

**AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDA  
CETUXİMAB, CİSPLATİN VE MELATONİN  
UYGULAMALARININ P53 GENİ VE APOPTOZ  
AKTİVASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Cihan GÜR**

**Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı**

**Yrd. Doç. Dr. Seçkin ÖZKANLAR**

**Yüksek Lisans Tezi - 2014**

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

**AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDA CETUXİMAB,  
CİSPLATİN VE MELATONİN UYGULAMALARININ P53  
GENİ VE APOPTOZ AKTİVASYONU ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Cihan GÜR**

**Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Yrd. Doç. Dr. Seçkin ÖZKANLAR**

**ERZURUM  
2014**

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**AKCİĞER KANSERİ HÜCRE HATTINDA CETUXİMAB,  
CİSPLATİN VE MELATONİN UYGULAMALARININ P53 GENİ  
VE APOPTOZ AKTİVASYONU ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Cihan GÜR**

**Tez Savunma Tarihi** : 22.01.2014

**Tez Danışmanı** : Yrd. Doç. Dr. Seçkin ÖZKANLAR

**Jüri Üyesi** : Doç. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR

**Jüri Üyesi** : Yrd. Doç. Dr. Adem KARA

**Onay**

Bu çalışma yukarıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

  
**Prof. Dr. Yavuz Selim SAĞLAM**  
Enstitü Müdürü

**Yüksek Lisans Tezi  
ERZURUM - 2014**

# İÇİNDEKİLER

|                                                                              |             |
|------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>ÖZET .....</b>                                                            | <b>IV</b>   |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                         | <b>V</b>    |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....</b>                                  | <b>VI</b>   |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>                                                  | <b>VIII</b> |
| <b>TABLolar DİZİNİ .....</b>                                                 | <b>IX</b>   |
| <b>1. GİRİŞ .....</b>                                                        | <b>1</b>    |
| <b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>                                                | <b>3</b>    |
| 2.1. Kanser .....                                                            | 3           |
| 2.1.1. Kanser Oluşumu ve Gelişimi .....                                      | 4           |
| 2.1.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri .....                                 | 5           |
| 2.1.3. Kanser Oluşumunda Etkili Olan Faktörler .....                         | 6           |
| 2.2. Akciğer Kanseri .....                                                   | 14          |
| 2.2.1. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması .....                            | 15          |
| 2.2.2. Akciğer Kanserinin Evreleri .....                                     | 16          |
| 2.2.3. Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılan Antikonserojenik Maddeler..... | 17          |
| 2.3. Kanser Tedavisinde Antioksidanların Rolü .....                          | 19          |
| 2.3.1. Melatonin .....                                                       | 20          |
| 2.3.2. Melatonin Hormonunun Biyosentezi ve Salgılanması .....                | 21          |
| 2.3.3. Melatoninin Apoptotik ve Anti-kanserojenik Etkisi.....                | 22          |
| <b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>                                             | <b>24</b>   |
| 3.1. Hücre Kültürü .....                                                     | 24          |
| 3.1.1. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı .....                             | 24          |
| 3.1.2. Hücre Kültürü İnkübasyon Koşulları.....                               | 24          |

|                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması (Subculturing) .....                                                    | 24        |
| 3.1.4. Hücrelerin Dondurulma ve Saklanma İşlemleri .....                                               | 25        |
| 3.1.5. Hücre Sayılarının Hesaplanması.....                                                             | 26        |
| 3.2. Deney Gruplarında Kullanılan Maddelerin Doz Ayarlamaları.....                                     | 26        |
| 3.2. Hücre Sitotoksosite Analizi .....                                                                 | 27        |
| 3.3. İmmünotokimyasal (ICC) Boyama Metodu.....                                                         | 28        |
| 3.4. İmmünotokimyasal Değerlendirme.....                                                               | 30        |
| 3.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR) Analizleri.....                        | 31        |
| 3.5.1. RNA İzolasyon Safhası.....                                                                      | 31        |
| 3.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentez Safhası .....                                                    | 31        |
| 3.5.3. Real Time PCR Cihazına Yükleme Aşaması .....                                                    | 31        |
| 3.5.4. RT-PCR (Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu) P53 ve MDM2 Gen Ekspresyonlarının Ölçülmesi..... | 33        |
| 3.6. İstatistiksel Analiz.....                                                                         | 33        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>                                                                                | <b>34</b> |
| 4.1. Sitotoksosite (MTT) Analizi Sonuçları .....                                                       | 34        |
| 4.2. İmmünotokimyasal (ICC) Bax Boyaması Sonuçları.....                                                | 38        |
| 4.3. RT-PCR Analizi Sonuçları .....                                                                    | 41        |
| <b>5. TARTIŞMA.....</b>                                                                                | <b>43</b> |
| <b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>                                                                       | <b>49</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                                                 | <b>51</b> |
| <b>EKLER .....</b>                                                                                     | <b>67</b> |
| <b>1. ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                                               | <b>67</b> |
| <b>2. ETİK KURUL KARARI.....</b>                                                                       | <b>68</b> |

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve bu tezi hazırlamamda bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen ve üzerimde büyük bir emeği bulunan değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Seçkin ÖZKANLAR'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmalarımda büyük yardımlarını ve emeğini aldığım Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Adem KARA'ya, değerli katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Eda DİYARBAKIR'a eğitimim boyunca her konuda yardımlarını gördüğüm hocalarım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR'e, Doç. Dr. Mesut B. HALICI'ya, Yrd. Doç. Dr. Özgür KAYNAR'a, Yrd. Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM'a, Arş. Gör. H. Serkan EROL'a, Arş. Gör. Mustafa İLERİTÜRK'e ve yüksek lisans arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ve desteklerini benden esirgemeyen Cansu GÜRCÜ'ye ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Cihan GÜR

## ÖZET

### **Akciğer Kanseri Hücre Hattında Cetuximab, Cisplatin ve Melatonin Uygulamalarının P53 Geni ve Apoptoz Aktivasyonu Üzerine Etkilerinin Araştırılması**

**Amaç:** Akciğer kanserinde kemoterapötiklere karşı gelişen dirençten dolayı, akciğer kanseri nedenli ölüm oranları her geçen yıl biraz daha yükselmektedir. Kemoterapötiklerden kaynaklanan toksik etkiyi elimine edebilmek için son yıllarda antioksidan maddelerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu çalışmada anti-büyüme faktörü ajanı olan cetuximabın ve kanser tedavisinde sıklıkla başvurulmuş cisplatinin, melatonin ile kombine kullanımlarında kanser hücreleri üzerinde oluşturdukları apoptotik ve sitotoksik etkilerinin araştırılması amaçlandı.

**Materyal ve Metot:** Bu çalışmada, akciğer kanseri hücre hattına (A549) kontrol grubu ile anti-kanserojenik maddelerin kombinasyon gruplarına (melatonin, cisplatin, cetuximab, cisplatin-ceuximab, melatonin-cisplatin-cetuximab, melatonin-cisplatin, melatonin-cetuximab) etken dozların uygulanmasının ardından MTT analizi yapıldı. Daha sonra sırasıyla, ICC boyama metodu ile pro-apoptotik Bax immün pozitifliği ve RT-PCR metodu ile de P53 ve MDM2 gen ekspresyon seviyeleri belirlendi.

**Bulgular:** Çalışma bulguları sonucunda melatoninin hücrede önemli bir sitotoksik etkiye sahip olmadığı belirlenirken, özellikle cisplatin ve cetuximab uygulanan gruplarda sitotoksik etkinin olduğu görüldü. RT-PCR analizi sonuçlarında, melatonin, cisplatin ve melatonin-cisplatin uygulanan gruplarda yüksek bir P53 gen ekspresyonu belirlendi. Benzer olarak cisplatin, melatonin-cetuximab ve melatonin-cisplatin-cetuximab uygulamaları yapılan gruplarda MDM2 ekspresyon düşüşü olduğu belirlendi. Pro-apoptotik Bax immün boyamasında ise cisplatin, cetuximab, melatonin-cetuximab ve melatonin-cisplatin uygulamalarının apoptotik aktivitede artışa sebep olduğu belirlendi.

**Sonuç:** Çalışma sonuçları; melatonin, cisplatin ve cetuximab ile bunların kombine uygulamalarının P53 ve MDM2 gen ekspresyonlarındaki apoptotik aktiviteyi arttıracaklarını göstermektedir. Melatonin, cisplatin ve cetuximab gruplarının etkileri göz önüne alındığında melatoninin kanser tedavisinde kullanılabilecek bir ajan olabileceği sonucuna varılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Akciğer Kanseri, Cetuximab, Cisplatin, Melatonin, P53

## ABSTRACT

### **Investigation of the Effects of Cetuximab, Cisplatin and Melatonin Administration on P53 Gene and Apoptosis Activations in Lung Cancer Cell Lines**

**Aim:** Because of the development of resistance against chemotherapeutics in lung cancer, the mortality rate caused by lung cancer is increasing in every year. Use of antioxidant compounds has been become widespread to prevent the toxic effect due to chemotherapeutics. In this study, the apoptotic and cytotoxic effects of cetuximab, as an anti-growth factor, has been aimed to investigate along with the combination of cisplatin and melatonin on the cancer cells.

**Material and method:** In this study, MTT analysis was performed to the lung cancer lines (A549) in control group and combination groups of anti-cancerogenic compounds (melatonin, cisplatin, cetuximab, cisplatin-cetuximab, melatonin-cisplatin-cetuximab, melatonin-cisplatin, melatonin-cetuximab) after the administration. Afterwards, pro-apoptotic Bax immune positivity by ICC and levels of P53 and MDM2 gene expression were determined in an order.

**Results:** It was observed that melatonin had no significant cytotoxic effect on the cell while cisplatin and cetuximab groups had cytotoxic effects based on the results of study. A high P53 gene expression was detected in melatonin, cisplatin and melatonin-cisplatin administration groups by the results of RT-PCR analysis. Similarly, MDM2 expression level was found to be low in cisplatin, melatonin-cetuximab and melatonin-cisplatin-cetuximab administrated groups. Cisplatin, cetuximab, melatonin-cetuximab and melatonin-cisplatin administrations had the effect of increasing apoptotic activity in proapoptotic Bax immune staining.

**Conclusion:** As a result, administrations of melatonin, cisplatin and cetuximab and the combination of these compounds may increase the apoptotic activity of P53 and MDM2 gene expressions. When the effects of melatonin, cisplatin and cetuximab groups have been evaluated, it can be concluded that the melatonin compound be used in the treatment of cancer.

**Key Words:** Cetuximab, Cisplatin, Lung Cancer, Melatonin, P53

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                                   |                                                                     |
|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| <b>ALT</b>                        | : Alanin aminotransferaz                                            |
| <b>AST</b>                        | : Aspartat aminotransferaz                                          |
| <b>ATP</b>                        | : Adenozin trifosfat                                                |
| <b>BSA</b>                        | : Sığır serum albümini                                              |
| <b>CAT</b>                        | : Katalaz                                                           |
| <b>CDK</b>                        | : Siklin bağımlı kinaz                                              |
| <b>cDNA</b>                       | : Komplementer deoksiribonükleik asit                               |
| <b>CO<sub>2</sub></b>             | : Karbon dioksit                                                    |
| <b>DMEM</b>                       | : Dulbecco's modified Eagle's medium                                |
| <b>DMSO</b>                       | : Dimetil sülfoksit                                                 |
| <b>DNA</b>                        | : Deoksiribonükleik asit                                            |
| <b>DSÖ</b>                        | : Dünya sağlık örgütü                                               |
| <b>EGF</b>                        | : Epidermal büyüme faktörü                                          |
| <b>EGFR</b>                       | : Epidermal büyüme faktör reseptörü                                 |
| <b>GSH-Px</b>                     | : Glutatyon peroksidaz                                              |
| <b>GST</b>                        | : Glutatyon-s-transferaz                                            |
| <b>HRP</b>                        | : Horseradish peroksidaz                                            |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | : Hidrojen peroksit                                                 |
| <b>IC<sub>50</sub></b>            | : Baskılayıcı konsatrasyon 50                                       |
| <b>ICC</b>                        | : İmmünohistokimyasal                                               |
| <b>KHAK</b>                       | : Küçük hücreli akciğer kanseri                                     |
| <b>KHDAK</b>                      | : Küçük hücreli dışı akciğer kanseri                                |
| <b>μM</b>                         | : Mikro molar                                                       |
| <b>MTT</b>                        | : 3-(4,5-Dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromid, 1 sarı |

|                                   |                                                                                        |
|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
|                                   | tetrazol                                                                               |
| <b>mRNA</b>                       | : Messenger ribonükleik asit                                                           |
| <b><math>2O_2^{\cdot-}</math></b> | : Süperoksit radikali                                                                  |
| <b><math>\cdot OH</math></b>      | : Hidroksil radikali                                                                   |
| <b>PARP</b>                       | : Poli adenzin difosfat riboz polimeraz                                                |
| <b>PBS</b>                        | : Fosfat tamponlu solüsyon (Phosphate buffered saline)                                 |
| <b>Pi</b>                         | : İnorganik fosfat                                                                     |
| <b>RNA</b>                        | : Ribonükleik asit                                                                     |
| <b>ROS</b>                        | : Reaktif oksijen türü                                                                 |
| <b>RT-PCR</b>                     | : Gerçek zamanlı - polimeraz zincir reaksiyonu (Real time – polimerase chain reaction) |
| <b>SOD</b>                        | : Süperoksit dismutaz                                                                  |
| <b>TNM</b>                        | : Tümör, nodül, metastaz                                                               |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| <b><u>Şekil No</u></b>                                                                                                                                                                            | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <b>Şekil 2.1.</b> Bcl-2'nin antiapoptotik özelliği gösterilmekte.....                                                                                                                             | 12                     |
| <b>Şekil 2.2.</b> Melatonin salgılanmasının fizyolojisi .....                                                                                                                                     | 22                     |
| <b>Şekil 4.1.</b> Akciğer hücre hattı (A549); melatonin, cisplatin ve cetuximab<br>uygulamaları sonrası 24 ve 48 saat inkübasyonlu hücre hatlarının<br>sitotoksosite (MTT) analizi sonuçları..... | 35                     |
| <b>Şekil 4.2.</b> Tüm gruplara ait 24 saat süreli melatonin, cisplatin ve cetuximab<br>uygulanan A549 hücreleri invert mikroskop görüntüsü .....                                                  | 36                     |
| <b>Şekil 4.3.</b> Tüm gruplara ait 48 saat süreli melatonin, cisplatin ve cetuximab<br>uygulanan A549 hücreleri invert mikroskop görüntüsü .....                                                  | 37                     |
| <b>Şekil 4.4.</b> Tüm gruplara ait 24 saat süreli melatonin, cisplatin ve cetuximab<br>uygulanan Bax immunopozitif A549 hücreleri görüntüsü .....                                                 | 39                     |
| <b>Şekil 4.5.</b> Tüm gruplara ait 48 saat süreli melatonin, cisplatin ve cetuximab<br>uygulanan Bax immunopozitif A549 hücreleri görüntüsü .....                                                 | 40                     |

## TABLÖLER DİZİNİ

| <b><u>Tablo No</u></b>                                                                                                                            | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| <b>Tablo 2.1.</b> Organizmada bulunan antioksidan sistemler .....                                                                                 | 8                      |
| <b>Tablo 2.2.</b> Akciğer Kanseriinde Malign Tümörlerin Sınıflandırılması –DSÖ 1999 .....                                                         | 15                     |
| <b>Tablo 4.1.</b> Melatonin, cisplatin ve cetuximab uygulamaları sonrası 24 ve 48 saat<br>inkübasyonlu gruplara ait sitotoksisite sonuçları ..... | 35                     |
| <b>Tablo 4.2.</b> İmmünositokimyasal Bax pozitif hücrelerin Stereolojik Optic fractinator<br>metoduyla hesaplanması .....                         | 38                     |
| <b>Tablo 4.3.</b> Tüm gruplara ait kuantitatif RT-PCR P53 ve MDM2 geni internal kontrol<br>(Beta-Aktin) oranı ile ekspresyonu düzeyleri .....     | 42                     |

# 1. GİRİŞ

Akciğerler vücudumuzun oksijen gereksinimini sağlayan göğüs kafesi içerisinde bulunan solunumdan sorumlu organımızdır. Akciğer kanseri, yapısal olarak normal akciğer dokusuna ait hücrelerin bazı nedenlerden dolayı kontrol dışı çoğalmasının bir sonucu olarak oluşan hastalıktır.<sup>1</sup>

Kanser ve kanser nedenli ölümlerin her geçen gün artış göstermesi günümüz dünyasının en önemli problemlerinden biri olarak karşımıza çıkmaktadır.<sup>2</sup> Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2008 yılı verilerine göre ölümlerin yaklaşık olarak dörtte birinin kanser nedenli olduğu bildirilmektedir.<sup>3</sup> Türkiye'de ise kanserin sebep olduğu ölüm oranı kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sırayı almaktadır.<sup>4</sup> Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın yapmış oldukları tahminlere göre 2030 yılında 27 milyon insan kansere yakalanacak, 17 milyon insan ise aynı yıl kanser nedeniyle hayatlarını kaybedecektir.<sup>5</sup>

Diğer kanser tiplerinde olduğu gibi akciğer kanserinde de birinci sırayı sigara içimi almaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde yapılan bir çalışmada akciğer kanserinden ölen erkeklerin %90'ının kadınların ise %75-80'inin sigara içtiği tespit edilmiştir. Geriye kalan % 20'lik kısımda ise akciğer kanserinden ölümlerin tek nedeninin sadece sigara olmadığı bunun yanında çevre kirliliğine ve kanserojen maddelere mesleki olarak maruz kalmanın da olduğu gösterilmiştir.<sup>6,7</sup>

Geçmiş yıllarla kıyaslandığında günümüzde kanser hastalarının hayatta kalma oranları teknolojinin gelişmesiyle birlikte %60'lara kadar yükselmiş olmasına<sup>8</sup> rağmen dünyada her yıl bir buçuk milyon kadar insan kansere yakalanmaktadır.<sup>3</sup>

Kansere yakalanma oranının ve kanserden ölüm oranının artması sebebiyle bu hastalıkla mücadele etmek ve halkı bilinçlendirmek amacıyla birçok sosyal sorumluluk projeleri yapılmaktadır. Günümüzün en önemli sağlık sorunu olarak görülen kanserden

korunmak, hastalığın seyrini düzeltmek veya bu hastalığa yakalanan insanların yaşam standartlarını düzeltmek amacıyla bilim insanları tarafından her yıl binlerce çalışma yapılmaktadır. Yapılan bu çalışmada, endotelyal büyüme faktörü (EGF) antagonisti monoklonal bir antikor olan cetuximabın, birçok kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan cisplatinin ve vücutta sentezlenen en güçlü antioksidanlardan biri olan melatoninin kombine kullanımının, p53 gen ekspresyonu ve apoptoz üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kanser

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalarak, bu hücrelerin meydana getirdiği dokuların işlevlerini yitirdiği ve dünya genelinde kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan son derece ölümcül bir hastalıktır.<sup>8,9</sup>

M.Ö. 400'lü yıllarda yaşayan dönemin ünlü hekimleri, bazı insanların vücutlarında kırmızı renkte, sıcak ve ağırlı karaktere sahip şişlikler fark ettiler ve hastalarda bu belirtilerle beraber yüksek ateşin de bulunması nedeniyle hastalara şüpheyile yaklaştılar.<sup>10, 11</sup> Daha sonra, bunların ilk başta tıpkı vücudun yağ tabakası gibi yumuşak olduğu sonradan irine dönüştüklerini gördüler. Bu yapılar zararsız olmasına rağmen sonradan fark edilen tamamen farklı bir karakteristiğe sahip, yavaş yavaş büyüyen malign bir tipini gördüler. Hipokrat (M.Ö. 460-377) bu yapılara ilk kez 'Carcinoma' demiştir. M.S. II. yüzyılda ise Galen bu yapıların yengece benzemesinden dolayı 'kanser' adını vermiştir.<sup>10</sup>

Eski dönemlerde kanser tedavisinde ülser tedavisinde kullanılan yöntemler denenmiştir. Bundan dolayı hastalara bakır, kurşun, sülfür ve arsenik gibi metalik tuzlar uygulanmıştır. Daha sonralar da ise dağlama ve bıçakla kesip çıkarma yöntemleri denenmesine rağmen tedavide başarılı olunamamıştır.<sup>10</sup> Geçmişten günümüze kadar bilim ve teknolojinin ilerlemesi ve kemoterapötiklerin kombine kullanımıyla çok büyük ilerlemeler gösterilmesine rağmen hala Hipokrat'ın tavsiye ettiği yöntemler kanser tedavisinin temeli olarak kullanılmaktadır.<sup>8, 10</sup>

Kanser tedavisinde temel olarak üç teknik kullanılmaktadır; kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi. Cerrahi yöntem ile tümör dokusu kesilerek çıkarılmaktadır. Kemoterapi ve radyoterapi ise kanser hücrelerini öldürmeye yönelik olarak kullanılmaktadır. Kemoterapötikler sitotoksik etkileri ile kanser hücrelerinin

çoğalmasını önlerler. Ancak bu ilaçlara karşı tümör hücrelerinin geliştirdiği direnç, kanser tedavisinde karşılaşılan en büyük problemlerden biri olmaktadır.<sup>8</sup>

Kanser, hücrelerin mekanizmalarında gelişen moleküler bozukluklardan meydana gelmektedir. Bu yüzden kanser çalışmalarında hücreler yıllardır moleküler düzeyde çalışılmaktadır. Bu normal hücrelerin mekanizmalarının işleyişini aydınlatmada büyük katkılar sağlamıştır. Örneğin, sinyal iletim yollarında, hücre siklusunda ve apoptozda yer alan proteinler ve bunların görevleri, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde işleyen mekanizmaları incelenirken aydınlanmıştır.<sup>12</sup>

### **2.1.1. Kanser Oluşumu ve Gelişimi**

Karsinogenez üç basamaktan oluşmaktadır;<sup>13</sup>

- İnisiyasyon (Başlangıç)
- Promosyon (Artma)
- Progresyon (İlerleme)

Bu aşamaların sonunda çoğalma, hayatta kalma, invazyon ve metastaz yapma yetenekleri son derece artmış olan hücreler diğerleri arasından seçilerek ayrılmış olur.<sup>12</sup>

Başlangıçta, başlatıcı etken tek bir hücrede DNA'yı mutasyona uğratarak, hücrenin anormal şekilde çoğalmasını tetiklemektedir.<sup>12, 13</sup> Burada oluşan mutasyon dönüşümsüzdür.<sup>13</sup>

Daha sonra proliferasyonu sağlayan promotör etkenler devreye girerek DNA üzerinde dönüşümlü mutasyonlara neden olurlar. DNA üzerinde oluşan değişimler epigenetik değişimlerdir. Eğer DNA'da radikaller promotör olarak rol alırsa, bu mutasyonlar kalıcı özellikte olurlar.<sup>13</sup> Böylece klon hücrelerden oluşan topluluk hızla büyümeye devam eder.<sup>12</sup>

Promosyon safhasından sonra gelen progresyon, genomik instabilitenin geliştiği safhadır. Burada karyotipik değişimler ve çoğul mutasyonlar vuku bulmaktadır.<sup>13</sup> Bu

değişimleri geçiren hücreler, daha hızlı çoğalma, sağ kalım ve metastaz yapma özellikleri bakımından daha avantajlı hale gelirler ve tamamen malign hale dönüşürler.<sup>12, 13</sup>

Çoğalma hızları iyice artmış olan hücreler nihayetinde bulunduğu bölgenin çevresindeki dokulara yayılmaya başlar. Bunun haricinde kan ve lenf dolaşımına katılarak daha uzak bölgelere de ulaşabilir ve yeni tümör dokuları oluşturabilirler. Bu diğer doku ve organlara yayılma sürecine metastaz adı verilmektedir.<sup>12</sup> Metastazın mekanizmasının nasıl işlediği tam olarak bilinmemektedir.<sup>13</sup>

### **2.1.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri**

- Normal hücreler yoğunluğa bağlı inhibisyonndan etkilenirken, kanser hücreleri etkilenmezler.
- Kanser hücreleri kendi büyüme faktörlerini salgılayabilirler.
- Tutunma yetenekleri normal hücrelerden düşüktür. Bu özellik tümör hücrelerinin metastaz yapma yeteneklerini arttırmaktadır.
- Normal hücreler, hücre-hücre temaslarında hareket ve çoğalma yeteneklerini kaybederlerken kanser hücreleri hareket etmeye ve çoğalmaya devam ederler. Bu şekilde birbirleri üzerine çıkarak çok katmanlı yapılar oluşturabilirler.
- Kanser hücreleri salgıladıkları proteazlar sayesinde komşu dokuları parçalayarak içlerine girebilirler. Bu şekilde metastaz yetenekleri artmış olur.
- Kanser hücreleri yeteri kadar besin ve oksijeni karşılayamadıklarında yeni kapiller oluşturacak olan büyüme faktörleri salgırlar. Bu özellik yine metastaz yapmada önemli bir faktördür.
- Normal hücrelerde bulunan farklılaşma yeteneği büyümenin inhibisyonu için önemli faktörlerden biridir. Kanser hücrelerinde farklılaşma özelliği bulunmadığından dolayı büyüme sürekli olarak devam etmektedir.

- Kanser hücrelerinin büyük bir çoğunluğunda apoptoz görülmemektedir.<sup>12-14</sup>

### **2.1.3. Kanser Oluşumunda Etkili Olan Faktörler**

Kanser oluşumunda, çevresel ve genetik değişimler rol oynamaktadır. Onkogenlerde ve tümör baskılayıcı genlerde oluşan genetik mutasyonlar, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi hücrelerin temel fonksiyonlarında anomalilikler meydana getirmektedir. Böylece tümör hücreleri metastaz yapma özelliği kazanarak çevre dokuları istila ederler.<sup>9</sup>

#### **2.1.3.1. Kanser Oluşumunda Karsinojenlerin Rolü**

Kansere yol açan maddelere karsinojen adı verilmektedir.<sup>12, 13</sup> Kanser oluşumu kompleks bir olay olduğundan dolayı, tek bir etkenin kanser oluşturduğunu söylemek çok doğru olmamaktadır.<sup>12</sup> Yine de bir genelleme yapılacak olursa karsinojenler; kimyasal, fiziksel ve viral olmak üzere üç grupta toplanabilirler.<sup>12, 13</sup> Karsinojenleri kısaca açıklayacak olursak;

**Kimyasal Karsinojenler;** Kimyasal maddelerin karsinojenik etkileri ilk defa skrotum kanserinde baca temizleyicilerin rol oynadığı anlaşıldıktan sonra belirlenmiştir.<sup>13</sup> Kimyasal maddelerin çoğu karsinojenik etkiye sahiptir.<sup>13, 15</sup> Bu maddeler karsinojen özelliklerini DNA üzerinde gerçekleştirdikleri mutasyonlarla göstermektedirler.<sup>12</sup> Kimyasal karsinojenlere örnek olarak kurum ve katrandaki polisiklik aromatik hidrokarbonlar verilebilir.<sup>13</sup>

**Fiziksel Karsinojenler;** Ultraviyole, x ve  $\gamma$  ışınları son derece karsinojen etkiye sahiptirler.<sup>12, 13, 15</sup> Fiziksel karsinojenlerin en büyük örneğini 2. Dünya Savaşında Hiroşima'ya atılan atom bombasının radyoaktif etkilerinin günümüzde birçok kansere neden olması gösterilebilir.<sup>13</sup> Fiziksel karsinojenlerin de tümör oluşturma yetenekleri DNA'da meydana getirdikleri mutasyonlardan gelmektedir. DNA üzerinde doğrudan

etkilerinin yanı sıra dokularda serbest radikallerin oluşmasıyla da dolaylı yoldan tümör oluşumuna neden olabilmektedir.<sup>12, 13, 15</sup>

**Viral Karsinojenler;** Kanser oluşturan genlere onkogen ismi verilmektedir ve kanser oluşumunda en büyük role sahip olan faktörlerden biridir.<sup>15</sup> Onkogenlere ilk kez virüslerde rastlanılmıştır.<sup>13</sup> Virüslerin kanser oluşumunda %15’lik bir etkiye sahip olduğu bildirilmektedir.<sup>15</sup> Kimyasal ve fiziksel karsinojenlerin aksine virüsler DNA üzerinde direkt olarak mutasyonla değil de hücre DNA’sına kendi genlerini aktararak kansere neden olmaktadır.<sup>15</sup>

Karsinojenler, kanser oluşumunda hücre içi aktif gen bölgelerini hedef alarak DNA mutasyonu aracılı kanser oluşumunu tetiklemektedir.<sup>15</sup> Ancak bazı karsinojenler ise hücre proliferasyonunu uyararak kanserojen etkilerini gösterirler. Bu tür etkenlere tümör kamçılayıcılar adı verilmektedir. Tümör kamçılayıcıların en iyi örneğine, forbol esterlerinin protein kinaz C’yi aktifleştirerek hücre bölünmesini indüklemesi verilebilir.<sup>12</sup>

### **2.1.3.2. Kanser Oluşumunda Serbest Radikallerin Rolü**

Son yıllarda bilim adamları serbest radikaller ile karsinogenez arasındaki ilişkiye büyük önem vermektedir. Serbest radikallerin hücre için spesifik rolleri bulunmasına rağmen bazı durumlarda, komşu hücreler için son derece toksik olabilmektedir. Bu toksisite farklı reaktif türlere dönüşmesiyle gerçekleşmektedir.<sup>16, 17</sup>

Bir veya daha fazla ortaklaşmamış elektrona sahip olan serbest radikaller reaktif özellikte olup kararsız bir yapıya sahiptirler.<sup>18</sup> Kısacası dış orbitallerinde paylaşılmamış bir elektron taşıyan moleküllerdir. Ömürleri çok kısa olan ve kararsız bir yapı gösteren bu tanecikler, etrafındaki moleküllerle etkileşime girerek kararlı hale ulaşmak isterler. Bu şekilde başka moleküllerden kolaylıkla elektron alabilir ya da diğer moleküllere elektron verebilirler. Bu şekilde etrafındaki moleküllerle kolaylıkla elektron alışverişi

yapıp onların yapısını bozan moleküllere ‘Serbest Radikaller’ ya da ‘Reaktif Oksijen Türleri (ROS)’ denir.<sup>19</sup> Oluşan serbest radikaller, oksidatif reaksiyonlar sonucunda protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi vücuttaki önemli moleküllere etki ederek yapılarının bozulmasına yol açarlar.<sup>20</sup>

Aerobik organizmalar yaşamlarını devam ettirmek için oksijene ihtiyaç duyarlar. Oksijen hücrede bir dizi reaksiyondan geçerek suya dönüşür ve bu sayede hücre kendisi için gerekli olan enerjiyi sağlar. Fakat bu süreçte oksijenin %2-3 kadarı suya dönüşmeyip oksijen kaynaklı radikaller oluşturur. Oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi ile süperoksit radikali ( $2O_2^-$ ), iki elektron alarak indirgenmesi ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) oluşur. Ayrıca, üçüncü elektronun eklenmesi ile yüksek derecede reaktif hidroksil radikali ( $\cdot OH$ ) ve dördüncü elektron eklenmesiyle de su ( $H_2O$ ) oluşur.<sup>13</sup>

**Tablo 2.1.** Organizmada bulunan antioksidan sistemler.<sup>13</sup>

| Enzimler             | Suda çözünen radikal tutucuları | Yağda çözünen radikal tutucuları | Metal iyonlarını bağlayan proteinler |
|----------------------|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|
| Süperoksit dismutaz  | Glutasyon                       | E vitamini                       | Ferritin                             |
| Katalaz              | C vitamini                      | B-Karoten                        | Transferrin                          |
| Glutasyon peroksidaz | Ürik asit                       | Bilirubin                        | Haptoglobin                          |
| Glutasyon redüktaz   |                                 | Ubikinol                         | Seruloplazmin                        |
| Glutasyon transferaz |                                 | Flavonoidler                     | Albümin                              |

Normal metabolik işlevlerin bir sonucu olarak oluşan oksidan moleküller, başlıca glikoz oksidasyonu olmak üzere tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sonucunda

meydana gelmektedir. Serbest radikallerin belirli düzeyde olmaları organizmanın yabancı moleküllere ve enfeksiyonlara karşı immün sistemin oluşması açısından önemlidir.<sup>19</sup> Vücutta ROS'un oluşumunu ve neden olabileceği hasarı engellemek için antioksidan savunma sistemi adı verilen bir mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizma radikal oluşumunu sınırlandırma, tetiklenen biyokimyasal reaksiyonların kırılmasını sağlama, oluşan radikalleri ortadan kaldırma ve hasarlı molekülleri tamir etme ve temizleme gibi çeşitli mekanizmalarla etkilerini göstermektedirler. Antioksidan sistemler; enzimleri, suda ve yağda çözünen radikal tutucularını ve metal iyonlarını bağlayan proteinleri kapsamaktadır. Antioksidan sistemler ve ROS arasında bir denge söz konusudur. Fakat bu dengenin bazı nedenlerden dolayı serbest radikallerin oluşumu yönünde bozulması sonucu oksidatif stres meydana gelir. Bu durum engellenemediği takdirde kanser, aterosklerozis, diyabet, Alzheimer gibi birçok hastalığın oluşmasına neden olmaktadır.<sup>13, 21-23</sup> ROS'un etkisi ile DNA yapısında yapısal değişimler meydana gelmektedir. Bu yapısal değişimler pürin ve pirimidin bazlarında parçalanma, zincir kırılmaları ve DNA denatürasyonu gibi olayları kapsamaktadır.<sup>13</sup> Oksidatif hasara bağlı olarak gelişen DNA hasarı eğer onarılamaz ise premutajenik etki gösterir. Mitoz bölünme sırasında hasarlı olan DNA'nın kopyalanması sonucu da tümör hücresi oluşumuyla sonuçlanabilmektedir.<sup>23, 24</sup> ROS protein ve lipid peroksidasyonu ile plazma membranında hücresel aktiviteleri etkileyecek yapısal değişiklikleri oluşturabilmektedir. Bundan dolayı ROS, membrana bağlı protein kinazları, büyüme faktörlerini ve reseptörlerini etkileyerek sinyal iletiminin bozulmasına, onkogen aktivasyonuna ve baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna neden olarak kanser oluşumu üzerine de etki göstermektedir.<sup>23</sup>

ROS hücre membranlarındaki lipitlerle, DNA'daki nükleotidlerle ve proteinlerdeki sülfhidril gruplarıyla reaksiyona girerek dokulara zarar vermektedir.<sup>25</sup>

Mitokondriyal solunum sırasında tekli elektron transferiyle oksijen molekülünden süperoksit üretimi sonucunda ROS oluşur. Bu oluşum hidroksil radikallerinin de kaynağını teşkil etmektedir. Oluşan süperoksit radikali dismutasyona uğrayarak süperoksit dismutaz enzimi tarafından  $H_2O_2$ ' ye dönüştürülür.  $H_2O_2$  hücre içindeki katalaz veya glutatyon peroksidaz tarafından toksik olmayan ürünlere dönüştürülür.<sup>26</sup>

Serbest radikaller organizmada metabolik olaylar sırasında oluştukları gibi, radyasyon, ilaçlar ve zararlı kimyasal maddeler gibi dış etkenler nedeniyle de oluşabilmektedir.<sup>13</sup>

### **2.1.3.3. Kanserojenizde Apoptoz**

Hücre proliferasyonunun dengelenmesi<sup>12</sup>, hasar görerek işlevlerini yitiren hücrelerin organizmadan uzaklaştırılması<sup>27</sup> ve homeostazın dengelenmesi amacıyla hücrelerin programlı bir şekilde ölüm sürecine girmesi olayına 'ayrı düşme' anlamına gelen apoptozis adı verilmektedir.<sup>28</sup> 1971 yılında Currie, Wylie ve Kerr programlı hücre ölümünü ilk kez tanımlamışlar ve bu olaya 'apoptoz' kelimesini vermişlerdir.<sup>29</sup> Gelişim, yaşlanma ve dokulardaki hücrelerin devamını sağlamak amacıyla karşımıza çıkan apoptozis aynı zamanda hastalık ya da zararlı ajanlar nedeniyle hücreler zarar gördüğü zaman immün sistemde olduğu gibi bir savunma mekanizması şeklinde de gerçekleşebilmektedir.<sup>30</sup> Apoptozis sırasında gelen uyarının hemen ardından hücre yapıştığı zeminden ve komşu hücrelerden ayrılarak küçülmeye başlar. Daha sonra DNA fragmentasyonu, kromatin kondenzasyonu oluşmaya ve membranla çevrelenmiş tomurcuklar (vezikül) görülmeye başlar. Bu sürecin sonunda da veziküller, komşu hücreler ya da fagositler tarafından parçalanır. Bu süreçte inflamasyon oluşmaz.<sup>29</sup>

Hücre ölümünün bir başka şekli de nekrozisdir. Nekrozis, apoptozisden tamamen farklı özelliklere sahiptir. Nekrozisde hücre membranları ya da hücredeki metabolik mekanizmalar zarar görür ve hücre membranının seçici geçirgenliği bozularak şişmeye

başlar. Bunun sonucunda da hücre patlayarak hücrenin içinde bulunan maddeler dışarı sızar ve inflamasyon mekanizması uyarılmış olur.<sup>29, 31</sup> Bir hücrenin apoptoza mı yoksa nekroza mı gideceğine uyarının derecesi ve şekli belirlemektedir. Çevrenin ısı, radyasyona maruz kalma, hipoksi ve antikanserojenik ilaçların kullanımı gibi durumların düşük dozlarında apoptoz, yüksek dozlarında ise nekroz gerçekleşmektedir.<sup>32</sup>

Kanser ilişkili apoptozun aktivasyonunda ve inhibisyonunda bir takım genler rol oynamaktadır. Bu genlere proapoptotik genler ve antiapoptotik genler denilmektedir. Proapoptotik genler Bad, Bax, p53, Bid, Bcl-xs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dır. Antiapoptotik genler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'dir. Bir hücrenin apoptoza gideceğini belirlemede o hücrenin içindeki Bcl-2/Bax oranı önemlilik arz etmektedir. Eğer hücrede Bax oranı fazla ise hücre apoptoza gider, fakat tam tersi bir şekilde hücrede Bcl-2 geni fazla ise apoptoz inhibisyona uğrar.<sup>12, 33-35</sup>

Kanser hücrelerinde, tümör süpresör geni olan p53 geni apoptozu kaspaz 3, 7, 8 ve 9 enzimlerini aktive ederek sağlamaktadır. Fakat kanser hücrelerinde P53 geni mutasyona uğramaktadır. Bu mutasyonlar her kanser türü için farklı spektrumda görülür ve p53 geninin inaktivasyonuna neden olur. Bunun sonucu olarak da apoptoz engellenerek malignant gelişime neden olur.<sup>29, 36, 37</sup>



**Şekil 2.1.** Bcl-2'nin antiapoptotik özelliği gösterilmektedir. PARP: poli ADP riboz polimeraz.<sup>38</sup>

#### 2.1.3.4. Kanser ve P53 Geni Arasındaki İlişki

DNA hasar verici ajanlara maruz kaldıktan sonra, hücre siklusundaki geçici değişimler hücre tiplerinin çoğunda gözlenmektedir.<sup>39, 40</sup> Hücre, replikatif tamire ve mitoza başlamadan önce bu değişimler sayesinde hasarı minimuma indirecek şekilde hasarı onarabilme yeteneğine sahip olur.<sup>39</sup> Hücrenin replikatif sentezden önce DNA hasarını onaramaması durumunda mutajenik lezyonlar yayılabilir ve böylece neoplastik dönüşümler için gerekli olan genomik değişimler birikmeye başlar.<sup>33, 40, 41</sup> Bu genomik değişimlerin birikimi hücre döngüsündeki kontrol noktaları sayesinde düşürülebilmektedir.<sup>39</sup>

Tümör süpresör gen ailesi üyesinden biri olan p53 geni 17p 13.1 kromozomunda bulunur. Bu gen pRb üzerinden büyümeyi engelleyerek işlevini yerine getirmektedir. Birçok kanser türünde p53 geninin homozigot kaybı söz konusudur. Rb geni gibi bir mutant p53 allelinin kalıtımla geçmesi sonucunda kişiyi tümör gelişimine duyarlı hale getirir. Hücre radyasyona veya karsinojen etkenlere maruz kaldığı zaman p53 geni p53 proteinini sentezler. P53 proteininin hücre çekirdeğinde birikmesi sonucunda bir siklin bağımlı kinaz (CDK) inhibitörü olan p21 kodlanır ve böylece hücrenin S fazına girmesi

için gerekli olan pRb fosforillenerek hücre G1 fazında bekletilir. Bu durumda hücrenin hasara uğramış DNA'sının uyarılması için zaman kazanılmış olur.<sup>42</sup>

P53 tümör baskılayıcı geni kanser araştırmalarının ön planında bulunmasının sebebi bu genin tümör hücrelerinde yaygın olarak mutasyona uğramasıdır.<sup>36, 43</sup> Bazı DNA hasar modellerinde endojen p53 katılımının hücre siklusu kontrolünde olduğu söylenmektedir.<sup>39, 44</sup>

#### **2.1.3.5. Kanser ve MDM2 Geni Arasındaki İlişki**

MDM2 geni ilk olarak, immortal murin hücre hattının spontan transformasyonundan sorumlu gen olarak tanımlanmıştır.<sup>45</sup> Daha sonra bu genin kromozom üzerinde 12q 13.14 bölgesinde lokalize olduğu görülmüştür. 1991 yılında bir onkogen olduğu anlaşılan MDM2 geni, kromozal bölgesinden kodlanan MDM2 proteini p53'ü kontrol altında tutarak p53'ün apoptoz etkisini engellemektedir.<sup>46</sup>

Normal hücrelerde p53 ve MDM2 genlerinin sentezlenmesinde bir denge söz konusudur. P53, kendi inhibitörü olan MDM2'nin ekspresyonunu arttırarak hücredeki bu dengenin korunmasını sağlamaktadır. Hücrede bir hasar olduğu sinyalini aldığı zaman p53 ve MDM2'de meydana gelen modifikasyonlar bu iki protein arasındaki etkileşimi inhibe eder ve bu sayede p53 geni aktif hale geçer. MDM2 geni aşırı eksprese olduğu zaman ise p53 proteini fazla miktarda yıkılarak fonksiyon göremez hale gelir. Normal hücrelerde hasar durumunda p53 ve MDM2 geni arasındaki kompleks bozularak, p53 proteininin normal işlevlerinin yerine getirilmesi sağlanmaktadır. Ancak kanser hücrelerinde MDM2 geni çok fazla eksprese edildiğinden dolayı p53 aktivasyonu inhibe edilmekte ve hücre döngüsü devam etmektedir.<sup>45, 47, 48</sup>

MDM2 geni p53 üzerinde negatif kontrole sahiptir. Normal hücrelerde DNA hasarı olduğunda bu iki gen fosforillenerek aralarındaki ilişki kesilmektedir.<sup>48</sup>

MDM2 geninin p53 aktivasyonunu durdurma mekanizması üç şekilde gerçekleşmektedir;<sup>48-51</sup>

- MDM2, p53'ün transkripsiyon bölgesine bağlanarak, ekspresyonunu inhibe eder.
- MDM2, p53 proteininin proteazlar tarafından parçalanmasını tetikler.
- MDM2, p53 geninin asetilasyonunu engeller.

## **2.2. Akciğer Kanseri**

Akciğer kanseri, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde ölümcül kanser türleri arasında erkeklerde birinci kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Akciğer kanseri nedeniyle ölenlerin oranı her geçen yıl biraz daha artmaktadır.<sup>52, 53</sup> Akciğer kanserinin erkeklerde görülme oranı kadınlarda görülme oranından daha yüksek olmasına rağmen, sigara içiminin kadınlarda da artması nedeniyle aradaki fark belirgin bir şekilde düşmeye başlamıştır.<sup>52, 54</sup> Kadınların ve erkeklerin akciğer kanserine yakalanma ihtimali arasındaki farkın sigara içme alışkanlığından geldiği düşünülmektedir.<sup>52</sup>

Akciğer kanserinin nedenleri arasında en büyük etkenin sigara dumanında bulunan kimyasal karsinojenler olduğu kanısı çok yüksektir.<sup>53</sup> Bu karsinojenlerin DNA üzerinde oluşturdukları hasarlardan dolayı<sup>55</sup> ve oksidatif hasarın birikmesine yol açarak<sup>53</sup> mutasyonların meydana gelmesine neden olur ve sonuç olarak hücrelerin neoplastik sürece girmesine sebep olur.<sup>55</sup> Sigaranın tümör baskılayıcı gen olan p53 gen mutasyonlarına neden olarak kanser gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.<sup>56</sup>

Akciğer kanserinde sigaradan sonra etkili olan diğer faktörlerde; radon gazı, mesleki maruziyet, beslenme alışkanlıkları, çevre kirliliği ve genetik yatkınlık bulunmaktadır.<sup>57-60</sup>

### 2.2.1. Akciğer Kanserinin Sınıflandırılması

Akciğer kanseri histopatolojik olarak iki ana gruba ayrılmaktadır.

- a) Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)
- b) Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)

DSÖ'nün akciğer ve plevra tümörleri için 1999'da yaptığı sınıflandırma aşağıda gösterilmektedir.

**Tablo 2.2.** Akciğer kanserinde malign tümörlerin sınıflandırılması<sup>61-63</sup>

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>1. Skuamöz hücreli karsinoma</b><br>Varyantlar;<br>Papiler<br>Berrak hücreli<br>Küçük hücreli<br>Bazaloid                                                                                                                                                                                                                    | <b>4. Büyük hücreli karsinoma</b><br>Varyantlar;<br>Büyük hücreli nöroendokrin karsinoma<br>Kombine büyük hücreli nöroendokrin<br>Bazaloid<br>Lenfoepitelyoma benzeri<br>Berrak hücreli<br>Rabdoid fenotipinde büyük hücreli                                                                                                                                                |
| <b>2. Küçük hücreli karsinoma</b><br>Varyant;<br>Kombine küçük hücreli karsinoma                                                                                                                                                                                                                                                | <b>5. Adenoskuamöz karsinoma</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>3. Adenokarsinoma</b><br>Asiner<br>Papiler<br>Bronkioloalveoller<br>Non-müsinöz<br>Müsinöz<br>Miks müsinöz ve non-müsinöz ya da intermedier hücre tipi<br><br>Müsin salgılayan solid<br>Miks subtipler<br>Varyantlar;<br>İyi diferansiye fotal<br>Müsinöz (kolloid)<br>Müsinöz kist<br>Taşlı yüzük hücreli<br>Berrak hücreli | <b>6. Pleorfik, sarkomatoid ya da sarkomöz elemanlar içeren karsinomlar</b><br>İğ hücreli ve/veya dev hücreli<br>Pleomorfik<br>İğ hücreli<br>Dev hücreli<br>Karsinosarkom<br>Pulmoner blastom<br><br><b>7. Karsinoid Tümörler</b><br>Tipik karsinoid<br>Atipik karsinoid<br><br><b>8. Tükrük bezi tipindeki karsinomlar</b><br><br><b>9. Sınıflandırılmayan karsinomlar</b> |

### 2.2.2. Akciğer Kanserinin Evreleri

Akciğer kanserinin evrelendirilmesi için, birincil tümör büyüklüğü ve yayılımına (T), bölgesel lenf bezi tutulumuna (N) ve uzak metastaz varlığına (M) dayanan TNM evrelendirilmesi yapılmıştır.<sup>64</sup>

Sonraki yıllarda daha sağlıklı evrelendirme yapabilmek amacıyla TNM sisteminin yeniden geliştirilmesi ile skuamöz, büyük hücreli ve adenokarsinomlu (Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, Non-small cell lung cancer, NSCLC) hastalar yapılacak tedavi ve prognoz yönünden Evre IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB ve IV şeklinde sınıflandırılmıştır. Küçük hücreli akciğer kanserli hastalarda TNM sistemi yerine VALG (Veterans Administration Lung Cancer Group) tarafından önerilen evreleme sistemi kullanılmaktadır. Buna göre hastalığın konumu göğüs kafesinin yarısında (bir hemitoraksta) ise "sınırlı" ve hemitoraksın dışında daha yaygın ise "yaygın" olarak evrelendirilmektedir. Bununla beraber TNM evreleme sistemi küçük hücreli hastalarda da kullanılabilmektedir.<sup>65</sup>

**Evre 1:** Tümörün sadece akciğerin küçük bir bölümünde görülme halidir.

- Evre 1A: Kanser sadece bir akciğerdedir.
- Evre 1B: Kanser ya (a) akciğer içinde büyür, ya (b) akciğerin ana bronşuna yayılır, ya da (c) akciğeri kaplayan plevranın iç tabakasına yayılır.

**Evre 2:** Hastalık, en yakın lenf bezlerine atlamış durumdadır.

- Evre 2A: Kanser göğüste bulunduğu taraftaki lenf bezlerine yayılır.
- Evre 2B: Kanser ya Evre 1B'deki gibidir ve aynı taraftaki lenf bezlerine yayılmıştır veya kanser lenf bezlerine yayılmamıştır ama şunlardan bir veya daha fazlasına yayılmıştır: (a) Göğüs duvarına (b) diyaframa veya

(c) akciğerler arasındaki plevraya, (d) kalbin etrafındaki zara ve/veya (e) ana bronşa.

**Evre 3:** Tümör, plevra veya iki akciğer arasındaki mediasten denen boşluğa veya buradaki bezelere yayılmışsa bu durum 3. evredir.

- Evre 3A: Kanser kendisiyle aynı taraftaki lenf bezlerine yayılmıştır. Ayrıca şunlardan bir veya daha fazlasına da yayılmış olabilir: (a) Göğüs duvarına (b) diyaframa veya (c) akciğerler arasındaki plevraya, (d) kalbin etrafındaki zara (perikardiyum) ve/veya (e) ana bronşa.
- Evre 3B: Kanser köprücük kemiğinin üstündeki lenf bezlerine veya göğsün karşı tarafındaki lenf bezlerine yayılmıştır ve/veya şunlardan biri veya daha fazlasına yayılmıştır: (a) Kalbe, (b) aşağı vena kava ve aorta, (c) göğüs duvarına, (d) diyaframa, (e) trakeaya, (f) sternum ve (g) yutağa.
- Evre 3C: Kanser ayrıca plevra tabakaları arasındaki sıvıya da yayılmış olabilir.

**Evre 4:** Karaciğer, kemik, böbrek üstü bezi gibi uzak organlara yayılmış durumudur.

### **2.2.3. Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılan Antikanserijenik Maddeler**

#### **2.2.3.1. Cetuximab**

Epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) hücre içi, hücre dışı ve  $\alpha$ -heliks transmembran bölümlerine sahip olan tirozin kinaz aktivitesi gösteren bir membran reseptörüdür. EGFR sinyali, proliferasyonu ve metastazı artırırken apoptozisi düşürmektedir. EGFR aktivitesi, ATP ile yarışan küçük bir molekülün kinaz bölgesine bağlanmasıyla düşürülebilir. Bunun yanında reseptörün dış kısmına monoklonal antikorun doğrudan uygulanmasıyla da bu işlem gerçekleştirilebilir. Fare-insan

monoklonal antikor olan cetuximab EGFR aktivitesini düşürmektedir. EGFR'ye yönelik terapiler tutarlılık göstermektedir fakat tümör tiplerine karşı klinik aktivitesinin düşük seviyeleri ve onların etkinliğini belirleyen faktörler tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca EGFR hedefli ajanların etkinliği hakkında, bu ajanların hücre mekanizmasını aydınlatan cevap ve bu cevabın doğal ve kendiliğinden elde edilmiş dirençle ilgili olup olmadığı hakkında az şey bilinmektedir.<sup>66</sup>

Yapılan çalışmalarda cetuximabın in vitro ortamda EGFR ekspresyonlu kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve xenograf modellerde tümör büyümesini engellediği belirtilmektedir. Diğer kemoterapötik ajanlarla kombine kullanımının antitümör etkinliğini arttırdığı da bildirilmektedir. Cetuximabın hücre proliferasyonunu engellediği ve apoptozu başlattığı histolojik analizlerle de gösterilmektedir. Ayrıca cetuximab endotelyal hücrelerin apoptozunu ve antianjiyogenik etkiyi de tetiklemiş olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmektedir.<sup>67</sup>

#### **2.2.3.2. Cisplatin**

Birçok kanser türünde platin kökenli bir kemoterapötik olan cisplatin yıllardır başarılı bir şekilde uygulanmaktadır.<sup>68, 69</sup> DNA ve RNA gibi nükleofilik moleküllerle kolaylıkla etkileşime girebilme özelliğine sahip bir ilaçtır. Sitotoksitesinin bu özelliğinden kaynaklandığına inanılmaktadır. Cisplatinin anti kanser özelliği, hücre döngüsüne girerek onu bloke etmesinden, RNA transkripsiyonunu ve DNA replikasyonunu engellemesinden ve apoptoza neden olmasından ileri gelmektedir.<sup>69</sup>

Diğer kemoterapötikler gibi cisplatine karşı da bir direnç oluşmaktadır. Cisplatin uygulaması ile kanser hücrelerinde anti-apoptotik genlerin ekspresyon artışının uyarılması neticesinde kemoresistans gelişimi şekillenmektedir.<sup>69</sup> Bu direnci kırmak için cisplatinin yüksek dozlarda uygulanması gerekmektedir ancak yüksek dozlarda cisplatinin nefrotoksisite ve hepatotoksisite gibi toksik yan etkileri meydana

getirmektedir.<sup>68, 70</sup> Düşük dozlarda ise cisplatinin etki oranı düşmektedir. Bu oran cisplatinin diğer kemoterapötiklerle kombine kullanılması ile artırılabilir ve böylece toksik etkisi de düşürülebilir.<sup>68</sup> Yapılan bir çalışmada gemcitabin ile cisplatinin kombine kullanımı yalnız gemcitabin kullanımına oranla daha iyi etki ve daha hafif toksisite gösterdiği rapor edilmektedir.<sup>71</sup> Ayrıca bu kemoterapötiklerden birkaçının kombine kullanımı son yıllarda birçok kanser tedavisinde başvuru olan seçeneklerden birisi olmaktadır. Böyle kombine kullanımın sonucu olarak kanser tedavisinde daha etkin bir sonuç ve daha düşük toksisitenin oluşması sağlanabilmektedir.<sup>72</sup>

Cisplatinin toksisitesinde en büyük hedefi mitokondride gerçekleşen oksidatif strestir. Bunun sonucu olarak mitokondriyal protein-sülhidril kaybolmaya başlamakta ve mitokondriyal membran potansiyeli düşmektedir. Yapılan incelemelerde cisplatinin, ALT ve AST seviyelerinde yükselmeye ve nitrit oksit, kalsiyum ve albümin seviyelerinde de düşmeye neden olduğu belirtilmektedir.<sup>70</sup>

### **2.3. Kanser Tedavisinde Antioksidanların Rolü**

Antioksidanlar iki şekilde etkilerini göstermektedirler. Bu etkilerini ya direkt olarak serbest radikalleri ve ROS'ları ortamdan temizleyerek ya da indirekt olarak serbest radikallerin kendilerini veya ara ürünlerini metabolize ederek zararsız ürünlere dönüştürerek göstermektedirler.<sup>73</sup>

Antioksidanlar endojen ve ekzojen olarak iki sınıfa ayrılmaktadır.

- **Endojen-Enzimatik Olanlar;** Süperoksit Dismutaz (SOD), Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px), Katalaz (CAT), Glutasyon-s-transferaz (GST) ve mikrobiyal sitokrom oksidaz sistemidir.
- **Endojen-Enzimatik Olmayanlar;** Vitamin E,  $\beta$ -karoten, melatonin, bilirubin, albümin, ferritin, transferrin vb.

Ekzojen antioksidanlar ise folik asit, vitamin C, mannitol vb.<sup>74, 75</sup>

Bilinen en güçlü antioksidan özelliğe sahip olan melatoninin farklı dokulardaki pozitif etkileri araştırılmaktadır.<sup>74</sup> İnsanlarda yapılan klinik çalışmalarda, melatoninle kemoterapinin kombine kullanımının, yalnız kemoterapi kullanımından daha etkili olduğu görülmüştür.<sup>76</sup>

### **2.3.1. Melatonin**

Melatonin hormonunun keşfi 1950'li yılların sonlarında yapılmıştır. Fakat bu tarihten tam üç yüz yıl önce ünlü Fransız Filozof Rene Descartes melatonin hormonunun salgılandığı yer olan pineal bezi ruhun sığınağı olarak tanımlamıştır. Günümüzde ise birçok makalede melatoninin uyku, ruh hali, tümör büyümesi ve yaşlanmanın biyolojik düzenlenmesinde görevli olduğu bulgularına rastlanmaktadır. Yapılan birçok hayvan deneyi çalışmalarında melatonin hormonunun asıl görevlerinden başka özelliklerinin keşfedilmeye başlanmasıyla birlikte bu hormon popüler hale gelmiştir. Ancak melatoninin insan fizyolojisi ve patofizyolojisi üzerine etkileri hala tam olarak belirsizliğini korumaktadır.<sup>77, 78</sup>

N-asetil 5-metoksi triptamin olarak da bilinen melatonin hormonu ilk olarak sığır pineal bez kaynaklı molekülün kurbağa derisinin rengini açması ve bu derinin pigment hücrelerindeki melatonin granüllerini aglutine etmesiyle tanımlanmıştır.<sup>77, 79</sup>

Melatonin memelilerde başlıca beyin serebral yarım küreleri arasında bulunan pineal bezden salgılanmakla birlikte ayrıca over, retina, harder bezi, lakrimal bez, eritrositler, trombositler ile gastrointestinal sistemden de sentezlenip salgılanan nörotransmitter bir hormondur. Bu hormon hem yağda hem de suda çözünabilir özelliğinde olduğu için nükleus dahil hücrenin her organeline ulaşabilir.<sup>80, 81</sup> Melatoninin sentezi ve salınımı karanlıkla uyarılır ışıkla inhibe edilir. Gün ışığı boyunca, fotoreseptör hücreleri hiperpolarizedir yani nörepinefrin salınımı inhibe edilir. Sistem çok az miktarda melatonin salgılar. Karanlıkla birlikte fotoreseptörler

nörepinefrin salar ve böylece sistem aktif hale geçer. Arilalkilamin enziminin seviyesinin artmasıyla da melatonin sentezi ve salınımı artar. Melatonin sentezi arttıkça kan dolaşımına giren melatonin seviyesi de orantılı biçimde artmaktadır. İnsanlarda melatonin salgılanması karanlıkla birlikte artmaya başlar ve gece 2-4 saatleri arasında pik noktaya ulaşır ve sonrasında yavaş yavaş düşmeye başlar.<sup>82, 83</sup>

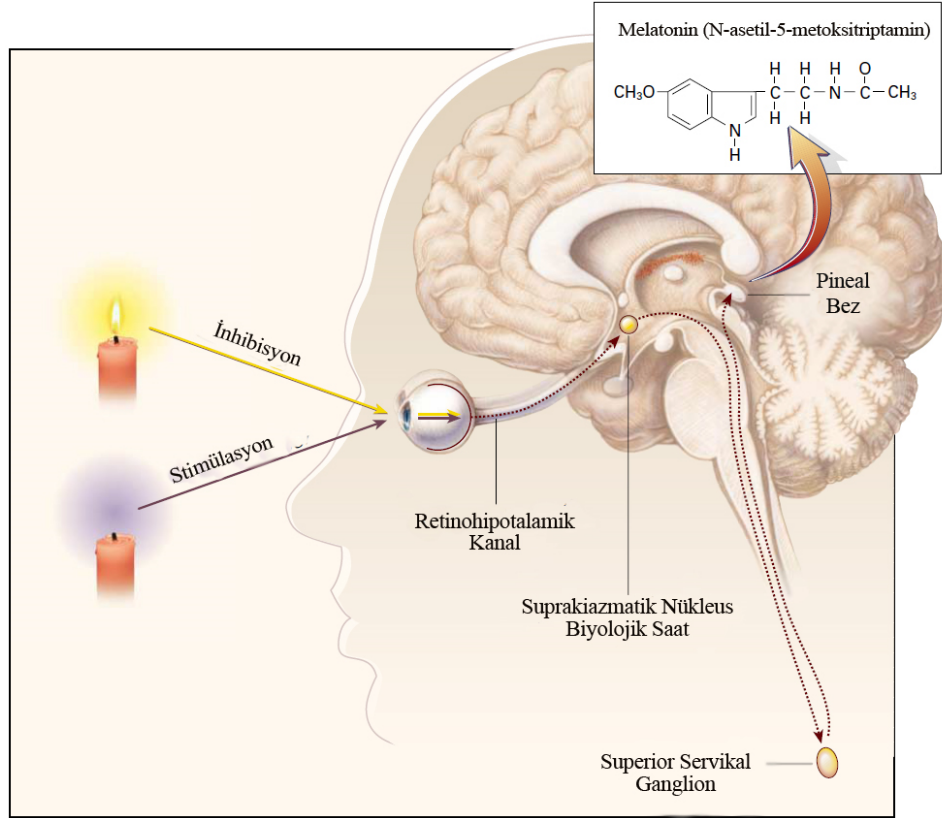
### **2.3.2. Melatonin Hormonunun Biyosentezi ve Salgılanması**

Memelilerde pineal bez hormonu olan melatonin esansiyel bir amino asit olan triptofandan sentezlenmektedir. İlk basamakta triptofan hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksi triptofana daha sonrada bunun dekarboksile olmasıyla 5-hidroksitriptamine (seratonine) dönüşür.

Serotonin arilalkilamin-N- asetiltransferaz enzimiyle N-asetilserotonin formuna dönüştürülür. Son olarak N-asetilserotonin hidroksiindole-O-metiltransferaz enzimi aracılığıyla N-asetil-metoksitriptamine (melatonin) dönüşür. Sentezin düzenlenmesi primer olarak karanlığa bağlıdır. Sentezden sorumlu N-asetiltransferaz'ın aktivitesi fotoperiyodik şartlar altında düzenlenmektedir. Işık altında retinada oluşan sinirsel impulslar hipotalamusta bulunan suprakiazmatik nükleus ve diğer hipotalamusta bulunan yapılara aktarılır. Bu bölgelerin uyarılmasıyla beraber karanlığın da etkisiyle postgangliyonik sempatik liflerden salıverilen nöradrenalin  $\beta_1$  reseptörlerine bağlanarak serotonin ve N-asetiltransferaz'ın salıverilmesine neden olur. Nöronlarda ve pineal bezdeki biyokimyasal sinyallerin etkisiyle melatonin anabolizması hızlanır ve bu hormonun sirkadiyen ritme bağlı olarak sentez ve salıverilmesi gerçekleşir.<sup>13, 84-86</sup>

Melatonin, özellikle karaciğerde olmak üzere, 6-hidroksimelatonine hidroksilasyonla metabolize olur ve sülfirik asit ve glukuronik asitle birleşerek idrar yoluyla atılır.<sup>77, 82, 86</sup>

**Şekil 2.2.** Melatonin salgılanmasının fizyolojisi.<sup>77</sup>



### 2.3.3. Melatoninin Apoptotik ve Anti-kanserojenik Etkisi

Melatoninin ile ilgili yapılan birçok in vivo ve in vitro çalışmalarda bu hormonun onkostatik etkiye sahip olduğu, birçok kanser türünde oluşan semptomları hafiflettiği, tümör anjiogenezisini, poliferasyonunu ve metastaz oluşumunu yok edici etkiye sahip olduğu görülmektedir.<sup>87, 88</sup> Pinealektomi yapılan hayvanlarda tümör büyümesinin arttığı ve daha sonra bu hayvanlara melatonin uygulaması yapıldıktan sonra tümör gelişiminin yavaşladığı bildirilmiştir.<sup>77, 89</sup>

Melatoninin etkileri, ileri derece kanserli bazı hastalarda çalışılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Örneğin, glioblastomalı hastaların bir kısmına yalnız radyoterapi

verilirken diğerk bir kısmına melatonin ile kombinasyon uygulanmıştır. Kombine kullanım yalnız radyoterapiye göre çok daha iyi sonuçlar alınmasını sağlamıştır.<sup>90</sup>

**Melatoninin tümör gelişimine karşı olumlu etkileri;**

- 1- Kanserk hücreleri tarafından yağ asidi büyüme faktörü alınımını kısıtlaması,
- 2- Telomer uzunluğunun azaltılması yoluyla telomeraz aktivitesini kısıtlayarak kanser hücrelerinde apoptoza neden olması,
- 3- Tümörlerde damar gelişmesine sebep olan anjiogenik bir faktör olan endotelin-1 sentezini baskılaması,
- 4- P53 geninin ekspresyonunu sağlaması ile gerçekleşmektedir.<sup>87</sup>

Son yıllarda yapılan çalışmalarda hastalarda tümör oluşumuyla birlikte uyku bozukluğunun da görüldüğü bildirilmiştir.<sup>91</sup> Melatoninin kanser hastalarında biyolojik regülasyonu düzenleyerek yeni tümör oluşumlarını engellediğı ve kanser hastalarının yaşam kalitesini iyileştirdiğı görülmüştür.<sup>92</sup> Hayvan deneyi çalışmaları ve klinik denemelerde melatonin hormonunun meme kanseri, prostat kanseri, akciğer kanseri, kolon kanseri ve diğerk kanser türlerinin gelişmesini baskılayıcı özelliğinin olduğu görülmüştür.<sup>93, 94</sup> Ayrıca melatoninin kemoterapötik ilaçlarla beraber kullanıldığında ilaçların yan etkilerini azalttığı, bu sebepten dolayı da hastaların yaşam standartlarını iyileştirdiğı görülmüştür.<sup>91</sup>

Shilian Hu ve ark.<sup>94</sup> akciğer kanserli hastalarda yapmış oldukları bir çalışmada kemoterapi uygulanan hastaların serumlarında triptofan ve melatonin hormonunun düşük olduğunu ve bu hastalara dışarıdan triptofan verilerek melatonin sentezini arttırmanın önemli olabileceğini bildirmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE METOT

#### 3.1. Hücre Kültürü

##### 3.1.1. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı

- 85 ml Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)
- 10 ml fetal bovine serum
- 1 ml Penisilin-Streptomisin-Amfoterisin B
- 2 ml L-glutamine

Maddeleri eklenerek kullanıma hazır hücre kültür medyumunu elde edildi.

##### 3.1.2. Hücre Kültürü İnkübasyon Koşulları

Akciğer kanseri hücre hattı (A549), 23. Pasaj olarak Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarında -196 °C’de hazır olarak bulunmaktadır. DMEM besi yeri medyumunu içerisinde %5 CO<sub>2</sub> ve 37 °C sıcaklıktaki etüvde (Nuaire) 25 cm<sup>2</sup>’lik flasklarda steril şartlarda inkübe edilerek hücrelerin çoğalması sağlandı.

##### 3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması (Subculturing)

Üremekte olan hücreler flaskların zemininin %80-90’ını kapladığında (confluent) hücreler pasajlandı.<sup>95, 96</sup> Bu amaçla üremekte olan hücreler yeteri kadar çoğaldığında;

- Flasklarda bulunan kültür medyumunu uzaklaştırılarak steril fosfat tampon solüsyonu (PBS) (25 cm<sup>2</sup> için 2 ml) ile yıkandı.
- PBS’i de uzaklaştırdıktan sonra zemine yapışan hücreleri kaldırmak için 3 ml tripsin-EDTA solüsyonu ilave edildi ve etüvde 10 dk. bekletildi.
- Flaskın yüzeyinde yapışık olan hücreler kaldırıldıktan sonra tripsin-EDTA solüsyonunda süspansiyon halinde 15 ml hacimli bir tüp içerisine aktarıldı.

Solüsyonun üzerine tripsinin inkübasyonu için tripsin hacminin 2 katı medyum eklendi.

- Tüpe aktarılan süspansiyonun 1300 rpm’de 10 dk.’lik santrifüj işlemine tabii tutulmasının ardından üst kısımda bulunan tripsin-EDTA solüsyonu uzaklaştırıldı.
- Tüpün dibinde pellet şeklinde bulunan hücrelerin üzerine taze medyumdan ilave edilerek oluşan süspansiyon 5 adet 25 cm<sup>2</sup>’lik flaslara bölünerek tekrar pasajlandı.
- Yeniden pasajlanan hücreler 37 °C’de %5 CO<sub>2</sub> ortamında inkübasyona bırakıldı.

#### **3.1.4. Hücrelerin Dondurulma ve Saklanma İşlemleri**

- Tripsin-EDTA solüsyonu ile yüzeye yapışan hücreler kaldırılarak santrifüj edildi.
- Tripsin-EDTA solüsyonu uzaklaştırılarak pellet halinde bulunan hücrelerin üzerine 1ml medyum ilave edildi ve sayıldı.
- Tripsin, hacminin en az iki katı serumlu besi yeriyle inkübe edildi.
- Hücreler pipetlenerek tek hücre süspansiyonu haline getirilip bir falkon tüpe aktarıldı. Üzerine 2-3 ml daha medyum ilave edildi.
- Hücre süspansiyonu 1300 rpm’de 10 dk. santrifüj edildikten sonra üstte kalan kısım uzaklaştırıldı.
- Pelletin üzerine 900 µl hücre medyumunu koyularak sayıldı.
- Dondurma tüpleri içerisine 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO) ve 900 µl hücre medyumunu ile süspanse edilen hücre solüsyonu eklendi.
- Tüpler dondurma kabına yerleştirilerek -80 °C’de derin dondurucuda gerektiğinde kullanılmak üzere saklandı.

### **3.1.5. Hücre Sayılarının Hesaplanması**

Ependorf tüpe, 1 ml kültür medyumunu ile sulandırılan hücrelerden 10 µl alınarak üzerine 90 µl tripan blue boyası eklenerek karıştırıldı. Bu karışım Neubauer lamı üzerine konularak 5 bölmedeki hücre sayımları yapıldı, daha sonra bulunan bu sayı sulandırma miktarı x50.000 ile çarpıldı. Çıkan sonuç 1 ml medyumda kaç milyon hücre olduğunu göstermektedir. Böylece ekim yapılacak sayı belirlenip hücrelerin petriye ekimleri yapıldı. 100 mm'lik kültür petrisine  $5 \times 10^6$  hücre ve 96 kuyucuklu kültür plağının her kuyucuğuna 5000 hücre transfer edilmiş oldu.

### **3.2. Deney Gruplarında Kullanılan Maddelerin Doz Ayarlamaları**

#### **Melatonin hazırlanışı:**

Melatonin (Sigma Aldrich, M5250), %99,8'lik etil alkolle (Sigma Aldrich, UN1170) mililitrede 50 mg olacak şekilde çözüldükten sonra, besi yeri medyumunu ile %1'den az olacak şekilde seyreltilerek 10 nM'lık konsantrasyondaki elde edilen melatonin solusyonu A549 hücrelerine uygulandı.<sup>97</sup>

#### **Cisplatin**

Koçak Farma'dan temin edilen cisplatin maddesi, besi yeri medyumunda daha önce yapılan çalışmalar doğrultusunda belirlenen konsantrasyon olan 50 µM olacak şekilde besi yeri ile seyreltildi ve deney gruplarına uygulandı.<sup>98</sup>

#### **Cetuximab:**

Ticari adı Erbitux olan (Merck, Darmstadt-Germany) cetuximab, daha önce yapılan çalışmalar referans alınarak besi yerinde konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde A549 hücrelerine uygulandı.<sup>99</sup>

### **3.2. Hücre Sitotoksikite Analizi**

#### **MTT Yöntemi**

MTT analizi, formazon boyalarının ya da MTT azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivitenin kolorimetrik olarak ölçümüne dayanan ve böylece hücre çoğalmasının ne düzeyde olduğunu belirleyen yöntemdir. Bu metotla, hücrelere uygulanan terapötiklerin, hücrelerin üzerindeki sitotoksik ya da proliferatif etkinlikleri belirlenebilmektedir.<sup>100</sup>

Melatonin, cetuximab ve cisplatin ile bunların farklı kombinasyonlarda kombine kullanımının A549 hücre hattı üzerinde oluşan sitotoksik etkileri MTT kiti ile üretici firmanın (Sigma Co. Germany) kullanım talimatına göre uygulandı. Yöntem MTT ajanının hücrelere eklendikten sonra inkübasyona bırakılmasıyla meydana gelen renk değişiminin kolorimetrik olarak belirlenmesi prensibine dayanmaktadır. Oluşan renk değişikliği sarı ile renklendirilmiş formazon tuzlarının aktif hücre mitokondrilerinde tetrazolyum tuzunun azalması sonucunda oluşmaktadır. Bu bileşiklerin absorbands değeri metabolik olarak aktivitelerinin belirlenebilmesi ile orantılıdır.

#### **Yapılış Yöntemi;**

MTT ajanının uygulanmasından 1 gün önce 96'lık plak içerisinde her kuyucuğa 5000 hücre gelecek şekilde 100 µl kültür medyumunu ile hücrelerin ekimi yapıldı. Mikroplak 24 saat 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> ayarlı inkübatörde bekletilerek hücrelerin yüzeye yapışmaları sağlandı. Bu yolla tripsin enziminin hücre membran proteinleri ve büyüme faktör reseptörleri üzerinde oluşturduğu zararlar ortadan kaldırılmış oldu. Bu protein ve faktörlerin yeniden sentezlenebilmesi için 24 saatlik bir süreye ihtiyaç duyulmaktadır.<sup>101</sup> Aynı zamanda bu yolla medyum içerisindeki terapötik ajanların hücreyle muamelesinden önce hücrelerin metabolik aktivite kazanması sağlanır.

24 saatlik inkübasyondan sonra dilüsyon halinde hazırlanan melatonin, cisplatin ve cetuximab maddeleri mikropalaklar içerisinde seriler halinde gruplara bölünerek hücre hattı medyumuna ilave edildi. Her bir mikropalak kuyucuğunda toplam hacim 200 µl olacak şekilde madde uygulamaları yapıldı. A serisinin birinci sütunu hücre kontrol ve ikinci sütunu ise medyum kontrol olarak ayarlandı.

Tüm madde uygulamalarından sonra hücre hatlarına 24 ve 48 saat süreli inkübasyonda tutuldu, MTT yöntemi uygulandı. Bu yöntem analizine başlanmadan önce 96'lık plaklarda bulunan medyumun 100 µl'si uzaklaştırılarak MTT analizine başlandı.

#### **MTT analizi;**

1- 96'lık plak kuyucuklarında bulunan 100 µl medyum ve hücre karışımı üzerine, hazırlanmış tiazolil mavi tetrazolium bromid solüsyonundan 10 µl ilave edildi. Bu solüsyon ilavesini takiben 96'lık plak inkübatöre alınarak 3 saat bekletildi.

2- Üç saatlik inkübasyonun ardından hücrelerin yüzeyinde bulunan medyum bir pipet ile alınarak MTT çözücü solüsyonundan 100 µl ilave edildi ve 20 dk. daha inkübatörde bekletildi.

3- İnkübasyonu yapılan hücrelerin, mikropalak okuyucu spektrofotometre (µ-Quant, BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA) ile 570 nm absorbans değerinde ölçümleri 3 tekrarlı olarak yapıldı.

Microsoft Excel programı yardımı ile uygulanan doz ve % hücre viabilite eğrisi belirlenerek %50 baskılayıcı konsantrasyon (IC50) değeri logaritmik eğim grafiği ile hesaplandı.

### **3.3. İmmünohistokimyasal (ICC) Boyama Metodu**

Hücrelerin Lamda Üretilmesi

1. Poly-L-lysine kaplı lamalar (Thermo Fisher Scientific, USA) 10 cm çapındaki petri kutularına hücre ekimi yapılmadan önce yerleştirilerek class II tip biyogüvenlik kabini içerisinde 4 saat süreyle ultraviyole ışık altında sterilize edildi.

2. 25 cm<sup>2</sup>'lik flasklarda çoğaltılan hücrelerden, UV ışık altında steril edilen petrilere her bir petri içerisindeki lamaların st yüzeylerine eşit miktarda (100 L medyunda süspanse yaklaşık 5000) hücre gelecek şekilde ekim yapıldı.

3. Lam zerine hücrelerin yapışmasını takiben (ortalama 24 saat sonra), petriler gruplara ayrıldı ve yalnız ve kombine olarak uygulanacak olan cisplatin, cetuximab ve melatonin gruplarının petrilere çeşitli konsantrasyonlarda bu kombinasyonlar eklenirken, kontrol grubundakilere aynı miktarda kültür medyumı konuldu.

4. İnkübasyon sresinin bitimini takiben (24 saat sonra) petri içindeki medyum pipet yardımıyla uzaklaştırıldı ve fosfat tampon solüsyonu (PBS) eklenerek hücre yıkama işlemi yapıldı.

Fiksasyon;

1. PBS ile yıkanan ve lam üzerinde yapışık bulunan hücreler petrilere çıkarılarak -20 C'de soğutulmuş metanol içerisinde 10 dakika tespit edildi.

2. Tespit edilen lamalar PBS ile yıkandı, kurutuldu ve boyama prosedürüne başlanıncaya kadar -20 C'de saklandı.

**ICC boyama;**

➤ Boyama işlemine alınacak lamalar derin dondurucudan çıkarılarak oda ısısına gelinceye kadar bir süre bekletildi ve takiben PBS ile yıkandı.

➤ Endojen peroksitlerin bloklanması için %3'lk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solüsyonunda 10 dk. bekletildi.

➤ Daha sonra 5 dk. süre ile 3 kez PBS solüsyonuyla yıkandı.

- Permeabilizasyon için (intrase         protein tespiti için oldukça önemlidir); lamalar %0,1 Triton X-100-PBS solüsyonunda 10 dk. bekletildi.
- Lamlar 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra %1 BSA–PBS (bloklama) solüsyonunda 30 dk. bekletilerek non-spesifik bağlanmaların önüne geçildi.
- Daha sonra %1 BSA–PBS solüsyonu ile sulandırılan primer antikorda (Bax, Mouse monoclonal, ab5714) 37   C’de 1 saat nemlendiricili kabinde bekletildi.
- Lamlar   zerindeki primer antikor solüsyonu lamı eğip kenarından döküldükten sonra, PBS solüsyonu ile her biri 5 dk. olmak üzere 3 kez yıkandıktan sonra üzerine sekonder antikor solüsyonu döküldü. Sonra 1 saat boyunca nemlendiricili kabin içerisinde inkübe edildi.
- Sekonder antikor lamların üzerinden uzaklaştırıldıktan sonra, her biri 5’er dk. olacak şekilde PBS ile 3 kez yıkandı.
- Lamların   zerine Horseradish peroksidaz (HRP) konjugeli streptovidin biotin damlatılarak 30 dk. inkübe edildi.
- Streptovidin biotin solüsyonu lamlardan uzaklaştırıldıktan sonra 3 kez 5 dk. süreli PBS ile yıkandı.
- Lamlar   ekirdek boyaması için Harris’in Hematoksilen solüsyonunda 5 dk. bekletildikten sonra dereceli alkol ve ksilol serilerinden geçirilip entellan (Merck, Germany) ile kapatıldı.

### **3.4. İmm  nositokimyasal Değerlendirme**

İmm  nositokimyasal boyama sonuçlarının gruplar arası kıyaslamalarını yapabilmek için “Stereolojik Fractionator Frame” metodu kullanıldı. Bu analizler stereoloji workstation sistemi (BioPrecision MAC 5000 controller system) ve stereoloji software (Stereo Investigator version 9.0, Microbrightfield, Colchester, VT) ata  manlı ışık mikroskobu (Leica DM4000 B, Tokyo, Japan) altında yapıldı.<sup>102, 103</sup>

Çalışmamızda A549 hücre preparatları üzerinde Bax immünopozitifliği “Unbiased Counting Frame and Fractionator” metodu<sup>101, 102</sup> kullanılarak tüm gruplara ait her bir preparattaki 1000 adet hücre sayılarak bunlar içerisinde pozitif hücreler fractionator programıyla işaretlendi. Preparattaki sayım sonrası bin hücre içerisindeki pozitif hücre yoğunluğu Tablo 4.3 ve 4.4’te verilmiştir. Stereolojik Fractionator programı ile hücrelerin sayımı Şekil 3.1’de gösterilmektedir.

### **3.5. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR)**

#### **Analizleri**

##### **3.5.1. RNA İzolasyon Safhası**

Hazırlanmış olan hücre kültürlerinden elde edilen ekstraktan 200µl ROCHE MagNA Pure Compact otomatik DNA-RNA izolasyon cihazına konuldu. Ardından Roche MagNA Pure Compact RNA izolasyon kiti ile RNA izolasyonu yapılarak 50 µl örnek elde edildi.

##### **3.5.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentez Safhası**

Elde edilen mRNA’ların konsantrasyonu ölçüldü ve mRNA konsantrasyonuna göre cDNA yapım aşamasında 15-20 ng arasında bir değer sağlanması için bir miktar sulandırıldı. Konsantrasyonu ayarlanan örneklerden 10 µl alınarak üzerine Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kitinden çıkan Random Primerden 2 µl ile, 1 µl distile su (her bir örnek için) 0.2 ml’lik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tüplerine konuldu. Daha sonra Reverse Transcriptor PCR cihazında 65 °C’de 10 dk. denatürasyon yapıldı. PCR’de bu işlem devam ederken denatüre olan RNA’ların üzerine cDNA’yı oluşturması için içerisine koyulan mix hazırlandı.

##### **3.5.3. Real Time PCR Cihazına Yükleme Aşaması**

Öncelikle karışım hazırlandı. Her bir örnek için;

- 8 µl distile su

- 5 µl probe master mix
- 2 µl P53 ve 2 µl MDM2 primeri
- 5 µl cDNA

Standartlar İçin Hazırlanan Mix;

- 8 µl distile su
- 5 µl probe master mix
- 2 µl beta aktin primer standardı
- Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standartlardan 5 µl cDNA

Standartların Hazırlanışı;

- Standart 1: Hiç sulandırma yapılmaz. Konsantrasyon:10000
- Standart 2: Standart1'den alınan 5 µl cDNA üzerine 45 µl distile su eklenir ve elde edilen konsantrasyon :1000
- Standart3: Standart2'den alınan 5 µl cDNA üzerine 45 µl distile su eklenir ve elde edilen konsantrasyon :100
- Standart4: Standart3'den alınan 5 µl cDNA üzerine 45 µl distile su eklenir ve elde edilen konsantrasyon :10
- Real Time PCR da Costom Assay PCR programı seçilir.

Preinkibasyon

- 1 cycles Analiz modu None.
- 95 te 10 dk. Ramprate 4.4 Cooling
- 1 Cycles Analis Mode None
- 40 te 30 sn. None Ramp Rate: 2.2

Absolite kuantifikasyonda değer elde edebilmemiz için 4 adet standart kullanıldı.

Hazırlanan karışımlar plak üzerindeki her bir kuyucuğa uygun şekilde total hacim 20 µl olacak şekilde yüklenerek plaktaki yükleme cihazına tanıtıp program başlatıldı. Real

Time PCR programı tamamladıktan sonra Absolute kuantifikasyonda analizi yapılarak standartların baz alınmasıyla cihazın örneklere verdiği değerler not edildi.

#### **3.5.4. RT-PCR (Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu) P53 ve MDM2 Gen Ekspresyonlarının Ölçülmesi**

Her bir örneğe ait cDNA'lar kullanılarak genlerinin ekspresyonları (P53 ve MDM2) Roche LightCycler 480 Real-Time PCR cihazında çalışıldı. Cihazın 96 kuyucuklu PCR plağı vardır. PCR işlemleri gerçekleşirken, her bir kuyucuktaki amplifikasyon miktarını kuantitatif olarak eş zamanlı verme özelliğine sahiptir. Bir plağa her bir örnek 7 kuyu kullanılacak şekilde yükleme yapıldı. Çalışmada P53, MDM2 ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış standart G6PD kullanıldı. Her bir örnek için kullanılan 5µl cDNA, 8 µl ddH<sub>2</sub>O, 5 µl Probe Master mix 2 µl P53 ve 2 µl MDM2 primeri aktarıldı. P53 ve MDM2 Genlerinin Ekspresyon tayinini Roche Lightcycler 480 Real-Time PCR Cihazı PCR Programı Real Time PCR da Costom Assay PCR programı seçildi. Absolute kuantifikasyonda değer elde edebilmemiz için 4 adet standart kullanıldı. Hazırlanan karışımlar mikro plak üzerindeki her bir kuyucuğa uygun şekilde total hacim 20 µl olacak şekilde yüklendi. Ardından plaktaki yükleme cihaza tanıtılıp program başlatıldı. Real Time PCR programı tamamladıktan sonra Absolute kuantifikasyonda analiz yapılarak standartları baz alarak cihazın örneklere P53 ve MDM2 verdiği değerler not edildi.

#### **3.6. İstatistiksel Analiz**

Çalışmadan elde edilen MTT analizi sonuçlarımızın istatistiksel analizinde homojen dağılım gösterdiği belirlendikten sonra tek yönlü varyans analizi (ANOVA) Post hoc. Duncan testi yapıldı. Önemlilik derecesi 0.05 olarak alındı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Sitotoksisite (MTT) Analizi Sonuçları

Akciğer kanseri hücre hattında melatonin, cisplatin ve cetuximab uygulamaları sonrası hücrelerin MTT yöntemiyle sitotoksisite analizi sonuçlarının değerlendirmesinde; 24 saatlik gruplarımızda en yüksek hücre oranının kontrol grubunda olduğu belirlenirken, özellikle melatonin ve cetuximab kombinasyonu uygulanan grubun sitotoksisitesinin oldukça yüksek olduğu ve cetuximab uygulanan grubun değerinin diğer gruplardan istatistiksel olarak düşük olduğu görüldü ( $P<0.05$ ). Diğer grupların karşılaştırmalarında ise gruplar arası anlamlı bir farkın olmadığı belirlendi ( $P>0.05$ ). Melatonin, cisplatin ve cetuximab uygulanan gruplara ait 24 saat inkübasyon süreli MTT sonuçları ve istatistiksel karşılaştırmalar Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de de sunulmaktadır.

Akciğer kanser hücrelerine (A549) 48 saat süreli melatonin, cisplatin ve cetuximab uygulamaları sonrası MTT analizi değerlendirmelerimizde; en yüksek hücre konsantrasyonunun kontrol grubunda olduğu görülürken cisplatin ve cetuximab, melatonin, cisplatin ve cetuximab ile melatonin ve cisplatin kombinasyonları uygulanan gruplarda hücre yoğunluklarının anlamlı bir fark oluşturacak şekilde düştüğü belirlendi ( $P<0.05$ ). Melatonin uygulanan grupta ise kontrol grubuna yakın bir değer görülürken karşılaştırmamızda anlamlı bir farkın olmadığı görüldü. Diğer taraftan melatonin ve cetuximab uygulanan grupta kontrol grubuna oranla anlamlı bir düşüş belirlenirken bu düşüşün diğer melatonin, cisplatin ve cetuximab kombinasyonları uygulanan gruplara oranla daha az olduğu fakat kontrol grubundan anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ( $P<0.05$ ). Cisplatin ve cetuximab uygulanan gruplarda ise kontrol ve melatonin gruplarına göre anlamlı düşüş olduğu belirlendi ( $P<0.05$ ). Tüm gruplara ait 48 saat

sürekli inkübasyon sonucu elde edilen sitotoksosite değerleri Tablo 4.1 ve Şekil 4.1’de gösterilmektedir.

**Tablo 4.1.** Melatonin, cisplatin ve cetuximab uygulamaları sonrası 24 ve 48 saat inkübasyonlu gruplara ait sitotoksosite sonuçları

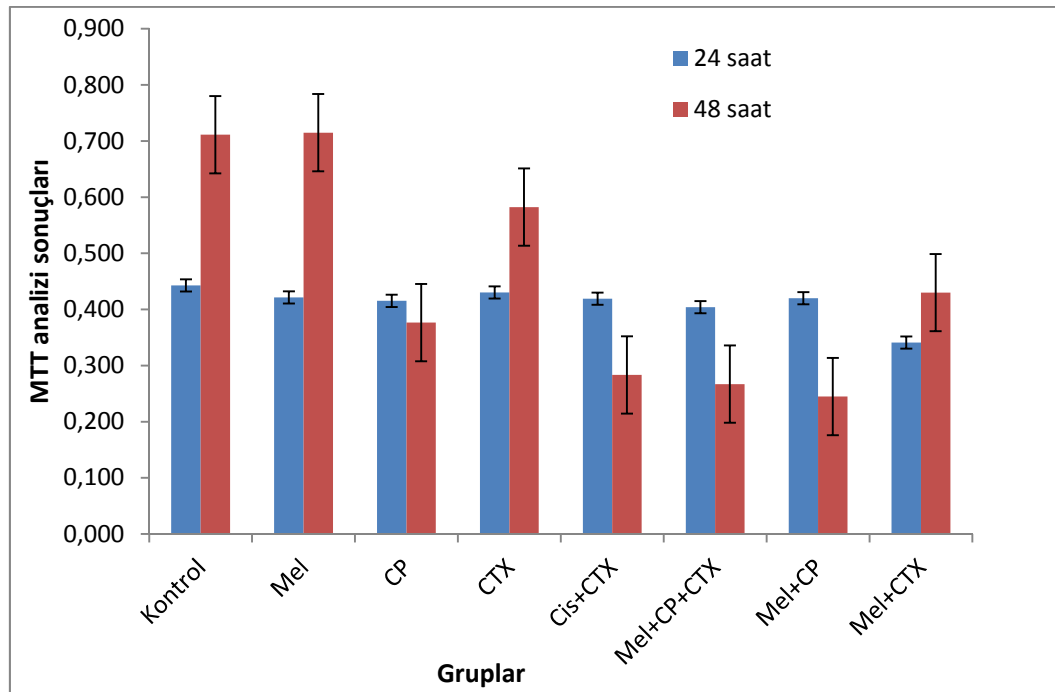
| Gruplar           | 24 saat                   | 48 saat                  |
|-------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>Kontrol</b>    | 0,443±0,047 <sup>ab</sup> | 0,711±0,033 <sup>a</sup> |
| <b>Mel</b>        | 0,421±0,032 <sup>ab</sup> | 0,715±0,086 <sup>a</sup> |
| <b>CP</b>         | 0,415±0,024 <sup>ab</sup> | 0,377±0,041 <sup>b</sup> |
| <b>CTX</b>        | 0,430±0,061 <sup>ab</sup> | 0,582±0,043 <sup>c</sup> |
| <b>CP-CTX</b>     | 0,419±0,016 <sup>ab</sup> | 0,283±0,025 <sup>b</sup> |
| <b>Mel-CP-CTX</b> | 0,404±0,032 <sup>a</sup>  | 0,267±0,024 <sup>b</sup> |
| <b>Mel-CP</b>     | 0,420±0,017 <sup>bc</sup> | 0,245±0,032 <sup>b</sup> |
| <b>Mel-CTX</b>    | 0,341±0,043 <sup>c</sup>  | 0,430±0,047 <sup>d</sup> |

<sup>abc</sup> harfleri gruplar arası istatistiki farklılığı göstermektedir.

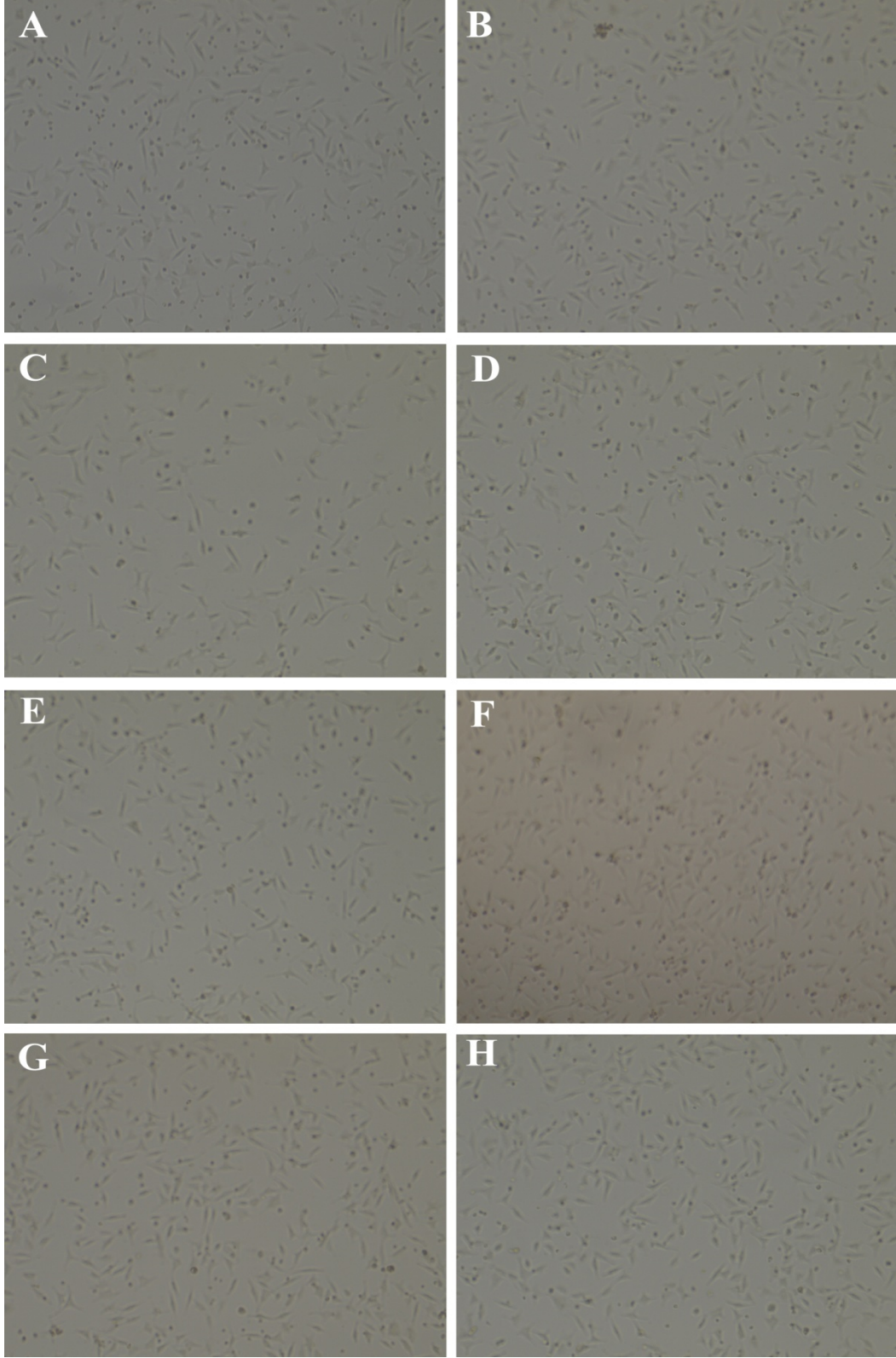
Tüm veriler ortalama ± standart deviation (SD) olarak ifade edilmiştir.

İstatistiksel değerlendirme Tek yönlü varyans analizi Duncan Testi ile yapılmıştır.

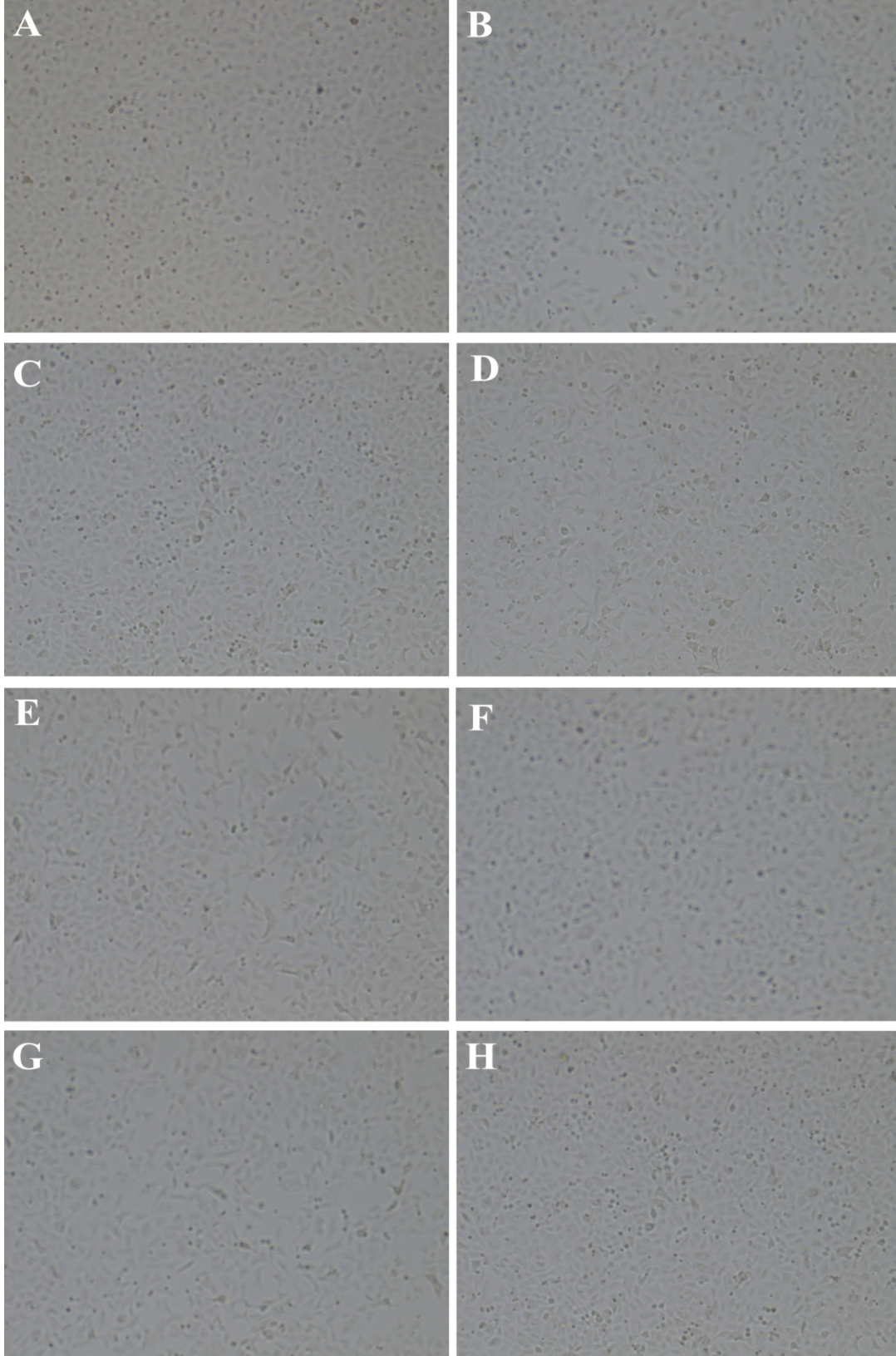
İstatistiksel önem P<0.05 olarak kabul edilmiştir.



**Şekil 4.1.** Akciğer hücre hattı (A549); melatonin, cisplatin ve cetuximab uygulamaları sonrası 24 ve 48 saat inkübasyonlu hücre hatları sitotoksosite (MTT) analizi sonuçları



**Şekil 4.2.** Tüm gruplara ait 24 saat süreli melatonin, cisplatin ve cetuximab uygulanan A549 hücreleri invert mikroskop görüntüsü; **A:** Kontrol, **B:** Melatonin, **C:** Cisplatin, **D:** Cetuximab, **E:** Melatonin-Cisplatin, **F:** Melatonin-cetuximab, **G:** Cisplatin-cetuximab ve **H:** Melatonin-cisplatin-cetuximab grupları.



**Şekil 4.3.** Tüm gruplara ait 48 saat süreli melatonin, cisplatin ve cetuximab uygulanan A549 hücreleri invert mikroskop görüntüsü; **A:** Kontrol, **B:** Melatonin, **C:** Cisplatin, **D:** Cetuximab, **E:** Melatonin-Cisplatin, **F:** Melatonin-cetuximab, **G:** Cisplatin-cetuximab ve **H:** Melatonin-cisplatin-cetuximab grupları.

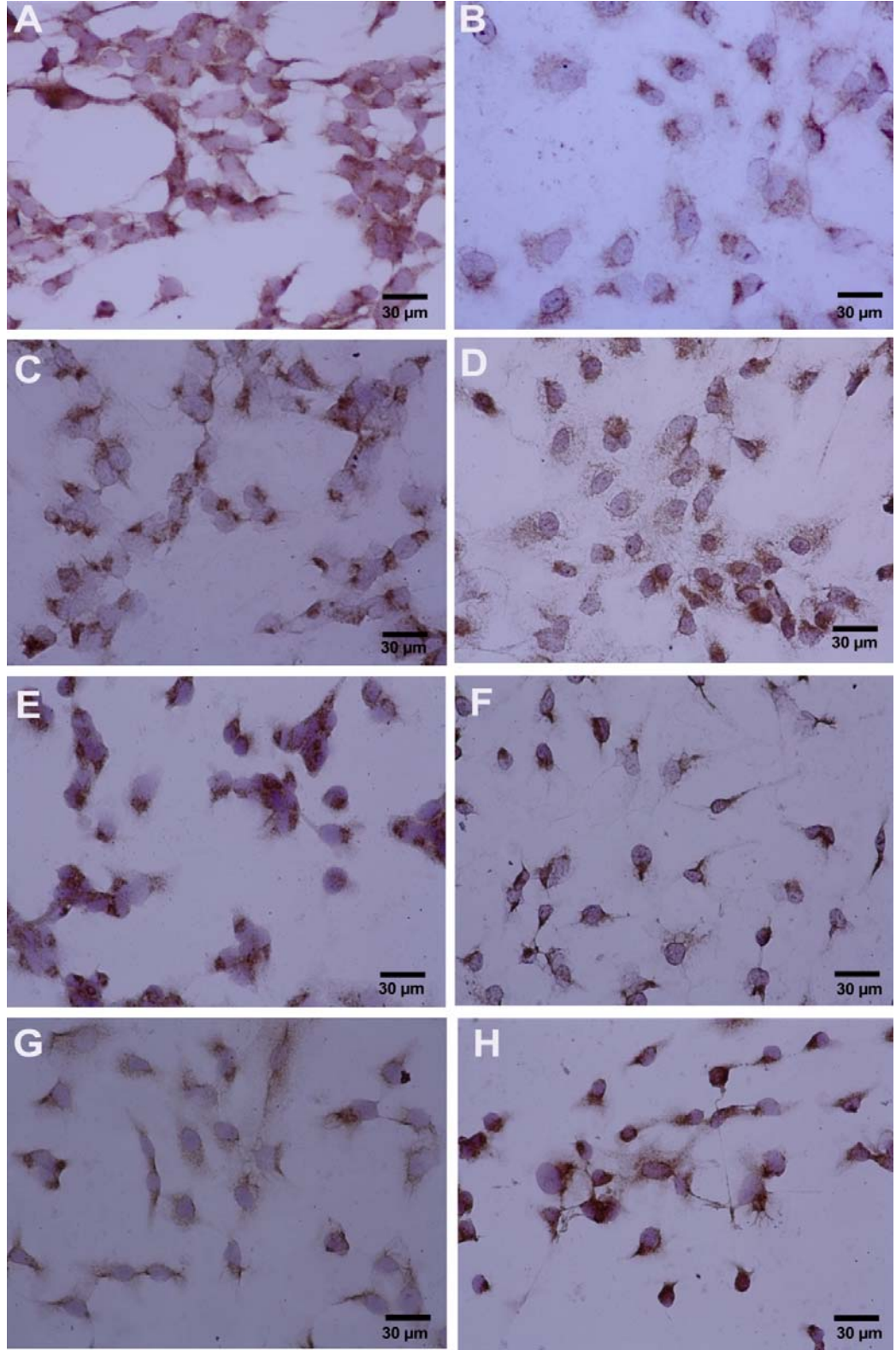
#### 4.2. İmmünotokimyasal (ICC) Bax Boyaması Sonuçları

İmmünotokimyasal Bax boyama sonuçlarının stereolojik analizi sonuçlarının değerlendirmesinde; 24 saat inkübasyonlu grupta en yüksek immün pozitifliğin cisplatin ve melatonin-cetuximab uygulanan gruplarda olduğu görülürken, kontrol ve melatonin uygulanan gruplarda pozitifliğin az olduğu görüldü. Melatonin, cisplatin ve cetuximab kombinasyonları uygulanan gruplarda ise pozitifliğin kontrol grubuna göre nispeten arttığı görüldü.

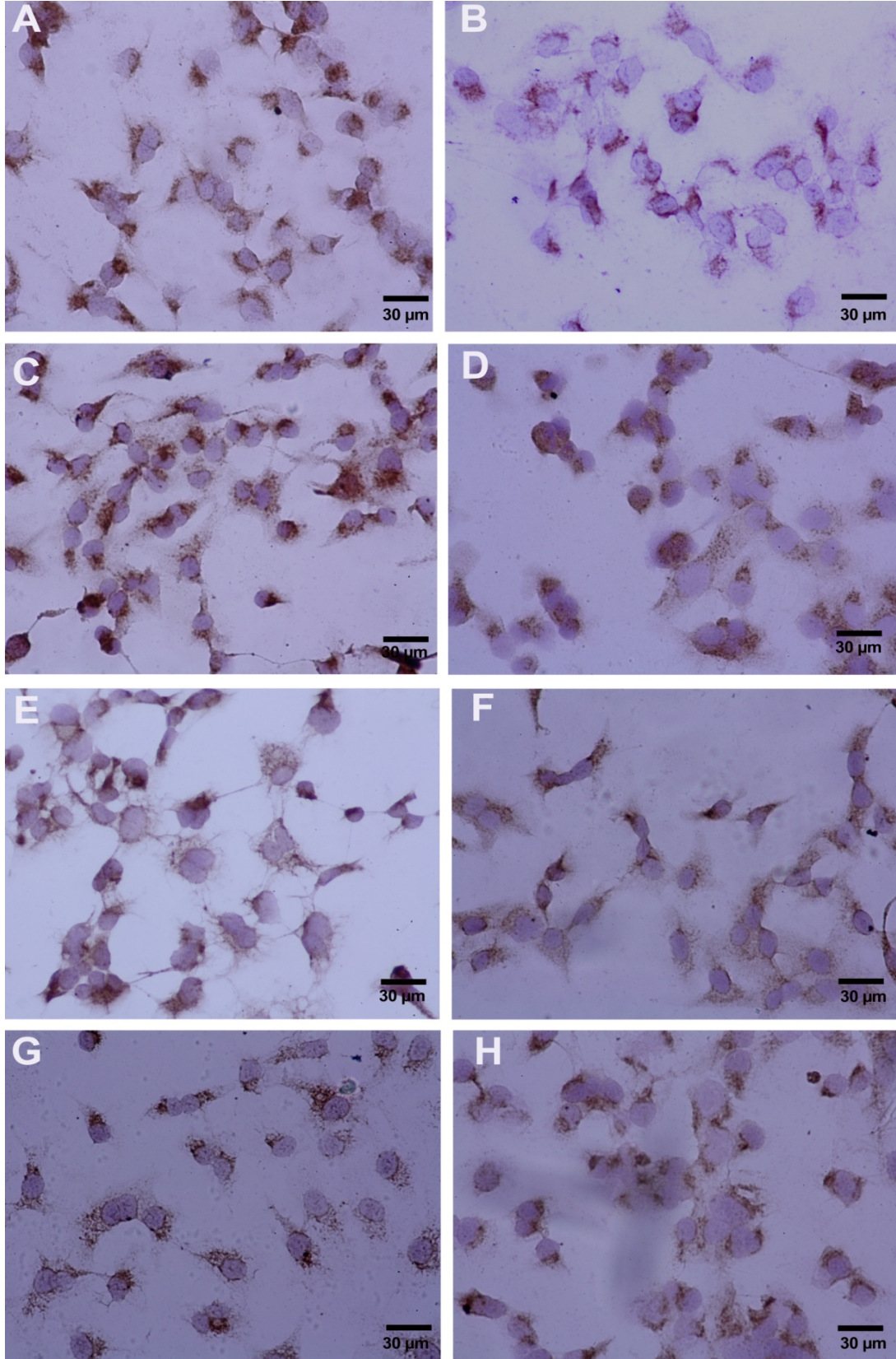
Tüm gruplara ait immünotokimyasal Bax boyaması 48 saatlik grupların sonuçlarının değerlendirmesinde, en yüksek pozitifliği cisplatin ve cetuximab uygulanan gruplarda olduğu görülürken, bunların kombine uygulandığı gruplarda da benzer pozitiflik artışlarının olduğu belirlendi.

**Tablo 4.2.** İmmünotokimyasal Bax pozitif hücrelerin Stereolojik Optic Fractinator metoduyla hesaplanması

| Gruplar           | Bax immunopozitif hücre yoğunluğu |       |
|-------------------|-----------------------------------|-------|
|                   | 24h                               | 48h   |
| <b>Kontrol</b>    | 0.107                             | 0.142 |
| <b>Mel</b>        | 0.184                             | 0.162 |
| <b>CP</b>         | 0.662                             | 0.732 |
| <b>CTX</b>        | 0.537                             | 0.673 |
| <b>CP-CTX</b>     | 0.383                             | 0.463 |
| <b>Mel-CP-CTX</b> | 0.428                             | 0.563 |
| <b>Mel-CP</b>     | 0.552                             | 0.682 |
| <b>Mel-CTX</b>    | 0.605                             | 0.721 |



**Şekil 4.4.** Tüm gruplara ait 24 saat süreli melatonin, cistplatin ve cetuximab uygulanan Bax immunopozitif A549 hücreleri görüntüsü; **A:** Kontrol, **B:** Melatonin, **C:** Cisplatin, **D:** Cetuximab, **E:** Melatonin-Cisplatin, **F:** Melatonin-cetuximab, **G:** Cisplatin-cetuximab ve **H:** Melatonin-cisplatin-cetuximab grupları.



**Şekil 4.5.** Tüm gruplara ait 48 saat süreli melatonin, cistplatin ve cetuximab uygulanan Bax immunopozitif A549 hücreleri görüntüsü; **A:** Kontrol, **B:** Melatonin, **C:** Cisplatin, **D:** Cetuximab, **E:** Melatonin-Cisplatin, **F:** Melatonin-cetuximab, **G:** Cisplatin-cetuximab ve **H:** Melatonin-cisplatin-cetuximab grupları.

### 4.3. RT-PCR Analizi Sonuçları

Tüm gruplara paralel koşullarda uygulanan ve 24 ile 48 saat inkübasyonları sağlanan melatonin, cisplatin ve cetuximab maddelerinin 2 paralel örneği kuantitatif RT-PCR’de analiz edildi. Elde edilen sonuçların 24 saat inkübasyonlu gruplarda değerlendirmesinde, kontrol grubu P53 geni ekspresyonunun diğer gruplara göre oldukça düşük olduğu görülürken özellikle melatonin, cisplatin ve melatonin-cetuximab uygulaması yapılan grupların P53 geni ekspresyonlarının oldukça arttığı belirlendi. melatonin-cisplatin-cetuximab, cisplatin-cetuximab ve melatonin-cisplatin uygulanan gruplarda ise ekspresyonun kontrol grubuna oranla nispeten arttığı fakat bu artışın çok yüksek olmadığı belirlendi.

RT-PCR analizi 48 saat inkübasyonlu grupların P53 ekspresyonları değerlendirmesinde ise; kontrol grubu dahil tüm gruplarda ekspresyon artışına rastlanırken özellikle melatonin-cisplatin-cetuximab, melatonin-cisplatin ve melatonin-cetuximab uygulaması yapılan gruplarda P53 ekspresyonunun azaldığı belirlendi. Düşüş görülen gruplardan melatonin-cetuximab grubu değerinin oldukça yüksek olduğu tespit edildi.

Tüm gruplara ait RT-PCR analizi sonuçlarının değerlendirilmesinde, P53 ekspresyon düzeyleri 24 ve 48 saat inkübasyonlu sürelerin karşılaştırılmasında; kontrol, melatonin ve cisplatin grupları arasında büyük bir farklılık görülmezken, özellikle cisplatin ve cetuximab uygulamalarının 48 saat inkübasyon periyodunda artışa sebep olduğu belirlendi. Cetuximab uygulamasının gen ekspresyonunu yüksek bir oranda arttırdığı belirlenmiştir. Tüm gruplara ait 24 ve 48 saat inkübasyon süreli P53 gen ekspresyon düzeyleri Tablo 4.3’de sunulmuştur.

Tüm gruplara ait RT-PCR analizi MDM2 geni ekspresyon düzeylerinin kuantitatif analizi sonuçları değerlendirmesinde, 24 saatlik gruplar içerisinde en yüksek

MDM2 gen ekspresyonu artışının cisplatin uygulaması yapılan grupta olduğu belirlenirken, cetuximab ve cisplatin-melatonin tedavisi uygulanan gruplarda en düşük değerlerin olduğu görüldü. Melatonin, cisplatin-cetuximab ve melatonin-cisplatin-cetuximab uygulaması yapılan gruplarda gen ekspresyonu kontrol grubuna göre düşük düzeyde bir artış gösterdiği tespit edildi.

Tüm gruplara ait MDM2 gen ekspresyonlarının 48 saat inkübasyonlu gruplarda sonuçların karşılaştırılmasında, en yüksek ekspresyon artışının cetuximab uygulanan grupta olduğu, melatonin ve cisplatin uygulaması yapılan gruplarda ise artışın olduğu fakat cetuximab grubuna göre düşük olduğu belirlendi. Diğer taraftan madde kombinasyonları uygulanan gruplarda değerlerin düştüğü belirlendi.

Grupların 24 ve 48 saat inkübasyonları karşılaştırmalarında ise cisplatin ve cetuximab uygulanan gruplarda MDM2 geni ekspresyonu artışı belirlenirken, madde kombinasyonları uygulanan gruplarda bu değerlerin 24 saat inkübasyonlu gruplara göre düştüğü belirlendi.

**Tablo 4.3.** Tüm gruplara ait kuantitatif RT-PCR P53 ve MDM2 geni internal kontrol (Beta-Aktin) oranı ile ekspresyonu düzeyleri

| Gruplar           | P53/ACTB |         | MDM2/ACTB |        |
|-------------------|----------|---------|-----------|--------|
|                   | 24h      | 48h     | 24h       | 48h    |
| <b>Knt</b>        | 25,00    | 27,50   | 120,00    | 125,00 |
| <b>Mel</b>        | 2493,33  | 2940,00 | 126,67    | 166,67 |
| <b>CP</b>         | 2210,00  | 4010,00 | 215,00    | 210,00 |
| <b>CTX</b>        | 99,50    | 3460,00 | 11,00     | 410,00 |
| <b>CP-CTX</b>     | 62,50    | 372,22  | 125,50    | 27,78  |
| <b>CP-CTX-Mel</b> | 304,50   | 61,00   | 161,00    | 6,00   |
| <b>CP-Mel</b>     | 96,50    | 37,50   | 18,50     | 2,63   |
| <b>CTX-Mel</b>    | 3170,00  | 108,00  | 235,00    | 16,00  |

## 5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri son yıllarda insidansı oldukça artan ve yüksek mortaliteyle seyreden, günümüzde hayati risk taşıyan önemli kanser türleri arasında yer almaktadır. Akciğer kanseri hızlı yayılım gösterdiğinden ve nüks riskinin yüksek olmasından dolayı tedavisi büyük önem taşımaktadır. Ancak yapılan birçok farklı tedavi girişimine rağmen akciğer kanserli hastalarda sağ kalım oranı yıllık %22'dir.<sup>104</sup> Günümüzde akciğer kanseri tedavisinde cerrahi, palyatif (radyoterapi) ve kemoterapötiklere sıkça başvurulmaktadır. Ayrıca kanser nüksünün erken tanısına yönelik de araştırmalar yoğunlaşmıştır. Bu araştırmalar cerrahi uygulama sonrası nüksü önlemeye ve sağ kalım oranını arttırmaya yönelik olup farklı karakteristiklere sahip kimyasal ve doğal ajanların kombine kullanımlarını gündeme getirmektedir. Bu sebeple son yıllarda birçok araştırmacı akciğer kanseri tedavisinde daha etkili doğal ya da kimyasal ajanları araştırmaktadır.

Akciğer kanseri oluşumunda diğer tüm kanser tiplerinde de olduğu gibi büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri, anjiyogenik faktörler, hücre döngü regülatörleri ya da DNA tamir genleri gibi pek çok gende oluşan çeşitli genetik ve epigenetik değişimlerin birikmesi etkili olmaktadır. Akciğer kanseri üzerine yapılan birçok çalışma, günümüzde kanser riski ya da ilerleyişi ile ilişkili ve aynı zamanda anti-kanser ilaçların toksisitesi ve tedavideki etkinliği gibi pek çok önemli konuda hastalığın teşhis ve tedavi sürecinde öncü olabilecek aydınlatıcı bilgiler sunmaktadır.<sup>105, 106</sup> Hücre döngüsünün işleyişinde önemli rolü bulunan P53 proteini spesifik bir anti-proliferatif inhibitör ve apoptotik bir protein olup malignitelerin çoğunda mutant olarak rastlanmaktadır.<sup>36, 43</sup> P53 proteininin işlev kaybı, onun hücre büyümesi, hücre bölünme kontrolündeki etkinliğinin ve apoptoz uyarılmasındaki etkisinin kaybedilmesine yol açmaktadır.<sup>107</sup> Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde P53 geni mutasyonu aracılı

apoptozun inaktive olduğu belirlenmiştir.<sup>36, 43, 107</sup> Bu gen bölgesinin aynı zamanda P21 geni ekspresyonunu kontrol ederek hücre proliferasyonunda rol alan CDK'ların sentezini de sağlamaktadır. Bu sebeple P53 mutasyonu geçirmiş hücreler üzerinde kontrolsüz bir çoğalmanın gerçekleştiği bildirilmiştir.<sup>108</sup> Bu gen sitotoksik ajanlara karşı tümör hücrelerinin duyarlılığının önemli bir belirteçidir ve DNA hasarında hücresel cevabın oluşmasını sağlamaktadır. P53 gen bölgesinin sentezlediği P53 proteini hücrede kısa süreli sentezlendiği için normal hücrelerde çok fazla birikmemektedir. Fakat tümör hücrelerinde mutant P53 miktarı, oluşan DNA hasarına bağlı olarak çok miktarda sentezlenmektedir.<sup>109</sup>

Bu çalışmada melatonin, cisplatin ve kombine melatonin-cetuximab uygulamalarının P53 ekspresyon düzeylerinin 24 ve 48 saat inkübasyonlu periyotlarda arttığı görülürken, cetuximab ve cisplatin-cetuximab uygulanan gruplarda artışın az olduğu belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada MCF-7 hücre hattına adriamisin uygulaması ile P53 miktarının azaldığı belirlenirken<sup>110</sup>, Singh ve ark. resveratrol ve cyclophosphamide uygulaması ile P53 ekspresyonunun arttığını rapor etmişlerdir.<sup>111</sup> İnsan A431 SCC tümör ksenograflarında uygulanan cetuximabın hücresel anjiyogenik büyüme faktörlerini azalttığı rapor edilmiştir.<sup>112</sup> Yine insan transisyonel hücre karsinomlarına cetuximab uygulaması ile hücresel VEGF, bFGF ve IL-8'in mRNA ve protein düzeyinin baskıladığını öne sürmüşlerdir.<sup>113</sup> Cisplatin uygulaması yapılan non-small hücreli akciğer kanserinde hastalara intratümöral olarak enjekte edilen adeno virüs aracılı P53 geni ile cisplatin konjugeli plazmid tedavisinde, bazı hastalarda (%43) cisplatinin tedaviye yüksek oranda cevap verdiği ve tümöral oluşumun gerilediği gösterilmiştir.<sup>114</sup> Benzer olarak Swisher ve ark. çalışmalarında P53 plazmidi uyguladıkları akciğer kanserli hastalarda kanser büyümesinin yavaşladığını bazı hastalarda ise durduğunu rapor etmişlerdir.<sup>115</sup> Ayrıca Pfister ve ark. çalışmalarında

cetuximab ve cisplatin kombinasyonu ile birlikte radyoterapi uyguladıkları çalışmalarında hastaların (%95 oranında) büyük çoğunluğunun kombine tedaviye cevap verdiği ve 3 yıllık tedavi süresinde 1 hastanın öldüğünü bildirmişlerdir.<sup>116</sup> Kim ve ark. doz bağımlı melatonin uygulaması yaptıkları antrojen pozitif prostat kanseri hücrelerinde P53 ve P21 ekspresyonlarında artışı bildirmişlerdir.<sup>117</sup> Literatüre paralel olarak çalışma bulgularımızda melatonin, cisplatin ve kombine melatonin-cetuximab uygulanan grupların P53 ekspresyonu düzeylerinde meydana gelen artışın tümöral hücrelere uygulanan maddeler aracılı olarak uyarılan bazı gen bölgeleri ya da proteinleri direk ya da indirek olarak uyararak P53 gen artışına sebep olabilecekleri sonucuna varılırken bu yolak ve mekanizmasının tam olarak ortaya konulabilmesi için daha detaylı moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

MDM2 gen bölgesinden kodlanan MDM2 proteini (pMDM2), P53'ü bağlayarak P53'ün G1/S geçişinde hücre siklusunu durdurmasını ve apoptotik etkisini engeller.<sup>118</sup> MDM2 proteini sitoplazmada P53'e bağlanarak ve 'E3 ubiquitin ligase' aktivitesi ile P53'ü yıkarak P53'e karşı çalışan bir proteindir. Hücrede meydana gelebilecek bir takım patolojik değişikliklere (asetilasyon, metilasyon gibi) bağlı olarak MDM2 geni eksprese edilemez. Bu yüzden MDM2 proteini P53'ü bağlayamaz ve serbest kalan P53 transkripsiyonel aktivitesini göstererek G1 ve G2 kontrol noktalarında siklusun durdurulması ve Bax geni aktivasyonu ile apoptoza neden olur.<sup>118, 119</sup> MDM2 geninde oluşabilecek bir mutasyon MDM2 protein ekspresyonu artışına sebep olacağından P53 geni kontrolsüz olarak baskılanır ve hücre proliferasyonu artış gösterir.<sup>120</sup> Mutant MDM2 geni kanser gelişimi için etiyolojik bir neden olabileceğinden ve P53 geni negatif baskılayıcısı olduğundan kanser çalışmaları ve P53 aracılı apoptozun belirlenebilmesi için önemli bir alan oluşturmaktadır. Yapılan bir çalışmada immünohistokimyasal yöntemle değerlendirilen MDM2 ekspresyonu ile prognoz

arasında anlamlı ilişki tespit edilmemiştir.<sup>121</sup> Çalışmamıza ait kuantitatif RT-PCR analizi sonuçlarının MDM2 geni ekspresyonu seviyesine bakıldığında (Tablo 4.3), 24 saatlik inkübasyon süresinde cisplatin ve melatonin-cisplatin-cetuximab ve melatonin-cisplatin kombinasyonları uygulanan gruplarda artışların olduğu görüldü. Diğer taraftan 48 saat süreli inkübasyon gruplarından cetuximab, cisplatin ve melatonin uygulanan gruplarda MDM2 geni ekspresyonu artışı görüldü. Bu maddelerin kombine uygulandığı gruplarda ise ekspresyonda azalışı tespit edildi. Yapılan bir çalışmada ekstremitelere yerleşen retroperitoneal liposarkomlarda MDM2'nin yüksek oranda ekspresyonu belirtilmiştir.<sup>122</sup> Yapılan bir çalışmaya göre cisplatin ve FUS1 gen konjugeli nanopartikül uyguladıkları akciğer kanseri hücrelerinde MDM2 geni ekspresyonunun düştüğünü belirlemiştir.<sup>123</sup> Ayrıca doz bağımlı melatonin uygulaması yapılan antrojen reseptör pozitif prostat kanser hücrelerinde MDM2 proteini artışına sebep olduğu rapor edilmiştir.<sup>117</sup> Bu bulgular, bazı literatürlere paralel olarak akciğer kanseri hücrelerinde (A549) melatonin, cisplatin ve cetuximab ile bunlara ait kombinasyonları uygulamalarının MDM2 gen ekspresyonunu arttırabileceği gösterdi.

Tümör hücrelerinde apoptozun tetiklenmesinde rol alan bir takım pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin yanı sıra mitokondriyal disfonksiyonun, hücre ölüm reseptör sentezi, kaspazların aktivasyonları ve ROS'ların üretimindeki artışı gibi sebepler yer almaktadır.<sup>38</sup> Apoptozun tetiklenmesinde P53 geni önemli bir rol oynar. Ancak P53 geninin mutasyonuna veya fonksiyon kaybına akciğer karsinomunda %80 oranında rastlanmaktadır.<sup>124 117</sup> Bcl-2 ailesi proteinler antiapoptotik ve proapoptotik üyelerden oluşur ve apoptozun düzenlenmesinde rol alırlar. Bcl-2 ve Bcl-XL proteinleri hücrede ya kaspazların öncü formlarını durdururlar ya da kaspas aktivesine sebep olan sitoplazmik apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve mitokondriyal sitokrom-c gibi apoptoz uyarıcı faktörleri baskılayarak etkilerini gösterirler.<sup>38</sup> Bax ya da Bak gibi proapoptotik

üyeler ise hücrede kaspaz aktivasyonunu tetikler ve mitokondriyon membranının porlarının açıklığını değiştirerek sitokrom- c'yi uyarır ve bu yolla apoptoz aktive edilir. P53 geni ise hücresel siklusa hasar gören hücrelerde Bax'ı uyatarak hücrede apoptozu sağlar. P53 ile Bax arasındaki fiziksel bağlantı ile birçok hücre tipinde apoptoz rapor edilmiştir.<sup>125, 126</sup> Diğer taraftan birçok kanser hücresinde tümör süpresör gen olarak da bilinen p53 geni mutasyona uğramaktadır ve DNA hasarının onarımını ya da hücrede apoptozun uyarılmasına aracılık edememektedir.<sup>38</sup> Bu gende mutasyon sebebiyle fazla miktarda mutant P53 eksprese edilir. Oysa mutant P53 hücrede ne siklusun kontrol edilebilmesine ne de apoptozun tetiklenmesine aracılık edebilmektedir.<sup>127</sup> Küçük hücreli akciğer kanserinde P53 mutasyon oranı %90 iken yassı hücre akciğer kanseri hücrelerinde P53 geni mutasyonu %65 oranında görülmektedir.<sup>62</sup>

Bu çalışmaya ait immünohistokimyasal Bax boyama sonuçlarında, cisplatin, cetuximab ve melatonin-cisplatin-cetuximab kombinasyonu uygulanan gruplara ait 24 ve 48 saat süreli inkübasyon sonrasında kontrol grubuna göre Bax pozitif hücre yoğunluğunun arttığı belirlenirken melatonin ve cisplatin-cetuximab uygulanan gruplarda pozitifliğin düştüğü belirlenmiştir. Kim ve ark. melatonin uygulaması yaptıkları prostat kanseri hücrelerinde apoptozun arttığını rapor etmişlerdir.<sup>117</sup> Deng ve ark. cisplatin ve FUS1 geni konjugeli nanopartikül uyguladıkları akciğer hücre gruplarında apoptotik hücre miktarının arttığını tespit etmişlerdir.<sup>123</sup> Mukohora ve ark. ise gefinitib ve cetuximab uygulaması yaptıkları çalışmalarında her iki maddenin de apoptotik hücre miktarını arttırdığını belirlerken en yüksek miktarın gefinitib uygulanan grupta olduğunu belirtmişlerdir.<sup>128</sup> Literatürden elde edilen bulgular ile çalışma bulgularımız karşılaştırıldığında, melatonin grubunda farklılığın olduğu belirlenirken, kombine melatonin, cisplatin ve cetuximab uygulamaları yapılan gruplarda literatüre paralel olarak apoptotik artış tespit edildi.

Özetle, çalışmamızda uygulanan melatonin, cisplatin ve cetuximabın yalnız ve kombine kullanımlarının akciğer kanseri hücre kültüründe hücresel siklusu G1/S kontrol noktasında durduran ve hücrede oluşabilecek muhtemel DNA hasarlarına karşı koruyan P53 geni ve bunun negatif kontrolü niteliğindeki MDM2 geni ekspresyon düzeyleri, melatonin, cisplatin ve melatonin-cetuximab uygulanan gruplarda belirgin bir şekilde arttığı görüldü. Ayrıca programlı hücre ölümünde (apoptoz) P53 aracılı olarak aktive olan ve apoptozu uyaran Bcl-2 gen ailesi pro-apoptotik Bax proteini immünohistokimyasal analizi sonucunda ise özellikle cisplatin ve cetuximab ile bunların kombinasyonlarının uygulandığı gruplarda immün pozitifliğin arttığı tespit edildi. Bu bilgiler ışığında melatonin ve melatonin-cetuximab uygulamalarının akciğer kanseri tedavisinde başvurulabilecek alternatif kombine tedaviler arasında en etkin olanı olduğu ve bunların cisplatin ile kombine kullanımlarının etkinliğinin nispeten az olduğu sonucuna varıldı.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmadan elde edilen sonuçları özetleyecek olursak;

1- Melatonin, cisplatin ve cetuximab maddeleri ile bunların kombinasyon uygulamalarının sitotoksitite analizleri yapılarak bu maddeler ile en etkili kombine uygulama belirlendi.

2- Akciğer kanseri gibi hasta sağ kalım oranı %22 olan kötü prognozlu bir kanser türü için en etkin tedavi seçeneğinin belirlenmesine yönelik çoklu kombinasyonların etkileri değerlendirildi.

3- Antioksidan bir madde olan melatonin ile toksik etkisi yüksek olan cisplatin ve monoklonal bir antikor olan cetuximabın birlikte kullanımının hücresel siklusa rol alan ve DNA hasarı ile apoptozun uyarılmasından sorumlu olan P53 geni ekspresyonu üzerindeki etkileri belirlenirken bunların yalnız kullanımları da değerlendirildi.

4- Hücresel siklusa birçok araştırmacıya göre kanser hücrelerinde prognoz belirlenmesinde önemli bir bulgu olan MDM2 gen ekspresyon düzeyi, melatonin, cisplatin ve cetuximab uygulamaları sonrası 24 ve 48 saat süreli inkübasyon gruplarında değerlendirilerek, MDM2 ekspresyonunun P53 ile karşılaştırmalı olarak etkinliği belirlendi.

5- Akciğer kanser hücresi üzerine melatonin, cisplatin ve cetuximab uygulamalarının apoptotik etkinliğinin belirlenmesi için yapılan immünohistokimyasal Bax boyası ile apoptoz aktivasyon düzeyi belirlendi.

6- Çalışmadan elde edilen bulguların değerlendirilmesi, yeni ilaç tedavi stratejilerinin ya da yeni tedavi kombinasyonlarının geliştirilmesine katkıda bulunabilecektir. Özellikle akciğer kanserli hastalarda tedavide başarısızlıklar sık rastlanan bir durumdur. Bu tür durumların önlenmesi amacıyla doğal ve kimyasal maddelerin kullanımının önemi tekrar edilmiş oldu.

Çalışmamızda elde edilebilecek çıkarımları özetlediğimizde ise;

Son yıllarda kanser tedavisi için dünyada birçok yeni stratejiler çalışılmaktadır. Kanser tedavilerinde kullanılan kemoterapötiklerin hedef hücrelerden başka özellikle karaciğer ve böbrek gibi hayati organlar üzerinde de oldukça toksik etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler göz önüne alındığında, antikanserojen özellik taşıyan maddelerin farmakolojik ajanlar ile kombine kullanımının önemi ortaya çıkmaktadır.

Bunlara ek olarak, kanser tedavisinde kullanılan ilaçların ROS artışı ile hücre ölümünü tetiklediği bilinmektedir. Bu durumda, hedef hücrelerde daha fazla DNA hasarı ve mutasyon oluşumu tetiklenebilmektedir. Böylece hücrelerde proliferasyonu arttıran bir diğer faktör gelişebilmektedir.

Bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda, melatonin, cisplatin ve cetuximab kombine uygulamalarının Bax protein ekspresyonu ve P53 geni ekspresyonu düzeylerinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı farklar oluşturduğu görülürken, bu uygulamaların alveoler akciğer kanseri tedavisinde alternatif tedavi seçeneği olabileceği sonucuna varıldı.

## KAYNAKLAR

1. Başer S, Bayız H, Göksele T, Turhan K, Uslu R, Yalman D. *Akciğer Kanseri ile Yaşamak*. 1. Baskı. Ankara, Türk Toraks Derneği, 2009: 4-6.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 2010, 127: 2893-917.
3. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 2010, 60: 277-300.
4. Yardım N, Mollahaliloğlu S, Çakır E. Evaluation of Turkey Ministry of Health 1983-2001 cancer incidences and cancer death rates in the Burden of Disease Study data. *Turkish Journal of Cancer*, 2007, 37: 148-153.
5. Tuncer AM. Kanserin Ülkemiz ve Dünyadaki Önemi, Hastalık Yüğü ve Kansere Kontrol Politikaları. İçinde:Tuncer AM (editör). *Türkiye'de Kansere Kontrolü*, Ankara, T.C. Sağlık Bakanlığı Kansere Savaş Dairesi Başkanlığı, 2009: 3-108.
6. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1999, 91: 1194-210.
7. Argon A, Taş F. *Akciğer Kanseri: Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar*. 1. Baskı. Bursa, Avrupa Tıp Kitapçılık, 2000: 1194-1210
8. Tozkoparan B, Aytaç SP. Kansere kemoterapisinde terapötik hedef olarak glutatyon s-transferazlar. *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 2007, 27: 139-164.
9. Nikitovic D, Kouvidi K, Karamanos NK, Tzanakakis GN. The roles of hyaluronan/RHAMM/CD44 and their respective interactions along the insidious pathways of fibrosarcoma progression. *Biomedical Research International*, 2013, 2013: 929531.

10. Sigerist HE. The historical development of the pathology and therapy of cancer. *The Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 1932, 8: 642-53.
11. Atıcı E. Tıp tarihinde kanser ve lösemi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 2007, 22: 197-204.
12. Dalay N. Kanser. İçinde: *Hücre: Moleküler Yaklaşım*, Sakızlı M, Atabey N (editörler). *The Cell: A Molecular Approach*, Cooper GM, Hausman RE. 3. Baskı. İzmir, İzmir Tıp Kitabevi, 2006: 631-671.
13. Öner P. Kanser Biyokimyası. İçinde: Gürdöl F, Ademoğlu E (editörler). *Biyokimya*, 2. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2013: 653-674.
14. Abercrombie M, Ambrose EJ. The surface properties of cancer cells: A review. *Cancer Research*, 1962, 22: 525-48.
15. Özgürtaş T. Kanser, Kanser Genleri ve Büyüme Faktörleri. İçinde: *Harper Biyokimya*, Dikmen N, Özgünen T (editörler). *Harper's Biochemistry*, Murray RK, Daryl KG, Mayes PA, Rodwell VW. 25. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2004: 787-811.
16. Turi JL, Jaspers I, Dailey LA, Madden MC, Brighton LE, Carter JD, Nozik-Grayck E, Piantadosi CA, Ghio AJ. Oxidative stress activates anion exchange protein 2 and AP-1 in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular*, 2002, 283: 791-8.
17. Rios-Arrabal S, Artacho-Cordon F, Leon J, Roman-Marinetto E, Del Mar Salinas-Asensio M, Calvente I, Nunez MI. Involvement of free radicals in breast cancer. *SpringerPlus*, 2013, 2: 404.
18. Sözman EY. Yaşlanma Biyokimyası. İçinde: Onat T, Emerk K, Sözman EY (editörler). *İnsan Biyokimyası*, Ankara, Palme Yayıncılık, 2002: 665-674.
19. Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B, Atik U. Serbest radikaller. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2012, 1: 52-58.

20. Başkol M, Başkol G, Koçer D, Artış T, Yılmaz Z. Mide kanserli hastalarda oksidan ve antioksidan parametreler ve birbiriyle ilişkileri. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2007, 5: 83-89.
21. Şenses SV, Özyazgan S, Akkan AG. Serbest oksijen radikalleri - I: Vücuttaki antioksidan sistemler. *Türkiye Aile Hekimliği Dergisi*, 1999, 3: 5-11.
22. Aydemir B, Karadağ S, E. Antioksidanlar ve büyüme faktörleri ile ilişkisi *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 2009, 2: 56-60.
23. Yokuş B, Çakır DÜ. Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2012, 1: 7-18.
24. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 1991, 281: 9-19.
25. Waris G, Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis*, 2006, 5: 14.
26. Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Frontiers in Bioscience*, 2005, 10: 1881-96.
27. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2001, 2: 91-95.
28. Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2011, 20: 145-158.
29. Solakoğlu Z. Apoptoz varlığı ya da yokluğu Bir hastalık nedeni. *Klinik Gelişim Dergisi*, 2009, 22: 20-25.
30. Eröz R, Karataş A, Alkoç OA, Baltacı D, Oktay M, Çolakoğlu S. Apoptozis hakkında bilinenler (literatür taraması). *Düzce Tıp Dergisi*, 2012, 14: 87-101.

31. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92: 7162-6.
32. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35: 495-516.
33. Moll UM, Zaika A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2001, 493: 65-9.
34. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, 2000, 5: 415-8.
35. Ersöz M. İnsan Meme Kanseri (MCF 7) ve Fibroblast (L-929) Hücre Kültürlerinde Poliakrilik Asidin Toksisitesinin İncelenmesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı. Yüksek Lisans, İstanbul: Yıldız Teknik Üniversitesi, 2007.
36. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*, 1991, 253: 49-53.
37. Roemer K. Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biological Chemistry*, 1999, 380: 879-87.
38. Altunkaynak BZ, Özbek E. Programlanmış hücre ölümü: Apoptoz nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 2008, 6: 93-104.
39. Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB. Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89: 7491-5.

40. Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, 1989, 246: 629-34.
41. Weinert TA, Hartwell LH. Characterization of RAD9 of *Saccharomyces cerevisiae* and evidence that its function acts posttranslationally in cell cycle arrest after DNA damage. *Molecular and Cellular Biology*, 1990, 10: 6554-64.
42. Maeda N, Fan H, Yoshikai Y. Oncogenesis by retroviruses: old and new paradigms. *Reviews in Medical Virology*, 2008, 18: 387-405.
43. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Research*, 1994, 54: 4855-78.
44. Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Research*, 1991, 51: 6304-11.
45. Freedman DA, Wu L, Levine AJ. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 1999, 55: 96-107.
46. Schlott T, Reimer S, Jahns A, Ohlenbusch A, Ruschenburg I, Nagel H, Droese M. Point mutations and nucleotide insertions in the MDM2 zinc finger structure of human tumours. *The Journal of Pathology*, 1997, 182: 54-61.
47. Freedman DA, Levine AJ. Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Molecular and Cellular Biology*, 1998, 18: 7288-93.
48. Eren E. Hepatoselüler Karsinomda Mdm2 Gen Polimorfizmleri. Biyoteknoloji Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2006.
49. Ito A, Lai CH, Zhao X, Saito S, Hamilton MH, Appella E, Yao TP. p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and

- inhibited by MDM2. *The European Molecular Biology Organization Journal*, 2001, 20: 1331-40.
50. Thut CJ, Goodrich JA, Tjian R. Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes and Development*, 1997, 11: 1974-86.
  51. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 1997, 387: 296-9.
  52. Pauk N, Kubik A, Zatloukal P, Krepela E. Lung cancer in women. *Lung Cancer*, 2005, 48: 1-9.
  53. Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*, 2003, 123: 21S-49S.
  54. Travis WD, Lubin J, Ries L, Devesa S. United States lung carcinoma incidence trends: declining for most histologic types among males, increasing among females. *Cancer*, 1996, 77: 2464-70.
  55. Köktürk N, Öztürk C, Kirişoğlu CE. Sigara ve akciğer kanseri. *Solunum*, 2003, 5: 139-145.
  56. Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*, 1996, 274: 430-2.
  57. Lubin JH, Boice JD, Jr. Lung cancer risk from residential radon: meta-analysis of eight epidemiologic studies. *Journal of the National Cancer Institute*, 1997, 89: 49-57.
  58. Ruano-Ravina A, Figueiras A, Barros-Dios JM. Lung cancer and related risk factors: an update of the literature. *Public Health*, 2003, 117: 149-56.
  59. Bandera EV, Freudenheim JL, Marshall JR, Zielezny M, Priore RL, Brasure J, Baptiste M, Graham S. Diet and alcohol consumption and lung cancer risk in the

- New York State Cohort (United States). *Cancer Causes and Control : CCC*, 1997, 8: 828-40.
60. Heighway J, Thatcher N, Cerny T, Hasleton PS. Genetic predisposition to human lung cancer. *British Journal of Cancer*, 1986, 53: 453-7.
61. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The new World Health Organization classification of lung tumours. *European Respiratory Journal*, 2001, 18: 1059-68.
62. Uçar G. Akciğer Kanserlerinde Siklooksijenaz-2, Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü, Osteopontin ve Human Papilloma Virüsün Prognostik Önemi. Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2007.
63. Uçar Y. Kadınlarda Akciğer Kanseri Genel Özellikler ve Prognostik Faktörler. Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2010.
64. Rami-Porta R, Crowley JJ, Goldstraw P. The revised TNM staging system for lung cancer. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 2009, 15: 4-9.
65. Akkoçlu A. Akciğer kanserlerinde tanı, evreleme ve tedavi öncesi değerlendirme. <http://168.144.121.167/TORAKSFD23NJKL4NJ4H3BG3JH/kisokulu-ppt-pdf/akkoc.pdf>. 21 Aralık 2013.
66. Jimeno A, Rubio-Viqueira B, Amador ML, Oppenheimer D, Bouraoud N, Kulesza P, Sebastiani V, Maitra A, Hidalgo M. Epidermal growth factor receptor dynamics influences response to epidermal growth factor receptor targeted agents. *Cancer Research*, 2005, 65: 3003-10.
67. Xiong HQ, Rosenberg A, LoBuglio A, Schmidt W, Wolff RA, Deutsch J, Needle M, Abbruzzese JL. Cetuximab, a monoclonal antibody targeting the epidermal

- growth factor receptor, in combination with gemcitabine for advanced pancreatic cancer: a multicenter phase II Trial. *Journal of Clinical Oncology*, 2004, 22: 2610-6.
68. Apostolou P, Toloudi M, Chatziioannou M, Ioannou E, Knocke DR, Nester J, Komiotis D, Papasotiriou I. Anvirzel<sup>TM</sup> in combination with cisplatin in breast, colon, lung, prostate, melanoma and pancreatic cancer cell lines. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 2013, 14: 18.
  69. Stordal B, Davey M. Understanding cisplatin resistance using cellular models. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 2007, 59: 696-9.
  70. Mansour HH, Hafez HF, Fahmy NM. Silymarin modulates Cisplatin-induced oxidative stress and hepatotoxicity in rats. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 39: 656-61.
  71. Heinemann V, Wilke H, Mergenthaler HG, Clemens M, König H, Illiger HJ, Arning M, Schalhorn A, Possinger K, Fink U. Gemcitabine and cisplatin in the treatment of advanced or metastatic pancreatic cancer. *Annals of Oncology*, 2000, 11: 1399-403.
  72. Kozuch P, Grossbard ML, Barzdins A, Araneo M, Robin A, Frager D, Homel P, Marino J, DeGregorio P, Bruckner HW. Irinotecan combined with gemcitabine, 5-fluorouracil, leucovorin, and cisplatin (G-FLIP) is an effective and noncrossresistant treatment for chemotherapy refractory metastatic pancreatic cancer. *The Oncologist*, 2001, 6: 488-95.
  73. Reiter RJ. Melatonin: Lowering the high price of free radicals. *News in Physiological Sciences*, 2000, 15: 246-250.
  74. Gök V, A. K, Telli R. Hayvansal ve mikrobiyal kaynaklı doğal antioksidanlar. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergileri*, 2006, 2: 35-40.

75. Gencer M. Çevresel Asbeste Maruz Kalanlarda Oksidatif Stres ve Kollajen Metabolizmasının Değerlendirilmesi Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Şanlıurfa: Harran Üniversitesi, 2011.
76. Lamson DW, Brignall MS. Antioxidants in cancer therapy; their actions and interactions with oncologic therapies. *Alternative Medicine Review* 1999, 4: 304-29.
77. Brzezinski A. Melatonin in humans. *The New England Journal of Medicine*, 1997, 336: 186-95.
78. Özçelik F, Erdem M, Bolu A, Gülsün M. Melatonin: Genel özellikleri ve psikiyatrik bozukluklardaki rolü. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, 2013, 5: 179-203.
79. Lerner AB. Hormones and skin color. *Scientific American*, 1961, 205: 98-108.
80. Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, Ortiz GG, Acuna-Castroviejo D. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *Journal of Pineal Research*, 1995, 18: 1-11.
81. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 2006, 273: 2813-38.
82. Fung BK. Transducin: structure, function, and role in phototransduction. İçinde: Osborne NN, Chader GJ (editörler). *Progress in Retinal Research Vol. 6*, Oxford, England, Pergamon Press, 1987: 151-177.
83. Espino J, Pariente JA, Rodriguez AB. Oxidative stress and immunosenescence: therapeutic effects of melatonin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 2012: 670294.

84. Reiter RJ. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*, 1991, 12: 151-80.
85. Reiter RJ. Neuroendocrine effects of light. *International Journal of Biometeorology*, 1991, 35: 169-75.
86. Axelrod J, Weissbach H. Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*, 1960, 131: 1312.
87. Ravindra T, Lakshmi NK, Ahuja YR. Melatonin in pathogenesis and therapy of cancer. *Indian Journal of Medical Sciences (IJMS)*, 2006, 60: 523-35.
88. Lissoni P, Rovelli F, Malugani F, Bucovec R, Conti A, Maestroni GJ. Anti-angiogenic activity of melatonin in advanced cancer patients. *Neuro Endocrinology Letters*, 2001, 22: 45-7.
89. Tamarkin L, Cohen M, Roselle D, Reichert C, Lippman M, Chabner B. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat. *Cancer Research*, 1981, 41: 4432-6.
90. Lissoni P, Meregalli S, Nosetto L, Barni S, Tancini G, Fossati V, Maestroni G. Increased survival time in brain glioblastomas by a radioneuroendocrine strategy with radiotherapy plus melatonin compared to radiotherapy alone. *Oncology*, 1996, 53: 43-6.
91. Bartsch C, Bartsch H. The anti-tumor activity of pineal melatonin and cancer enhancing life styles in industrialized societies. *Cancer Causes and Control : CCC*, 2006, 17: 559-71.
92. Carlson LE, Campbell TS, Garland SN, Grossman P. Associations among salivary cortisol, melatonin, catecholamines, sleep quality and stress in women with breast cancer and healthy controls. *Journal of Behavioral Medicine*, 2007, 30: 45-58.

93. Jung B, Ahmad N. Melatonin in cancer management: progress and promise. *Cancer Research*, 2006, 66: 9789-93.
94. Hu S, Shen G, Yin S, Xu W, Hu B. Melatonin and tryptophan circadian profiles in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Advances in Therapy*, 2009, 26: 886-92.
95. Yıldırım H. Karbonik Anhidraz 9 Geninin Transkripsiyonel Kontrolünün Moleküler Analizi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Balıkesir: Balıkesir Üniversitesi, 2009.
96. Freshney I. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*. 5. Baskı. New Jersey, John Wiley and Sons, 2005.
97. Kim JH, Jeong SJ, Kim B, Yun SM, Choi do Y, Kim SH. Melatonin synergistically enhances cisplatin-induced apoptosis via the dephosphorylation of ERK/p90 ribosomal S6 kinase/heat shock protein 27 in SK-OV-3 cells. *Journal of Pineal Research*, 2012, 52: 244-52.
98. Spano A, Monaco G, Barni S, Sciola L. Cisplatin treatment of NIH/3T3 cultures induces a form of autophagic death in polyploid cells. *Histology and Histopathology*, 2008, 23: 717-30.
99. Kimura H, Sakai K, Arao T, Shimoyama T, Tamura T, Nishio K. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor. *Cancer Science*, 2007, 98: 1275-80.
100. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 65: 55-63.
101. Huang HL, Hsing HW, Lai TC, Chen YW, Lee TR, Chan HT, Lyu PC, Wu CL, Lu YC, Lin ST, Lin CW, Lai CH, Chang HT, Chou HC, Chan HL. Trypsin-

- induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *Journal of Biomedical Science*, 2010, 17: 36.
102. Kalkan Y, Kapakin KA, Kara A, Atabay T, Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Can I, Yildirim S, Ozkanlar S, Sengul E. Protective effect of Panax ginseng against serum biochemical changes and apoptosis in kidney of rats treated with gentamicin sulphate. *Journal of Molecular Histology*, 2012, 43: 603-13.
  103. Akman S, Canakci V, Kara A, Tozoglu U, Arabaci T, Dagsuyu IM. Therapeutic effects of alpha lipoic acid and vitamin C on alveolar bone resorption after experimental periodontitis in rats: a biochemical, histochemical, and stereologic study. *Journal of Periodontology*, 2013, 84: 666-74.
  104. Emami B, Graham MV. Lung. İçinde: Perez CA, Brady LW (editörler). *Principles and Practice of Radiation Oncology*, 3. Baskı. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1998: 1181-1220.
  105. Shapiro GI, Park JE, Edwards CD, Mao L, Merlo A, Sidransky D, Ewen ME, Rollins BJ. Multiple mechanisms of p16INK4A inactivation in non-small cell lung cancer cell lines. *Cancer Research*, 1995, 55: 6200-9.
  106. Raben D, Helfrich B, Chan DC, Ciardiello F, Zhao L, Franklin W, Baron AE, Zeng C, Johnson TK, Bunn PA, Jr. The effects of cetuximab alone and in combination with radiation and/or chemotherapy in lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 2005, 11: 795-805.
  107. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Research*, 1995, 55: 5187-90.
  108. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 2003, 22: 9030-40.

109. Montero S, Guzman C, Vargas C, Ballestin C, Cortes-Funes H, Colomer R. Prognostic value of cytosolic p53 protein in breast cancer. *Tumor Biology*, 2001, 22: 337-44.
110. Kaabinejadian S, Fouladdel S, Ramezani M, Azizi E. p53 expression in MCF7, T47D and MDA-MB 468 breast cancer cell lines treated with adriamycin using RT-PCR and immunocytochemistry. *Journal of Biological Sciences*, 2008, 8: 380-385.
111. Singh N, Nigam M, Ranjan V, Zaidi D, Garg VK, Sharma S, Chaturvedi R, Shankar R, Kumar S, Sharma R, Mitra K, Balapure AK, Rath SK. Resveratrol as an adjunct therapy in cyclophosphamide-treated MCF-7 cells and breast tumor explants. *Cancer Science*, 2011, 102: 1059-67.
112. Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *American Journal of Pathology*, 1997, 151: 1523-30.
113. Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, Radinsky R, Dinney CP. Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clinical Cancer Research*, 1999, 5: 257-65.
114. Nemunaitis J, Swisher SG, Timmons T, Connors D, Mack M, Doerksen L, Weill D, Wait J, Lawrence DD, Kemp BL, Fossella F, Glisson BS, Hong WK, Khuri FR, Kurie JM, Lee JJ, Lee JS, Nguyen DM, Nesbitt JC, Perez-Soler R, Pisters KM, Putnam JB, Richli WR, Shin DM, Walsh GL, Merritt J, Roth J. Adenovirus-

- mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2000, 18: 609-22.
115. Swisher SG, Roth JA, Nemunaitis J, Lawrence DD, Kemp BL, Carrasco CH, Connors DG, El-Naggar AK, Fossella F, Glisson BS, Hong WK, Khuri FR, Kurie JM, Lee JJ, Lee JS, Mack M, Merritt JA, Nguyen DM, Nesbitt JC, Perez-Soler R, Pisters KM, Putnam JB, Jr., Richli WR, Savin M, Schrump DS, Shin DM, Shulkin A, Walsh GL, Wait J, Weill D, Waugh MK. Adenovirus-mediated p53 gene transfer in advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 1999, 91: 763-71.
  116. Pfister DG, Su YB, Kraus DH, Wolden SL, Lis E, Aliff TB, Zahalsky AJ, Lake S, Needle MN, Shaha AR, Shah JP, Zelefsky MJ. Concurrent cetuximab, cisplatin, and concomitant boost radiotherapy for locoregionally advanced, squamous cell head and neck cancer: a pilot phase II study of a new combined-modality paradigm. *Journal of Clinical Oncology*, 2006, 24: 1072-8.
  117. Kim CH, Yoo YM. Melatonin Induces Apoptotic Cell Death via p53 in LNCaP Cells. *The Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 2010, 14: 365-9.
  118. Piette J, Neel H, Marechal V. Mdm2: keeping p53 under control. *Oncogene*, 1997, 15: 1001-10.
  119. Daujat S, Neel H, Piette J. MDM2: life without p53. *Trends in Genetics*, 2001, 17: 459-64.
  120. Kinyamu HK, Archer TK. Estrogen receptor-dependent proteasomal degradation of the glucocorticoid receptor is coupled to an increase in mdm2 protein expression. *Molecular and Cellular Biology*, 2003, 23: 5867-81.
  121. Cheung AN, Shen DH, Khoo US, Chiu MP, Tin VP, Chung LP, Ngan HY. Immunohistochemical and mutational analysis of p53 tumor suppressor gene in

- gestational trophoblastic disease: correlation with mdm2, proliferation index, and clinicopathologic parameters. *International Journal of Gynecological Cancer*, 1999, 9: 123-130.
122. Pilotti S, Della Torre G, Lavarino C, Di Palma S, Sozzi G, Minoletti F, Rao S, Pasquini G, Azzarelli A, Rilke F, Pierotti MA. Distinct mdm2/p53 expression patterns in liposarcoma subgroups: implications for different pathogenetic mechanisms. *The Journal of Pathology*, 1997, 181: 14-24.
  123. Deng WG, Wu G, Ueda K, Xu K, Roth JA, Ji L. Enhancement of antitumor activity of cisplatin in human lung cancer cells by tumor suppressor FUS1. *Cancer Gene Therapy*, 2008, 15: 29-39.
  124. Kern JA, McLennan G. *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders*. 2. Baskl. New York, Mc Graw-Hill Companies, 1998: 1695-1699.
  125. Waster PK, Ollinger KM. Redox-dependent translocation of p53 to mitochondria or nucleus in human melanocytes after UVA- and UVB-induced apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 2009, 129: 1769-81.
  126. Tan J, Zhuang L, Leong HS, Iyer NG, Liu ET, Yu Q. Pharmacologic modulation of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  promotes p53-dependent apoptosis through a direct Bax-mediated mitochondrial pathway in colorectal cancer cells. *Cancer Research*, 2005, 65: 9012-20.
  127. Muller PA, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nature Cell Biology*, 2013, 15: 2-8.
  128. Mukohara T, Engelman JA, Hanna NH, Yeap BY, Kobayashi S, Lindeman N, Halmos B, Pearlberg J, Tsuchihashi Z, Cantley LC, Tenen DG, Johnson BE, Janne PA. Differential effects of gefitinib and cetuximab on non-small-cell lung

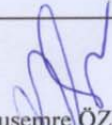
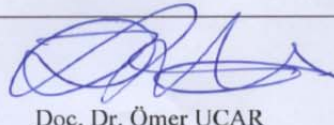
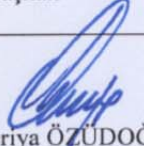
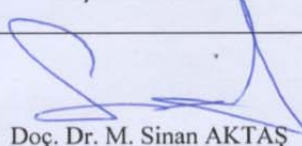
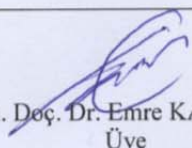
cancers bearing epidermal growth factor receptor mutations. *Journal of the National Cancer Institute*, 2005, 97: 1185-94.

## EKLER

### 1. ÖZGEÇMİŞ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Kişisel Bilgiler</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Adı Soyadı:</b> Cihan GÜR<br><b>Doğum tarihi:</b> 28.06.1989<br><b>Doğum yeri:</b> Bilecik<br><b>Medeni hali:</b> Bekar<br><b>Uyruğu:</b> T.C.<br><b>Adres:</b> Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya<br>Anabilim Dalı, 25240 ERZURUM<br><b>Tel:</b> 0506 371 34 00<br><b>Faks:</b> -<br><b>E-mail:</b> cihan1154@gmail.com |
| <b>Eğitim</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <b>Lise:</b> Ertuğrul Gazi Lisesi (2007)<br><b>Lisans:</b> Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi (2007-2011)<br><b>Yüksek lisans:</b> Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya<br>Anabilim Dalı (2012-2014)                                                                                                                 |
| <b>Yabancı Dil Bilgisi</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| İngilizce: Orta derecede (YDS 68.75, Nisan 2013)                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| <b>Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| <b>İlgi Alanları ve Hobiler</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| -                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

## 2. ETİK KURUL KARARI

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                              |                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <p style="text-align: center;"><b>T.C.</b><br/><b>ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ</b><br/><b>ETİK ALT KURUL BAŞKANLIĞI</b><br/><b>(AÜVFEAK)</b></p> |  |
| <b>ETİK KURUL KARARI</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                              |                                                                                     |
| <b>Karar Sayısı:</b> 2013/12                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                              | <b>Karar Tarihi:</b> 31/12/2013                                                     |
| <p>Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Seçkin Özkanlar ve Yük. Lis. Öğr. Cihan Gür tarafından sunulan “Akciğer Kanseri Hücre Hattında Cetuximab, Cisplatin ve Melatonin Uygulamalarının P53 geni ve Apoptoz Aktivasyonu Üzerine Etkilerinin Araştırılması” adlı teze ait başvuru formu etik kurulumuz tarafından değerlendirilmiştir.</p> <p>Çalışmada akciğer kanser hattı (A549) pasajlanarak çoğaltması sağlanacak ve bu hücreler üzerine cetuximab, cisplatin ve melatonin’in kombine kullanımlarının sitotoksik olarak P53 geni ve apoptoz aktivasyonu üzerine etkileri araştırılacaktır.</p> <p>Sunulan tez çalışmasının Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi ilkelerine uygun olduğuna karar verilmiştir.</p> |                                                                                                                                                              |                                                                                     |
| <br>Prof. Dr. Yunusemre ÖZKANLAR<br>Başkan                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <br>Doç. Dr. Ömer UÇAR<br>Başkan Yardımcısı                              |                                                                                     |
| <br>Doç. Dr. Zekeriya ÖZÜDOĞRU<br>Üye                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <br>Doç. Dr. M. Sinan AKTAŞ<br>Üye                                       |                                                                                     |
| <br>Yrd. Doç. Dr. Emre KARAKUŞ<br>Üye                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                              |                                                                                     |