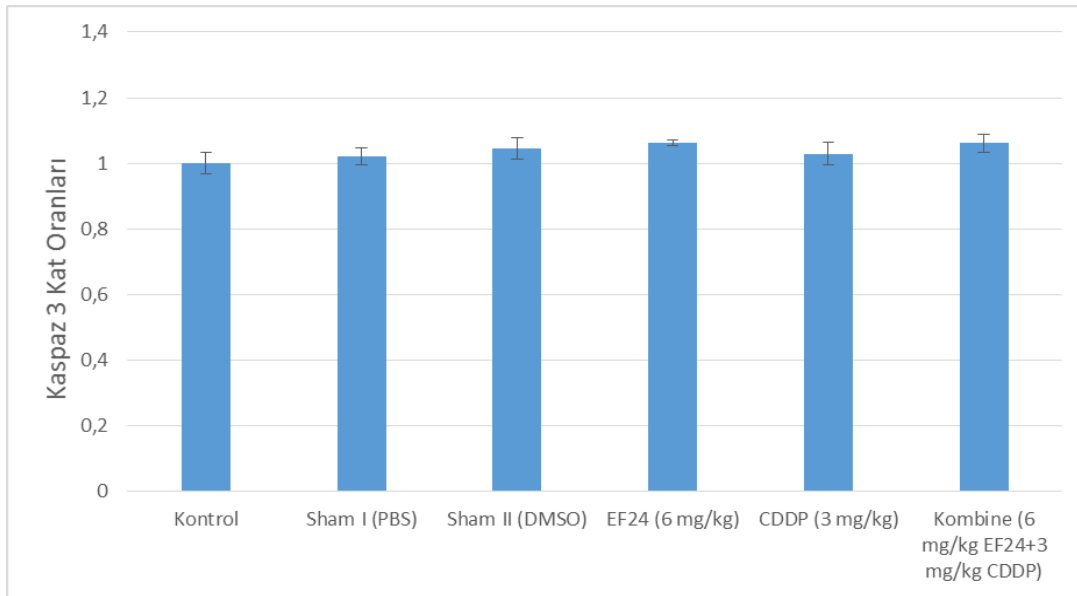
Şekil 4.7. Anti-apoptotik (*Bcl-2*, *Bcl2l1*) ve apoptotik (*Casp3*, *Casp8*, *Casp9*) genlerin mRNA ifade düzeylerinde görülen değişiklikler. *:p<0,05 (kontrolle göre), †: p<0,05 (Sham I'e göre)

Sisplatinin sham grubu olan sham I grubunda kontrole göre anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Kontrole göre, EF24'ün sham grubu olan sham II grubunda bir artış gözlenirse de istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,05$). EF24 grubunda kontrole göre anti-apoptotik gen olan *Bcl-2* mRNA ifade düzeyindeki artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,05$). Sisplatinin uygulandığı grup olan CDDP ve sisplatin ile EF24'ün birlikte uygulandığı grup olan kombine grupta ise *Bcl-2* mRNA ifade düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü ($p<0,05$). Bu artışlar CDDP grubunda kontrole karşılaştırıldığında 2,17 kat kombine grubunda ise 2,54 kat şeklinde belirlendi. CDDP grubunda sham I grubuna göre *Bcl-2* mRNA ifade düzeyinde 2,06 katlık bir artış gözlemlendi. Bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu değerlendirildi. Diğer bir anti-apoptotik gen olan *Bcl2l1* geninin mRNA ifadesinde kontrole karşılaştırıldığında sham I, sham II, EF24, CDDP ve kombine gruplarında belirgin bir fark gözlenmedi.

Apoptotik gen olan *Casp3* mRNA ifadesinde EF24 ve sham II grubunda gözlenen artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0,05$). Sham I, CDDP ve kombine grubunda ise *Casp3* mRNA ifade düzeyinde anlamlı bir değişiklik görülmedi. EF24, CDDP ve kombine gruplarında diğer bir apoptotik gen olan *Casp8* mRNA ifade düzeyinde artış gözlenirse de bu artış istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Sham I ve sham II grubunda ise kontrole göre belirgin bir fark görülmedi. Apoptotik gen olan *Casp9* mRNA düzeyinde görülen CDDP grubu için 2,15 kat ve kombine grubu için 2,34 kat şeklinde görülen azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,05$).

4.2.4. Kaspaz-3 protein miktarının değerlendirilmesi

AB12 fare MPM hücreleriyle oluşturulan deneysel fare modelinde EF24 ve sisplatinin tek başlarına ve birlikte uygulanması sonrasında tümör dokularındaki kaspaz-3 miktarı ELISA yöntemi ile belirlendi. Kaspaz-3 miktarı kat artışları şeklinde gösterildi.



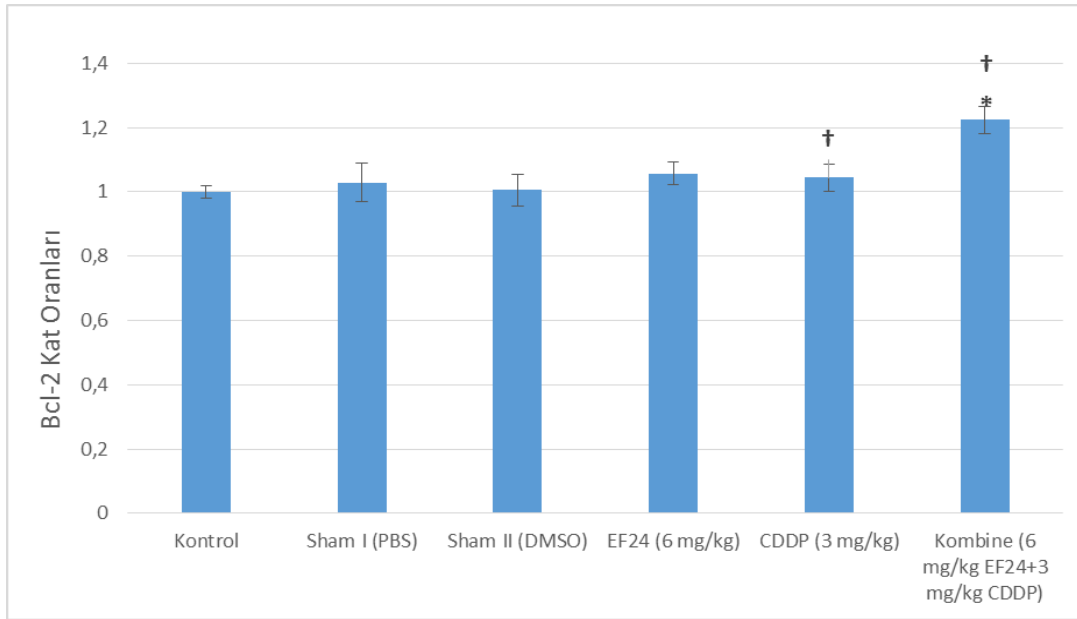
Şekil 4.8. Tümör dokularındaki kaspaz-3 miktar değişimleri.

Sisplatinin sham grubu olan sham I ve EF24'ün sham grubu olan sham II grubu kontrolle karşılaştırıldığında kaspaz-3 miktarında anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü ($p>0,05$). EF24 ve sisplatin (CDDP) tek başlarına uygulandığı gruplar olan EF24 grubunda ve CDDP grubunda ve EF24 ile sisplatinin birlikte verildiği kombine grubunda da kontrolle

karşılaştırıldığında kaspaz-3 miktarında anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p>0,05$). CDDP sham I ile ve EF24 sham II ile karşılaştırıldığında kaspaz-3 miktarında bir değişim görülmedi. Kombine grubu CDDP grubu ile karşılaştırıldığında CDDP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir değişim belirlenmedi (Şekil 4.8).

4.2.5. Bcl-2 protein miktarının değerlendirilmesi

BALB/c farelerde AB12 fare MPM hücreleriyle oluşturulan deneysel fare modelinde ajanların uygulanması sonrasında tümör dokularındaki bcl-2 miktarı ELISA yöntemi ile saptandı. Bcl-2 miktarındaki değişimler kat artışları şeklinde gösterildi.

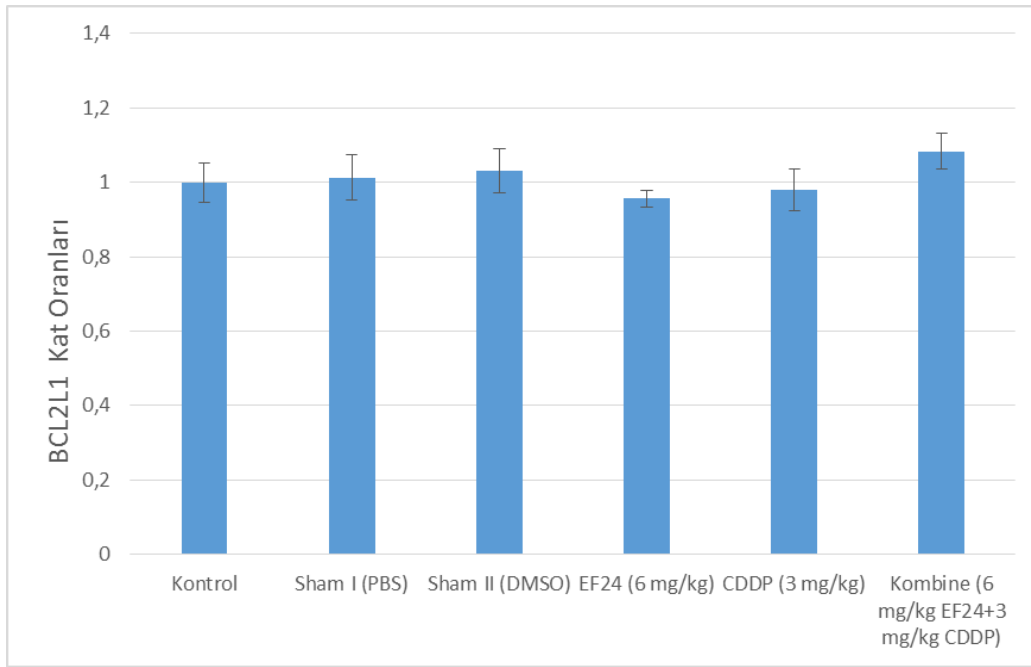


Şekil 4.9. Tümör dokularındaki bcl-2 miktar değişimleri. *: $p<0,05$ (kontrole göre), †: $p<0,05$ (CDDP'ye göre).

Sham I, sham II, EF24 ve CDDP grubu kontrolle karşılaştırıldığında bcl-2 miktarında anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü ($p>0,05$). CDDP grubu sham I grubu ile karşılaştırıldığında bcl-2 miktarında anlamlı bir değişim görülmedi. EF24 grubunda sham II grubuna göre anlamlı bir değişiklik görülmedi ($p>0,05$). Kontrolle karşılaştırıldığında 1,2 katlık artış gözlemlendi. Bu artış istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi ($p<0,05$). Kombine grubunda CDDP grubuna göre 1,17 katlık artış belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.9).

4.2.6. Bcl2l1 protein miktarının değerlendirilmesi

AB12 fare MPM hücreleriyle oluşturulan deneysel fare modelinde ajanların uygulanması sonrasında tümör dokularındaki bcl2l1 miktarı ELISA yöntemi ile değerlendirildi. Bcl2l1 miktarındaki değişimler kat artışları şeklinde gösterildi.



Şekil 4.10. Tümör dokularındaki bcl2l1 miktar değişimleri.

Sham I, Sham II, EF24, CDDP ve kombine grubu kontrolle karşılaştırıldığında bcl2l1 miktarında anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü ($p>0,05$). CDDP grubunda sham I grubuna göre bcl2l1 miktarında anlamlı bir değişim görülmedi. EF24 grubu ile sham II grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmedi ($p>0,05$). CDDP grubu ile karşılaştırıldığında kombine grubunda anlamlı bir değişim gözlenmedi ($p>0,05$) (Şekil 4.10).

4. TARTIŞMA

MPM, tanı ve tedavideki ilerlemelere rağmen kötü prognozlu bir kanserdir. İnsidansının özellikle gelişmekte olan ülkelerde artması beklenmektedir (Boyer ve diğerleri, 2018). MPM tanısı konan ve cerrahi müdahale uygulanamayan hastaların büyük bölümü için sistemik kemoterapi tedavi seçeneği olarak öne çıkmaktadır. MPM tanılı hastaların birinci basamak tedavisinde platin bazlı kemoterapötikler (sisplatin ve karboplatin) ve antifolatlar (pemetreksed/raltitrekset) altın standarttır. Sisplatinin tek başına uygulanması ile karşılaştırıldığında, kombine uygulamanın (sisplatin+pemetreksed/raltitrekset) sağ kalımı ortalama 9,3-12,1 ay arasında arttırdığı bildirilmiştir. Bu kombinasyon terapisine alternatif olarak, sisplatin-gemcitabin ve sisplatin-vinorelbin kombinasyonları da kullanılmaktadır. Kemoterapi uygulaması ile alınan cevap oranlarının yeterli olmayışı ve kullanılan ajanlara karşı direnç gelişmesi nedenleriyle, MPM, tedavisinde güçlük çekilen bir kanser olmaya devam etmektedir. Apoptoza direnç genel olarak kanserin önemli bir özelliğidir ve çoklu ilaç direncinde de etkilidir. Bu durum MPM’de de görülmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2000). Bu nedenle, kullanılan kemoterapötik ajana karşı gelişen direncin azalmasına katkıda bulunabilecek moleküllerin ve hedefe yönelik yeni ajanların tanımlanmasına yönelik araştırmalar hız kazanmıştır.

EF24, kurkuminin analogu olan sentetik bir bileşiktir. EF24’ün, farklı insan kanser hücrelerinde anjiyogenezi ve metastazı baskıladığı, hücre döngüsünü durdurduğu, apoptotik yolları aktifleştirdiği *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir (He ve diğerleri, 2018).

MPM tedavisinde, kemoterapötik ajanlar ile birlikte kullanılan yeni tanımlanan molekülleri içeren terapötik yaklaşımların klinik yararlar sağladığı bildirilmiştir (Favoni ve Florio, 2011). Günümüzde terapötik potansiyeli olabilecek aday moleküllerinin tanımlanmasına yönelik prelinik çalışmalarla elde edilen sonuçlar önem arz etmektedir.

Bu doktora tez çalışmasında kurkuminin sentetik analogu olan ve birçok kanser türünde antikanser etkisi gösterilen EF24’ün tek başına ve sisplatinle birlikte fare AB12 MPM

hücrelerine uygulanmasının apoptotik yollar üzerine olan etkilerinin *in vitro* ve *in vivo* olarak belirlenmesi hedeflenmiştir.

Çeşitli insan kanser hücrelerinde yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, EF24'ün, hücre çoğalmasını baskıladığı ve hücre ölümünü uyardığı gösterilmiştir (Subramaniam ve diğerleri, 2008; Sun ve diğerleri, 2009; Zhang ve diğerleri, 2013).

Liu ve diğerleri (2012) EF24'ün apoptoz ve hücre döngüsü üzerine olan etkisini Hepa1-6 fare karaciğer hücrelerinde araştırmıştır. Ayrıca, deneysel Hepa1-6 fare kanser modeli oluşturarak, *in vivo* şartlarda EF24'ün hücre çoğalması ve apoptoz üzerine olan etkilerini belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda, EF24'ün *in vitro* şartlarda angiogenezi engellediği, içsel yolak aracılıklı apoptozu uyardığı ve hücre döngüsünü durdurduğunu, *in vivo* şartlarda ise apoptozu uyardığını göstermişlerdir. 2013 yılında yapılan bir çalışmada (Yang ve diğerleri, 2013) EF24'ün prostat kanser (DU145) ve melanoma (B16) modelinde hücre çoğalması ve metastaz üzerindeki etkileri araştırılmıştır. EF24'ün prostat kanser hücrelerinde *in vitro* olarak, NF- κ B sinyal yolağını baskıladığını ve apoptozu uyardığını, *in vivo* olarak ise hücre çoğalmasını baskıladığını belirlemişlerdir. B16 fare melanoma hücrelerinde *in vitro* olarak apoptozun uyarıldığını ve singeneik fare melanoma modelinde metastazın engellendiğini göstermişlerdir. Anabilim Dalımızda gerçekleştirilen çalışmada EF24'ün tek başına veya HDAC inhibitörleri (MS-275 ve salermid) ile birlikte pankreas kanseri hücre hattı BxPC-3 üzerindeki etkisi *in vitro* olarak incelenmiştir. EF24'ün, MS-275 ve salermid ile birlikte uygulandığında, hücre çoğalmasını azalttığı ve G1 fazında hücre döngüsünü durdurabildiği gösterilmiştir (Sağlam ve diğerleri, 2016). EF24'ün MPM üzerindeki etkisi ile ilgili olarak Anabilim Dalımızda gerçekleştirilen diğer bir çalışmada (Önen ve diğerleri, 2015) EF24'ün tek başına ve cisplatin veya okzaliplatin ile ardışık uygulanmasının malign plevral mezotelyoma (MSTO-211H) ve nonmalign mezotelyal hücre hattı MeT-5A'da apoptotik yolak üzerindeki etkileri araştırılmıştır. EF24'ün platinyum temelli ajanların etkisini arttırdığı, nonmalign mezotelyal hücrelerde bu ajanların sitotoksik etkisini azalttığı ve ayrıca MPM hücrelerinin hücre ölüm cevabını arttırdığı belirlenmiştir. Bu çalışmada EF24'ün MPM üzerinde *in vitro* şartlardaki etkisi incelenmiş olup *in vivo* şartlardaki etkisi üzerine literatürde bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Ayrıca Önen ve diğerleri tarafından yapılan bu çalışma dışında EF24'ün MPM üzerindeki etkisiyle ilgili başka *in vitro* bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

Çalışmamızda MPM hücreleri üzerinde EF24 ve sisplatinin tek başına ve/veya birlikte uygulanmasının apoptotik yolak üzerindeki etkilerini araştırmak üzere, AB12 fare MPM hücreleri kullanılmıştır. Bu ajanların *in vitro* ve *in vivo* apoptotik etkilerini belirlemeyi amaçladığımız çalışmamızın *in vivo* bölümünde allograft tümör modeli oluşturulması için fare MPM hücre hattının kullanılması gerekliliğinden dolayı AB12 fare MPM hücreleri çalışmamızda kullanılmak üzere seçilmiştir.

EF24 ve sisplatinin tek başlarına ve birlikte AB12 hücrelerine uygulanmasının hücre canlılığı üzerine olan etkisi MTT yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sisplatinin AB12 hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkilerini belirlerken denenecek sisplatin konsantrasyon aralığı literatür taraması yapılarak belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, dört insan MPM hücre hattında (H2373, H2461, H2714 ve H2595) sisplatinin 0-80 μM arasındaki konsantrasyonları denenmiş ve 80 μM üzerindeki konsantrasyonlarında hücre canlılığında azalma olmadığı belirlenmiştir (Wang ve diğerleri, 2011). Diğer bir çalışmada ise, üç insan MPM hücre hattında (M14K, M38K ve ZL34) sisplatinin 0-100 μM arasındaki konsantrasyonları çalışılmıştır (Vandermeers ve diğerleri, 2009). Bu nedenle, bu tez çalışmasında sisplatinin 0-75 μM aralığındaki konsantrasyonları denenmiştir.

EF24'ün çalışmamızda kullanılacak konsantrasyon aralığı belirlenirken yapılan literatür taramasında, EF24'ün MPM hücrelerinde kullanıldığı tek bir çalışmaya rastlanmıştır. Anabilim Dalımızda gerçekleştirilen bu çalışmada, insan bifazik MSTO-211H hücrelerinde EF24'ün 0,5-32 μM aralığındaki konsantrasyonları uygulanmış, 2 μM 'ın üstündeki konsantrasyonlarda hücre canlılığında anlamlı azalma görülmüştür. EF24 kurkumin analogu bir bileşiktir. Wang ve diğerleri (2011) tarafından yapılan çalışmada AB12 hücrelerine 0-50 μM aralığındaki kurkumin konsantrasyonları uygulanmıştır. Literatürde AB12 hücrelerinde kullanılan EF24 konsantrasyonları ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. EF24'ün kurkuminden daha potent olması ve EF24'ün insan MPM hücre hattı MSTO-211H' da kullanıldığı konsantrasyonlar göz önünde bulundurularak tez çalışmamızda kullanılan konsantrasyonlar belirlenmiştir. AB12 fare MPM hücrelerine

EF24 ve sisplatinin ayrı ayrı ve birlikte uygulanması sonrasında sisplatin uygulanan hücrelerin 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonrasında 20 μ M ve üstündeki konsantrasyonlarda hücre canlılığının zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. EF24 uygulanan hücrelerde 4-30 μ M aralığındaki EF24 konsantrasyonlarında 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrasında hücre canlılığının konsantrasyona bağlı bir şekilde azaldığı görüldü. Uygulanan ajanlar farklı hücrelerde hücre canlılığı üzerinde farklı etkiler yaratabilmektedir. Literatürde yapılan çalışmalar ile çalışmamızda kullanılan konsantrasyon aralıklarındaki hücre canlılık oranlarındaki azalma ile ilgili bulgularımız uyumlu bulunmuştur. Bu iki ajanın çeşitli konsantrasyonlarının AB12 hücrelerine birlikte uygulanması sonrasında sisplatinin tek başına uygulanmasına göre hücre canlılık oranlarının belirgin oranda düştüğü belirlendi. EF24'ün kanser hücrelerinde diğer ajanların etkisini arttırdığı ve hücreleri duyarlı hale getirdiği çalışmalar mevcuttur (Bertazza ve diğerleri, 2018). EF24'ün tek başına veya adrenokortikal kanser için referans ilaç olarak kullanılan mitotanla birlikte, iki adrenokortikal tümör hücre hattında (SW13 ve H295R) hücre canlılığı ve metastaz üzerindeki etkisinin değerlendirildiği çalışmada (Bertazza ve diğerleri, 2019) her iki hücre hattında da EF24'ün mitotanın etkisini arttırdığı belirlenmiştir. SGC-7901 ve BGC-823 mide kanseri hücrelerine, AKT' nin allosterik inhibitörü olan MK-2206 ile EF24'ün birlikte uygulanması sonucu, her iki ajanın sinerjistik etki göstererek apoptozu uyardığı ve hücre döngüsünü durdurduğu gösterilmiştir (Chen ve diğerleri, 2017).

Çalışmamızın *in vivo* bölümünde deneysel AB12-MPM fare modeli oluşturuldu. Literatürde MPM modeli oluşturulurken dişi BALB/c fareler kullanılmıştır (Cheriyen ve diğerleri, 2014; Yang ve diğerleri, 2012). Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak 6-8 haftalık dişi BALB/c fareler kullanılmıştır. Tümör oluşumundan sonra fareler her grupta 4 fare olacak şekilde 6 gruba ayrılmıştır. Sisplatinin uygulanacak konsantrasyonu 3 mg/ml, EF24' ün ise 6 mg/ml şeklinde planlanmıştır. Sisplatinin konsantrasyonu ve veriliş sıklığı Hamaguchi ve diğerleri (2010) tarafından yapılan çalışma referans alınarak belirlenmiştir. EF24'ün MPM modeli oluşturulmuş farelere uygulandığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Ancak diğer *in vivo* kanser modellerinde EF24' ün 3-20 mg/kg arasındaki konsantrasyonları her gün uygulanmakla beraber EF24' ün başka bir ajanla birlikte kullanılması durumunda 3 ve 6 mg/kg konsantrasyonlarda uygulandığı görülmüştür.

EF24'ün tek başına ve diğer ajanlarla birlikte uygulandığı konsantrasyonlar bire bir uygulanmasa da göz önünde bulundurulmuştur (Chen ve diğerleri, 2016; Chen ve diğerleri, 2017; Zou ve diğerleri, 2016). Ajanların uygulanmaya başlanmasından sonra 17. günde hayvanlara ötenazi uygulandı. Ötenazi sonrası tümör dokusu ile diğer sağlıklı dokular alındı. Tümör dokularında makroskobik olarak sisplatin, EF24 ve kombine gruplarında kontrole ve sham gruplarına göre küçülme gözlemlendi. Alınan dokuların bir kısmı patolojik inceleme için ayrılırken diğer bir kısmı ise moleküler analizler için kullanıldı. Yapılan patolojik incelemede tümör dokularının histolojik alt tipi bifazik olarak belirtilmiş olup AB12 hücrelerinin histolojik alt yapısıyla uyumlu olduğu görülmüş ve tümör dokusunun varlığı doğrulanmıştır. EF24, sisplatin ve kombine gruplarda nekrotik hücre oranının kontrol ve sham gruplarına göre az olduğu değerlendirilmiştir.

Apoptoz, kaspaz aktivitesi, nükleer yoğunlaşma, hücre proteinlerin bozulması ve apoptotik cisimlerin oluşumu şeklinde gözlenen bir süreçtir. Aynı zamanda karsinogenezde önemli rol oynamaktadır. Bu nedenle kullanılan ajanların tek başına ve/veya birlikte kullanıldıklarında MPM fare modelindeki apoptotik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla hem apoptotik ve antiapoptotik mRNA ifade düzeyindeki değişimler hem de apoptotik ve antiapoptotik protein düzeyindeki değişimler belirlendi. Bu amaçla Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyon yöntemi ile apoptotik *Casp3*, *Casp8* ve *Casp9* ile antiapoptotik *Bcl-2* ve *Bcl2l1* genlerinin mRNA ifade değişimleri ve ELISA yöntemi ile kaspaz 3, bcl-2 ve bcl2l1 protein miktarlarındaki değişimler incelendi. Sisplatin ve EF24'ün birlikte uygulandığı grup olan kombine grubu ile sisplatinin uygulandığı grupta kontrole göre *Bcl-2* mRNA ifadesinde anlamlı artış gözlenmiştir. Aynı zamanda sham I grubuna göre sisplatin uygulanan grupta yine *Bcl-2* geninin mRNA ifadesinde anlamlı artış olduğu görülmüştür. *Bcl2l1*, *Casp3* ve *Casp8* genlerinin mRNA ifade düzeyinde gruplar arasında ve kontrole göre anlamlı bir fark gözlenmedi. *Casp9* geninin mRNA ifadesinde ise kombine grubu ve sisplatin uygulanan grupta kontrole göre anlamlı bir azalış gözlenmiştir.

Kaspaz 3 protein miktarında gruplarda kontrole göre anlamlı bir değişim belirlenmedi. Literatürde EF24'ün *in vivo* MPM modelinde kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak EF24'ün insan gastrik kanser hücreleriyle oluşturulan *in vivo* modelde EF24'ün,

ROS aracılı ER stresi yoluyla apoptotik hücre ölümünü uyardığı ve 5-fluorourasil ile uyarılan tümör büyümesinin baskılamasını sinerjistik olarak arttırdığı belirtilmiştir (Zou ve diğerleri, 2016). EF24 ve Akt inhibitörü olan MK-2206'nın birlikte kullanımının gastrik kanser deneysel fare modelinde, tek ajan gruplarına kıyasla aktif kaspaz 3 miktarını arttırdığı belirtilmiştir (Chen ve diğerleri, 2017). Kaspazlar, apoptozda önemli rol oynayan proteazlardır. Efektör kaspazlar grubunun önemli üyelerinden biri olan kaspaz 3, çeşitli hedef proteinleri böler ve apoptozda görülen morfolojik değişikliklere neden olur. Bu nedenle apoptozun önemli belirteçlerinden biridir (Pfeffer ve Singh, 2018).

Bununla birlikte Bcl-2 protein miktarında kontrole ve sisplatin uygulanan gruba göre kombine grubunda anlamlı bir artış gözlemlendi. Görülen bu artış anlamlı bulunsa da artışın miktarının fazla olmadığı değerlendirildi. Bcl-2'nin aşırı ifadesi ile antikanser ilaçlara karşı oluşan direnç arasında ilişki olduğu belirtilmiştir. (Yip ve Reed, 2008). Yapılan bir çalışmada insan mesane kanseri hücre hattı (T24) ile CDDP dirençli alt klonunun karşılaştırıldığında bcl-2'nin ifadesinin artışının sisplatin direncinin gelişimi ile ilgili olduğu görülmüştür (Cho ve diğerleri, 2006). Ayrıca, A549 akciğer kanseri hücre hattı ile yapılan gen sessizleştirme çalışmasında bcl-2'nin ifadesindeki azalışın sisplatine olan duyarlılığı arttırdığı belirtilmiştir (Losert ve diğerleri, 2007). Steroidal olmayan anti inflamatuvar ilaç olan Selekoksib ile akciğer kanseri hücre hatlarında (SK-MES-1, SK-LU-1 ve COLO 699N) yapılan çalışmada, yüksek (50 μ M) ve düşük (5 μ M) konsantrasyonlardaki selekoksibin apoptoz üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Selekoksibin yüksek ve düşük konsantrasyonda uygulanmasıyla 3 hücre hattında da kaspaz-3, 8 ve 9 aktivitesinin gözlenmediğini, bcl-2, bcl2l1 mRNA ifadesinde ise artışın gözlemlendiğini ve bu durumun apoptoz direncine yol açtığını belirtmişlerdir (Gradilone ve diğerleri, 2007).

Gelişimde, farklılaşmada, hücresel homeostazda, malign hücrelerin ortadan kaldırılmasında önemli rolü olan programlı hücre ölümü kanser kemoterapisinde önemli bir hedeftir. Programlı hücre ölümüne apoptoz ve otofaji örnek verilebilir (Liu ve diğerleri, 2018). Yapılan çalışmalarda apoptoz ve otofajinin düzenlenmelerinin birbiriyle bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Lee ve diğerleri, 2016). Hücrenin ortamına ve hücresel strese bağlı olarak apoptoz ve otofaji aynı anda, sırayla veya sadece biri gelişebilir (Liu ve diğerleri, 2018). Bcl-2 ailesinin bcl-2, bcl2l1 ve mcl1 gibi anti-apoptotik üyelerinin hem apoptoz

hem de otofajinin düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Bu proteinler sadece Bax ve Bak'ı baskılayarak apoptozu inhibe etmekle kalmaz, aynı zamanda otofagozom oluşumunda yer alan otofajiye bağlı protein Beclin-1 ile etkileşime girerek antiotofajik düzenleyiciler olarak işlev görür. Bu etkileşim, konuma bağlı bir şekilde Beclin-1 aracılı otofajinin uyarılmasını engeller. Bcl-2, bcl2l1 ve mcl1 büyük ölçüde mitokondride yerleşmiş olsa da, sadece endoplazmik retikulumda yerleşmiş bcl-2 aile üyeleri, otofajiyi inhibe edebilir. (Maiuri ve diğerleri, 2007; Pattingre ve diğerleri, 2005). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlardan yola çıkarak EF24'ün AB12 MPM hücre hattında hücre canlılığını konsantrasyona bağlı bir şekilde azalttığını ve sisplatinle birlikte kullanıldığında ise hücre canlılığındaki azalma yönünden sisplatinin etkisini arttırdığını belirledik. Oluşturulan deney hayvanı modelinde elde ettiğimiz sonuçlarda ise apoptozun uyarılmadığı görülmektedir. Yu ve diğerleri (2012) EF24'ün A549 akciğer kanseri hücre hattında hangi hücre ölüm mekanizmasıyla etki ettiğini araştırmışlardır. Çalışmada hücre ölümünü otofaji ve apoptoz arasındaki ilişki üzerinden değerlendirmişlerdir. EF24'ün IC₅₀ konsantrasyonunu 8,5 µM olarak bulmuşlardır. 4 ve 8 µM konsantrasyonda otofajinin gözlemlendiğini 16 µM'da ise apoptozun önemli rol oynadığını göstermişlerdir. EF24'ün farklı konsantrasyonlarda farklı hücre ölüm mekanizmalarını uyarabileceğini belirtmişlerdir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

MPM nadir görülen bir kanser türü olarak bilinmesine karşın, geçtiğimiz 10 yılda görülme sıklığı artmıştır. Günümüzde kullanılan radyasyon ve kemoterapi gibi geleneksel tedavilere cevabı düşüktür. Hastalarda, birinci basamak tedavide kemoterapötik olarak kullanılan platin bazlı ajanlara karşı direnç oluşumu da gözlenmektedir. Günümüzde, hastalığın seyri ve tanısında kullanılabilecek yeni belirteçler ve terapötik hedeflere yönelik araştırmalar hız kazanmıştır. Platin bazlı ajanların etkisini artıran ya da tümör hücrelerinde kemoterapötik ajana karşı oluşan direnci azaltan terapötik potansiyeli olabilecek aday moleküllerin *in vitro* ve *in vivo* prelinik çalışmalarla tanımlanması önemlidir.

Doktora tez çalışmasının *in vitro* bölümünde, AB12 fare MPM hücrelerine EF24 tek başına uygulandığında, hücre canlılığının konsantrasyona bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir. EF24 ve sisplatinin birlikte uygulandığı hücrelerdeki canlılık oranları ile sisplatinin tek başına uygulanması sonucunda elde edilen veriler karşılaştırıldığında, EF24'ün, sisplatin ile uyarılan hücre ölüm cevabını arttırdığı belirlenmiştir. Doktora tez çalışmasının *in vivo* bölümünde ise, deneysel AB12 fare MPM modeli oluşturularak, EF24 ve sisplatinin tek başına ve/veya birlikte uygulanmasının antiapoptotik (*Bcl-2* ve *Bcl2l1*) ve proapoptotik (*Casp3*, *Casp8* ve *Casp 9*) genlerin mRNA düzeyindeki ifadeleri ile *bcl-2*, *bcl2l1* ve *casp3* protein seviyelerine olan etkileri belirlendi. Tümör dokularında, sisplatinin tek başına uygulandığı grup ile sisplatin ve EF24'ün birlikte uygulandığı gruplarda, mRNA düzeyinde *Bcl-2* ifade artışı, *Casp 9* ifade azalışı sisplatine karşı gelişen direnç nedeniyle apoptozun uyarılmadığını göstermiştir. *Bcl-2* proteininin miktarının sisplatin ve EF24'ün birlikte uygulandığı gruplarda arttığı görüldü. *Bcl-2* ailesi üyeleri endoplazmik retikulumda veya mitokondride yerleşim göstermektedirler. Mitokondride yerleşim gösteren *bcl-2* ailesi üyeleri apoptozun düzenlenmesinde rol alırken, endoplazmik retikulumda yerleşim gösteren *bcl-2* ailesi üyeleri otofajiye bağlı protein Beclin-1 ile etkileşime girerek otofajinin baskılanmasına neden olurlar. Bununla birlikte otofaji uyarıldığı zaman *bcl-2* protein miktarının arttığı, çalışmalarda gösterilmiştir. Bu anlamda *bcl-2*'nin lokalizasyonunun belirlenmesinin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Deneysel fare modelleri insanlardan fizyolojik olarak farklı olsa da, histolojik açıdan benzerlikler gösterir ve immünokompetan bir çevrede araştırma yapılmasına olanak sağlar. *In vitro* modellerle karşılaştırıldığında ilaç uygulamalarında verilen ajanın fizyolojik bir çevrede metabolizması söz konusudur. Bu nedenle *in vitro* deneylerden elde edilen sonuçların *in vivo* deneylerle de desteklenmesi önemli bir role sahiptir. Bununla birlikte deneysel fare modellerinde bazı güçlükler yaşanabilmektedir. Tümör gelişimi fareler arasında farklılık gösterebilir. Metastaz oluşumu olasılığı nedeniyle başka tümör tipleri oluşabilir. İmmünokompetan modellerde tamamen işlevsel bir immün sistemi mevcuttur. Malign mezotelyoma hücrelerinin subkütanöz veya ortotopik (intraplevral veya intraperitoneal) enjeksiyonuyla, deneysel malign mezotelyoma fare modellerinin oluşturulduğu bildirilmiştir. BALB/c farelerde deneysel MPM modeli oluşturulurken AB12 veya AB1 hücrelerinin kullanıldığı belirtilmiştir. Bu farelerle oluşturulan modelde işlevsel bir immün sistemi mevcuttur. İmmünokompetan intraplevral modeller, enjeksiyon için plevral boşluğa ulaşılması gerektiğinden yaygın olarak kullanılan bir yöntem değildir. Subkütanöz enjeksiyon kullanılarak oluşturulan modeller, tümör boyutunun ölçülebilmesi ve terapötiklerin tümör içine enjeksiyonunun yapılabilmesi açısından avantaj sağlamaktadır. Ancak bu modellerde oluşturulan tümörler patofizyolojik anlamda uygun bir konumda bulunmamaktadırlar. Bu nedenle çalışmamızdan elde edilen sonuçların ortotopik deneysel MPM modelinde de araştırılmasının EF24'ün terapötik potansiyelinin değerlendirilmesi açısından yararlı olacağı düşüncesindeyiz.

EF24'ün farklı konsantrasyonlarının farklı hücre ölüm mekanizmalarının uyarılmasına neden olduğu *in vitro* şartlarda gösterilmiştir. Çalışmamızda deneysel MPM fare modelinde EF24'ün apoptotik yollar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu anlamda diğer hücre ölüm tipleriyle ilişkili belirteçler kullanılarak ek çalışmaların yapılması daha uygun olacaktır. Bunun yanı sıra EF24'ün deneysel fare modelinde farklı konsantrasyonları kullanılarak apoptotik yollar üzerindeki etkisinin araştırılmasının bu ajanın apoptotik etkisinin ortaya çıkarılmasına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, diğer araştırmacılar tarafından yapılacak prelinik çalışmalardan elde edilecek sonuçlarla desteklenirse EF24'ün MPM'de hücre ölüm mekanizması üzerindeki rolü belirlenmiş olacaktır.

KAYNAKLAR

- Acton, V. (2014). Preventing pleural mesothelioma in patients with recognizable asbestos-related pleural plaques. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 148(4), 1763-1763.
- Adams, B. K., Ferstl, E. M., Davis, M. C., Herold, M., Kurtkaya, S., Camalier, R. F Hollingshead, M.G., Kaur, G., Sausville, E.A., Rickles, F.R. and Snyder J. P. (2004). Synthesis and biological evaluation of novel curcumin analogs as anti-cancer and anti-angiogenesis agents. *Bioorganic and medicinal chemistry*, 12(14), 3871-3883.
- Allen, T. C. (Editor). (2015). *Diffuse malignant mesothelioma*. Newyork: Springer, 11-14, 75-76.
- Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., and Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular pharmaceutics*, 4(6), 807-818.
- Andrews, P. M., and Porter, K. R. (1973). The ultrastructural morphology and possible functional significance of mesothelial microvilli. *The Anatomical Record*, 177(3), 409-426.
- Attanoos, R. L., and Gibbs, A. R. (1997). Pathology of malignant mesothelioma. *Histopathology*, 30(5), 403-418.
- Attanoos, R. L., Churg, A., Galateau-Salle, F., Gibbs, A. R., and Roggli, V. L. (2018). Malignant mesothelioma and its non-asbestos causes. *Archives of pathology and laboratory medicine*, 142(6), 753-760.
- Austin, M. B., Fechner, R. E., and Roggli, V. L. (1986). Pleural malignant mesothelioma following wilms' tumor. *American journal of clinical pathology*, 86(2), 227-230.
- Baris, I., Artvinli, M., Saracci, R., Simonato, L., Pooley, F., Skidmore, J., and Wagner, C. (1987). Epidemiological and environmental evidence of the health effects of exposure to erionite fibres: A four-year study in the cappadocian region of turkey. *International Journal of Cancer*, 39(1), 10-17.
- Baris, Y. I., Simonato, L., Saracci, R., Skidmore, J. W., and Artvinli, M. (1981). Malignant mesothelioma and radiological chest abnormalities in two villages in central Turkey: An epidemiological and environmental investigation. *The Lancet*, 317(8227), 984-987.

- Baumann, F., Ambrosi, J. P., and Carbone, M. (2013). Asbestos is not just asbestos: an unrecognised health hazard. *The Lancet Oncology*, 14(7), 576-578.
- Belli, C., Fennell, D., Giovannini, M., Gaudino, G., and Mutti, L. (2009). Malignant pleural mesothelioma: current treatments and emerging drugs. *Expert opinion on emerging drugs*, 14(3), 423-437.
- Bertazza, L., Barollo, S., Mari, M. E., Faccio, I., Zorzan, M., Redaelli, M., Rubin, B., Armanini, D., Mian, C., 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.
- Bertazza, L., Sensi, F., Cavedon, E., Watutantrige-Fernando, S., Censi, S., Manso, J., Vianello, F., Casal Ide, E., Iacobone, M., Pezzani, R., and Mian, C. (2018). EF24 (a curcumin analog) and ZSTK474 emphasize the effect of cabozantinib in medullary thyroid cancer. *Endocrinology*, 159(6), 2348-2360.
- Bibby, A. C., Tsim, S., Kanellakis, N., Ball, H., Talbot, D. C., Blyth, K. G., Maskell, N.A. and Psallidas, I. (2016). Malignant pleural mesothelioma: an update on investigation, diagnosis and treatment. *European Respiratory Review*, 25(142), 472-486.
- Bolden, J. E., Peart, M. J., and Johnstone, R. W. (2006). Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nature reviews Drug discovery*, 5(9), 769-784.
- Boyer, A., Pasquier, E., Tomasini, P., Ciccolini, J., Greillier, L., Andre, N., and Mascaux, C. (2018). Drug repurposing in malignant pleural mesothelioma: a breath of fresh air?. *European Respiratory Review*, 27(147).
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 0, 1–31.
- Britton, M. (2002). The epidemiology of mesothelioma. In *Seminars in oncology*, 29(1), 18-25.
- Cao, C., Tian, D., Park, J., Allan, J., Pataky, K. A., and Yan, T. D. (2014). A systematic review and meta-analysis of surgical treatments for malignant pleural mesothelioma. *Lung cancer*, 83(2), 240-245.
- Carbone, M., Kratzke, R. A., and Testa, J. R. (2002). The pathogenesis of mesothelioma. In *Seminars in oncology*, 29(1), 2-17.
- Carneiro, B. A., and El-Deiry, W. S. (2020). Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 1-23.

- Chen, W., Zou, P., Zhao, Z., Chen, X., Fan, X., Vinothkumar, R., and Ji, J. (2016). Synergistic antitumor activity of rapamycin and EF24 via increasing ROS for the treatment of gastric cancer. *Redox biology*, 10, 78-89.
- Chen, X., Dai, X., Zou, P., Chen, W., Rajamanickam, V., Feng, C., Zhuge, W., Qiu, C., Ye, Q., Zhang, X., and 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.
- Cheng, Y., Kozubek, A., Ohlsson, L., Sternby, B., and Duan, R. D. (2007). Curcumin decreases acid sphingomyelinase activity in colon cancer Caco-2 cells. *Planta medica*, 73(08), 725-730.
- Cheriyian, V. T., Wang, Y., Muthu, M., Jamal, S., Chen, D., Yang, H., and Sharma, S. (2014). Disulfiram suppresses growth of the malignant pleural mesothelioma cells in part by inducing apoptosis. *PloS one*, 9(4), e93711.
- Cho, H. J., Kim, J. K., Kim, K. D., Yoon, H. K., Cho, M. Y., Park, Y. P., and Song, E. Y. (2006). Upregulation of Bcl-2 is associated with cisplatin-resistance via inhibition of Bax translocation in human bladder cancer cells. *Cancer letters*, 237(1), 56-66.
- Christensen, B. C., Godleski, J. J., Marsit, C. J., Houseman, E. A., Lopez-Fagundo, C. Y., Longacker, J. L., Bueno, R., Sugarbaker, D.J., Nelson, H.H., and Kelsey, K.T. (2008). Asbestos exposure predicts cell cycle control gene promoter methylation in pleural mesothelioma. *Carcinogenesis*, 29(8), 1555-1559.
- Christensen, B. C., Houseman, E. A., Godleski, J. J., Marsit, C. J., Longacker, J. L., Roelofs, C. R., Karagas, M.R., Wrensch, M.R., Yeh, R.F., Nelson, H.H., and Wiemels, J.L. (2009). Epigenetic profiles distinguish pleural mesothelioma from normal pleura and predict lung asbestos burden and clinical outcome. *Cancer research*, 69(1), 227-234.
- Cicala, C., Pompetti, F., and Carbone, M. (1993). SV40 induces mesotheliomas in hamsters. *The American journal of pathology*, 142(5), 1524.
- Dei Cas, M., and Ghidoni, R. (2018). Cancer prevention and therapy with polyphenols: Sphingolipid-mediated mechanisms. *Nutrients*, 10(7), 940.
- Delgermaa, V., Takahashi, K., Park, E. K., Le, G. V., Hara, T., and Sorahan, T. (2011). Global mesothelioma deaths reported to the world health organization between 1994 and 2008. *Bulletin of the World Health Organization*, 89, 716-724.
- Devassy, J. G., Nwachukwu, I. D., and Jones, P. J. (2015). Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. *Nutrition reviews*, 73(3), 155-165.

- Fadeel, B., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (1999). Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony? *Biochemical and biophysical research communications*, 266(3), 699-717.
- Favoni, R. E., and Florio, T. (2011). Combined chemotherapy with cytotoxic and targeted compounds for the management of human malignant pleural mesothelioma. *Trends in pharmacological sciences*, 32(8), 463-479.
- Fraire, A. E., Cooper, S., Greenberg, S. D., Buffler, P., and Langston, C. (1988). Mesothelioma of childhood. *Cancer*, 62(4), 838-847.
- Galateau-Sallé, F. (2006). Classification and Histologic Features of Mesotheliomas. *Pathology of Malignant Mesothelioma*, 68-131.
- Garland, L. L. (2011). Chemotherapy for malignant pleural mesothelioma. *Current treatment options in oncology*, 12(2), 181-188.
- Gradilone, A., Silvestri, I., Scarpa, S., Morrone, S., Gandini, O., Pulcinelli, F. M., and Gazzaniga, P. (2007). Failure of apoptosis and activation on NF κ B by celecoxib and aspirin in lung cancer cell lines. *Oncology reports*, 17(4), 823-828.
- Grozinger, C. M., and Schreiber, S. L. (2002). Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chemistry and biology*, 9(1), 3-16.
- Hamaguchi, N., Hamada, H., Miyoshi, S., Irifune, K., Ito, R., Miyazaki, T., and Higaki, J. (2010). In vitro and in vivo therapeutic efficacy of the PPAR- γ agonist troglitazone in combination with cisplatin against malignant pleural mesothelioma cell growth. *Cancer science*, 101(9), 1955-1964.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- 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.
- Hodgson, J. T., McElvenny, D. M., Darnton, A. J., Price, M. J., and Peto, J. (2005). The expected burden of mesothelioma mortality in Great Britain from 2002 to 2050. *British journal of cancer*, 92(3), 587-593.
- Holliday, R. (1990). DNA methylation and epigenetic inheritance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biological Sciences*, 326(1235), 329-338.

- Internet: Epidemiology and Medical Statistics Unit, Health and Safety Executive. Mesothelioma mortality in Great Britain: estimating the future burden. Web: <http://qix.sagepub.com/cgi/reprint/9/6/859> adresinden 1 Ağustos 2004'de alınmıştır.
- Jaklitsch, M. T., Grondin, S. C., and Sugarbaker, D. J. (2001). Treatment of malignant mesothelioma. *World journal of surgery*, 25(2), 210-217.
- Jane Henley, S., Larson, T. C., Wu, M., Antao, V. C., Lewis, M., Pinheiro, G. A., and Ehemann, C. (2013). Mesothelioma incidence in 50 states and the District of Columbia, United States, 2003–2008. *International journal of occupational and environmental health*, 19(1), 1-10.
- Jones, J. S. P. (2001). The pleura in health and disease. *Lung*, 179(6), 397-413.
- Kasinski, A. L., Du, Y., Thomas, S. L., Zhao, J., Sun, S. Y., Khuri, F. R., Wang, C.Y., Shoji, M., Sun, A., Snyder, J.P., and Liotta, D. (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.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26:239-257.
- Kwak, K. M., Paek, D., Hwang, S. S., and Ju, Y. S. (2017). Estimated future incidence of malignant mesothelioma in South Korea: projection from 2014 to 2033. *PLoS One*, 12(8), e0183404.
- Lee, Y. J., Lee, G. J., Yi, S. S., Heo, S. H., Park, C. R., Nam, H. S., and Lee, S. H. (2016). Cisplatin and resveratrol induce apoptosis and autophagy following oxidative stress in malignant mesothelioma cells. *Food and Chemical Toxicology*, 97, 96-107.
- Liu, F., Gao, S., Yang, Y., Zhao, X., Fan, Y., Ma, W., and Yu, Y. (2018). Antitumor activity of curcumin by modulation of apoptosis and autophagy in human lung cancer A549 cells through inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway. *Oncology reports*, 39(3), 1523-1531.
- Liu, H., Liang, Y., Wang, L., Tian, L., Song, R., Han, T., Pan, S., and Liu, L. (2012). In vivo and in vitro suppression of hepatocellular carcinoma by EF24, a curcumin analog. *PloS one*, 7(10).
- Losert, D., Pratscher, B., Soutschek, J., Geick, A., Vornlocher, H. P., Müller, M., and Wacheck, V. (2007). Bcl-2 downregulation sensitizes nonsmall cell lung cancer cells to cisplatin, but not to docetaxel. *Anti-cancer drugs*, 18(7), 755-761.

- Maiuri, M. C., Criollo, A., Tasdemir, E., Vicencio, J. M., Tajeddine, N., Hickman, J. A., and Kroemer, G. (2007). BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-XL. *Autophagy*, 3(4), 374-376.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., and Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727-747.
- Mery, É., Hommell-Fontaine, J., Capovilla, M., Chevallier, A., Bibeau, F., Croce, S., S., Dartigues, P., Kaci, R., Lang-Averous, G., Laverriere, M.H. and Leroux-Broussier (2014). Peritoneal malignant mesothelioma: review and recent data. In *Annales de pathologie*, 34(1), 26-33.
- Metintaş M. (Editör). (2014) *Malign Plevral Mezotelyoma Türkiye Standartlar Rehberi*. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Akciğer ve Plevra Kanseri Uygulama ve Araştırma Merkezi, 5.
- Metintaş, S., Batırel, H. F., Bayram, H., Yılmaz, Ü., Karadağ, M., Ak, G., and Metintaş, M. (2017). Turkey national mesothelioma surveillance and environmental asbestos exposure control program. *International journal of environmental research and public health*, 14(11), 1293.
- Moore, K. L., Dalley, A. F., and Agur, A. M. (2018). *Clinically oriented anatomy* (eighth edition). New York: Wolters Kluwer, 795.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Mutsaers, S. E. (2002). Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology*, 7(3), 171-191.
- Niedzwiecki, A., Roomi, M. W., Kalinovsky, T. and Rath, M. (2016). Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients*, 8(9), 552.
- O'Brien, M. A., and Kirby, R. (2008). Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. *Journal of veterinary emergency and critical care*, 18(6), 572-585.
- Oddone, E., Bollon, J., Nava, C. R., Bugani, M., Consonni, D., Marinaccio, A. and Barone-Adesi, F. (2020). Predictions of Mortality from Pleural Mesothelioma in Italy After the Ban of Asbestos Use. *International journal of environmental research and public health*, 17(2), 607.

- Onen, H. I., Yilmaz, A., Alp, E., Celik, A., Demiroz, S. M., Konac, E., Kurul, I.C., 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 and experimental toxicology*, 34(2), 117-126.
- Park, E. K., Takahashi, K., Hoshuyama, T., Cheng, T. J., Delgermaa, V., Le, G. V., and Sorahan, T. (2011). Global magnitude of reported and unreported mesothelioma. *Environmental health perspectives*, 119(4), 514-518.
- Park, E. K., Takahashi, K., Jiang, Y., Movahed, M., and Kameda, T. (2012). Elimination of asbestos use and asbestos-related diseases: An unfinished story. *Cancer Science*, 103(10), 1751-1755.
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., and Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), 927-939.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Pfeffer, C. M., and Singh, A. T. (2018). Apoptosis: a target for anticancer therapy. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 448.
- Price, B., and Ware, A. (2009). Time trend of mesothelioma incidence in the United States and projection of future cases: an update based on SEER data for 1973 through 2005. *Critical reviews in toxicology*, 39(7), 576-588.
- Rajasekaran, S. A. (2011). Therapeutic potential of curcumin in gastrointestinal diseases. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, 2(1), 1.
- Ravindran, J., Prasad, S., and Aggarwal, B. B. (2009). Curcumin and cancer cells: how many ways can curry kill tumor cells selectively? *The AAPS journal*, 11(3), 495-510.
- Ribak, J., Lilis, R., Suzuki, Y., Penner, L., and Selikoff, I. J. (1988). Malignant mesothelioma in a cohort of asbestos insulation workers: clinical presentation, diagnosis, and causes of death. *Occupational and Environmental Medicine*, 45(3), 182-187.
- Robinson, B. M. (2012). Malignant pleural mesothelioma: an epidemiological perspective. *Annals of cardiothoracic surgery*, 1(4), 491.
- Robinson, B. W., Musk, A. W., and Lake, R. A. (2005). Malignant mesothelioma. *The Lancet*, 366(9483), 397-408.

- Robledo, R., and Mossman, B. (1999). Cellular and molecular mechanisms of asbestos-induced fibrosis. *Journal of cellular physiology*, 180(2), 158-166.
- Roggli VL, Greenberg SD, Pratt PC (editors). (1992). *Pathology of Asbestos Associated Diseases*, Boston: Little Brown, 109-164.
- Rosenzweig, K. E. (2017). Malignant pleural mesothelioma: adjuvant therapy with radiation therapy. *Annals of translational medicine*, 5(11).
- 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. *Experimental and Clinical Sciences Journal*, 15, 246-255.
- Sahn, S. A. (1988). The Pleura1. *American Review of Respiratory Disease*, 138, 184-234.
- Santiago-Vázquez, Y., Das, U., Varela-Ramirez, A., T Baca, S., Ayala-Marin, Y., Lema, C., Das, S., Baryan, A., R Dimmock, J., and J Aguilera, R. (2016). Tumor-selective cytotoxicity of a novel pentadiene analogue on human leukemia/lymphoma cells. *Clinical cancer drugs*, 3(2), 138-146.
- Soeberg, M. J., Takahashi, K., Movahed, M., Jiang, Y., and Van Zandwijk, N. (2013, November). Global patterns in the incidence of malignant mesothelioma, 1988-2002, using data published by the international Agency for Research on Cancer (IARC). In *Journal Of Thoracic Oncology* 8, 938-938.
- Stauffer, J. L., Potts, D. E., and Sahn, S. A. (1978). Cellular content of the normal rabbit pleural space. *Acta cytologica*, 22(6), 570-574.
- Subramaniam, D., May, R., Sureban, S. M., Lee, K. B., George, R., Kuppusamy, P Ramanujam, R.P., Hideg, K., Dieckgraefe, B.K., Houchen, C.W., and Anant, S. (2008). Diphenyl difluoroketone: a curcumin derivative with potent in vivo anticancer activity. *Cancer research*, 68(6), 1962-1969.
- Sun, A., Lu, Y. J., Hu, H., Shoji, M., Liotta, D. C., and Snyder, J. P. (2009). Curcumin analog cytotoxicity against breast cancer cells: exploitation of a redox-dependent mechanism. *Bioorganic and medicinal chemistry letters*, 19(23), 6627-6631.
- Surh, Y. J., and Chun, K. S. (2007). Cancer chemopreventive effects of curcumin. In *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, 149-172.
- Şenyiğit, A., Babayiğit, C., Gökirmak, M., Topçu, F., Asan, E., Coşkunsel, M R. Işık, and M. Ertem. (2000). Incidence of malignant pleural mesothelioma due to

- environmental asbestos fiber exposure in the southeast of Turkey. *Respiration*, 67(6), 610-614.
- Tan, C. P., Lu, Y. Y., Ji, L. N. and Mao, Z. W. (2014). Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds. *Metallomics*, 6(5), 978-995.
- Tischoff, I., Neid, M., Neumann, V. and Tannapfel, A. (2011). Pathohistological diagnosis and differential diagnosis. In *Malignant Mesothelioma*, 57-78.
- Travis, W. D., Brambilla, E., Burke, A., Marx, A. and Nicholson, A. G. (Editors.). (2015). *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart* (fourth edition). Lyon: International Agency for Research on Cancer, 153.
- Travis, W. D., Brambilla, E., Muller-Hermelink, H. K. and Harris, C. C. (2004). World Health Organization classification of tumours. *Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*, 10, 179-84.
- Van der Bij, S., Koffijberg, H., Burgers, J. A., Baas, P., Van de Vijver, M. J., De Mol, B. A. J. M. and Moons, K. G. M. (2012). Prognosis and prognostic factors of patients with mesothelioma: a population-based study. *British journal of cancer*, 107(1), 161-164.
- Vandermeers, F., Hubert, P., Delvenne, P., Mascaux, C., Grigoriu, B., Burny, A. and Willems, L. (2009). Valproate, in combination with pemetrexed and cisplatin, provides additional efficacy to the treatment of malignant mesothelioma. *Clinical cancer research*, 15(8), 2818-2828.
- Vandermeers, F., Sriramareddy, S. N., Costa, C., Hubaux, R., Cosse, J. P., and Willems, L. (2013). The role of epigenetics in malignant pleural mesothelioma. *Lung cancer*, 81(3), 311-318.
- Vogelzang, N. J., Rusthoven, J. J., Symanowski, J., Denham, C., Kaukel, E., Ruffie, P., Gatzemeier, U., Boyer, M., Emri, S., Manegold, C. and Niyikiza, C. (2003). Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *Journal of clinical oncology*, 21(14), 2636-2644.
- Wagner, J. C., Sleggs, C. A., and Marchand, P. (1960). Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the north western cape province. *Occupational and Environmental Medicine*, 17(4), 260-271.
- Wang, N. S. (1974). The regional difference of pleural mesothelial cells in rabbits. *American Review of Respiratory Disease*, 110(5), 623-633

- Wang, N. S. (1998). Anatomy of the pleura. *Clinics in Chest Medicine*, 19, 229-240.
- Wang, Y., Rishi, A. K., Wu, W., Polin, L., Sharma, S., Levi, E., and Wali, A. (2011). Curcumin suppresses growth of mesothelioma cells in vitro and in vivo, in part, by stimulating apoptosis. *Molecular and cellular biochemistry*, 357(1-2), 83.
- Wong, R. S. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 30(1), 87.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. R., and Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. In *International review of cytology* (Vol. 68, pp. 251-306). Academic Press.
- Xu, A., Zhou, H., Yu, D. Z., and Hei, T. K. (2002). Mechanisms of the genotoxicity of crocidolite asbestos in mammalian cells: implication from mutation patterns induced by reactive oxygen species. *Environmental Health Perspectives*, 110(10), 1003-1008.
- Yalcin, N. G., Choong, C. K., and Eizenberg, N. (2013). Anatomy and pathophysiology of the pleura and pleural space. *Thoracic surgery clinics*, 23(1), 1-10.
- Yang, C. H., Yue, J., Sims, M., and Pfeffer, L. M. (2013). The curcumin analog EF24 targets NF- κ B and miRNA-21, and has potent anticancer activity in vitro and in vivo. *PloS one*, 8(8), e71130.
- Yang, H., Wang, Y., Cheryan, V. T., Wu, W., Cui, C. Q., Polin, L. A., and Wali, A. (2012). Withaferin A inhibits the proteasome activity in mesothelioma in vitro and in vivo. *PloS one*, 7(8), e41214.
- Yang, S. J., Lee, S. A., Park, M. G., Kim, J. S., Yu, S. K., Kim, C. S., Kim, S.G., Oh, J.S., Kim, H.J., and Chun, H. S. (2014). Induction of apoptosis by diphenyldifluoroketone in osteogenic sarcoma cells is associated with activation of caspases. *Oncology reports*, 31(5), 2286-2292.
- Yazicioglu, S., Ilcayto, R., Balci, K., Sayli, B. S., and Yorulmaz, B. (1980). Pleural calcification, pleural mesotheliomas, and bronchial cancers caused by tremolite dust. *Thorax*, 35(8), 564-569.
- Yip, K. W., and Reed, J. C. (2008). Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene*, 27(50), 6398-6406.
- Yu, W., Tao, Z., Hanyan, S., and Bei, H. (2012). Study on the relationship between autophagy and apoptosis in A549 cells induced by curcumin analogue EF24. *Chin J Cell Biol*, 6, 590-596.

- Zhang, D., Wang, Y., Dong, L., Huang, Y., Yuan, J., Ben, W., Yang, Y., Ning, N., Lu, M., and Guan, Y. (2013). Therapeutic role of EF24 targeting glucose transporter 1-mediated metabolism and metastasis in ovarian cancer cells. *Cancer science*, 104(12), 1690-1696.
- Zhou, Y., Zheng, J., Li, Y., Xu, D. P., Li, S., Chen, Y. M., and Li, H. B. (2016). Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients*, 8(8), 515.
- Zou, P., Xia, Y., Chen, W., Chen, X., Ying, S., Feng, Z., and Yang, S. (2016). EF24 induces ROS-mediated apoptosis via targeting thioredoxin reductase 1 in gastric cancer cells. *Oncotarget*, 7(14), 18050.

EKLER

EK-1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı

Evrak Tarih ve Sayısı: 02/08/2018-E.109334



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
 Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Hacer İlke ÖNEN, Atiye Seda YAR SAĞLAM, İlknur PORSUK DORU'dan oluşan, G.Ü.ET-18.056 kod numaralı ve "EF-24 ve Sisplatinin Apoptotik Etkilerinin Fare Malign Plevral Mezotelyoma Hücrelerinde in vitro ve in vivo Olarak Belirlenmesi" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-18.056 and entitled "Determination of apoptotic effect of EF-24 and cisplatin on murine malignant pleural mesothelioma cells in vitro and in vivo" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Fare BALB/c
 Hayvan Sayısı : 72

Ek:1 Liste



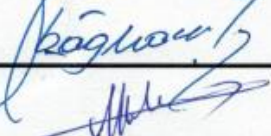
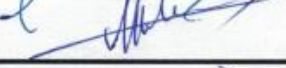
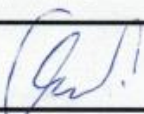
Ankara
 Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
 e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Esengül BOŞNAK
 Genel Evrak Sorumlusu
 Telefon No:03122022666

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kararı

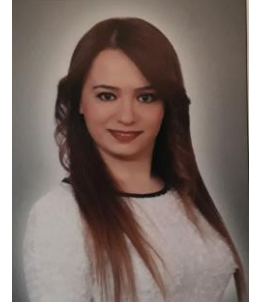
GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ
--

TOPLANTI TARİHİ :27/072018		TOPLANTI SAYISI : 07	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)			
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.Tuncay PEKER			
Prof.Dr.Fatma AKAR			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK			
Doç.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ			
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL		KATILMADI	
Doç.Dr.Emre BARIŞ			
Doç.Dr.İpek SÜNTAR			
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR		KATILMADI	
Vet.Hek.Burcu AVCI		KATILMADI	
Osman İÇ			

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : PORSUK DORU, İlknur
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 06/10/1988, Diyarbakır
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0553 162 51 74
 e-mail : ilkbio88@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	Devam Ediyor
Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2011
Lisans	Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Namık Kemal Lisesi	2005

İş Deneyimi, Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2016- devam ediyor	Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi
2014-2016	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi
2013-2014	Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. Uyar, F., **Porsuk, I.**, Kizil, G., and Yilmaz, E. I. (2011). Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15. *EurAsian Journal of BioSciences*, 5(1), 1-9.
2. **Porsuk, I.**, ÖZAKIN, S., BALI, B., and Yilmaz, E. I. (2013). A cellulase-free, thermoactive, and alkali xylanase production by terrestrial *Streptomyces* sp. CA24. *Turkish Journal of Biology*, 37(3), 370-375.
3. Özakin, S., **Porsuk, İ.**, Acer, İ., Bali, B., and İnce, E. (2014). Diversity of non-ribosomal peptide synthetases genes in terrestrial streptomycetes. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 29(3), 144-153.
4. Öncü-Öner, T., Cingöz, S., Ünalp, A., **Porsuk-Doru, İ.**, Ağilkaya, S., Güteryüz, H., and Hız-Kurul, S. (2018). GPR56 homozygous nonsense mutation p. R271* associated with phenotypic variability in bilateral frontoparietal polymicrogyria. *The Turkish journal of pediatrics*, 60(3), 229-237.
5. **Doru, İ.P.**, Sağlam, A.S.Y., Önen, H.İ. (2019). Emerging Potential Agents against Malignant Pleural Mesothelioma: A Review of in vitro Studies. *Gazi Medical Journal*. 30. 231-236.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

