Seranib-2'nin Akciğer Kanseri Hücre Dizileri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

Merve Yıldız

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mayıs 2016

Determination of Cytotoxic and Apoptotic Effects of Ceranib-2 on Lung Cancer Cell Lines

Merve Yıldız

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

May 2016

Seranib-2'nin Akciğer Kanseri Hücre Dizileri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

Merve Yıldız

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Moleküler Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Ayşe Pınar ÖZTOPCU VATAN

"Bu Tez TÜBİTAK tarafından "214Z159" no'lu proje çerçevesinde desteklenmiştir."

Mayıs 2016

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Merve Yıldız'ın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Seranib-2'nin Akciğer Kanseri Hücre Dizileri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek oybirliği ile kabul edilmiştir.

Danışman **:** Doç. Dr. Ayşe Pınar Öztopcu Vatan

İkinci Danışman **: -**

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Ayşe Pınar Öztopcu Vatan

Üye : Doç. Dr. Müge Aydın Sayitoğlu

Üye : Doç. Dr. Mustafa Uyanoğlu

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hürriyet ERŞAHAN
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Doç. Dr. Ayşe Pınar Öztopcu Vatan danışmanlığında hazırlamış olduğum "Seranib-2'nin Akciğer Kanseri Hücre Dizileri Üzerindeki Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi" başlıklı YÜKSEK LİSANS tezimin özgün bir çalışma olduğunu; tez çalışmamın tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; tezimde verdiğim bilgileri, verileri akademik ve bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olarak elde ettiğimi; tez çalışmamda yararlandığım eserlerin tümüne atıf yaptığımı ve kaynak gösterdiğimi ve bilgi, belge ve sonuçları bilimsel etik ilke ve kurallara göre sunduğumu beyan ederim. 20/05/2016

Merve Yıldız

İmza

ÖZET

Kanser hücrelerinde sfingolipid metabolizmasının ikincil habercilerinden olan seramid molekülünün miktarındaki artışın hücre bölünmesini durdurduğu ve apoptozun indüklenmesinde rol oynadığı daha önce yapılan çalışmalarla farklı hücre hatlarında gösterilmiştir. Seranib-2 seramidaz enzim inhibitörü olarak sentezlenen hücrede seramid miktarında artışa neden olan bir ajandır.

Çalışmada ilk olarak seranib-2'nin ve pozitif kontrol olarak seçilen karboplatinin 1, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 µM dozlarının hücre çoğalması üzerindeki etkileri MTT yöntemiyle araştırılmıştır. Seranib-2'nin A549 hücrelerinde 24 ve 48 saatteki IC_{50} değerleri sırasıyla, 22 ve 18 µM; H460 hücrelerinde ise 8 ve 3 µM olarak hesaplanmıştır. Karboplatinin ise sadece H460 hücrelerinde 48 saatlik uygulamasında IC_{50} değeri 55 µM olarak hesaplanmıştır. Ardından her iki hücre hattında da seranib-2 ve karboplatin dozları 1:1 oranında kombine olarak uygulanmıştır. A549 hücrelerinde 24 saatte tüm dozlarda antogonistik etki, 48 saatte 1 ve 5 µM dozları dışında kalan diğer dozlarda sinerjistik etki görülmüştür. H460 hücrelerinde ise 24 saatte 10 ve 25 µM dozlarında sinerjistik etki görülürken, diğer dozlarda ve 48 saat uygulamalarında antogonistik etki gözlenmiştir. Seçilen seranib-2 dozlarının her iki hücrede DNA fragmentasyonunu arttığı, apoptotik fragmentasyonun nekrotik olana kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir. H460 hücrelerinde seramidaz enzimin doza bağlı olarak seranib-2 tarafından baskılandığı ELISA yöntemiyle belirlenmiştir. Son olarak seçilen seranib-2 dozlarının her iki hücre hattında da apoptotik süreçle ilgili *CASP3, CASP9* ve *BAX* genlerinin ifadesini artırırken, *BCL-2* geninin ifadesini azalttığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak; seranib-2 dozlarının KHDAK hücre hatlarında hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak azalttığı ve apoptozu indüklediği, karboplatin ile birlikte kombine denendiğinde oluşturduğu antagonistik/sinerjistik etkileşim ilk kez tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Seranib-2, seramidaz inhibitörleri, sitotoksisite, apoptoz, kombine tedavi.

SUMMARY

The increasing amount of ceramide, the secondary messenger molecule of sphingolipid metabolism, has been shown to play role in stopping cell division and inducing apoptosis in cancer cell lines by various studies. Ceranib-2 is an inhibitory agent which inhibits ceramidase activation and causes an increase in the amount of ceramide in cells.

In our research, first we investigated the antiproliferative effects of 1, 5, 10, 25, 50, 75 and 100 μM doses of ceranib-2 and carboplatin which is choosen as a positive control by MTT assay. The IC_{50} values of ceranib-2 for 24 and 48 h are; 22 and 18 μM on A549 cells respectively, 8 and 3 μM on H460 cells respectively. However carboplatin has an inhibitory effect (IC_{50}= 55 μM) only on H460 cells by 48 h application. Then both compound were applied in 1:1 ratio for each drug doses as combination on both cell lines. In combination therapy, antagonistic effect at all doses in 24 h, synergistic effect at all doses except 1 and 5 μM for 48 h was observed in A549 cells. In H460 cells, synergism only at 10 and 25 μM for 24 h and antagonism for the rest of dose applications was observed for 24 and 48 h. Selected ceranib-2 doses have increased DNA fragmentation on both cell lines, apoptotic was greater than necrotic fragmentation. The inhibition of ceramidase enzyme activity by ceranib-2 in H460 cells was determined by ELISA assay. Finally, it is observed that the expression of apoptotic process related genes; *CASP3, CASP9* and *BAX* were increased while *BCL-2* was reduced by selected doses of ceranib-2 in both cell lines.

As a result, the inhibition effects on cell viability and apoptosis of ceranib-2 doses in a dose and time depended manner in NSCLC cell lines was determined for the first time. Also the antagonistic/synergistic interactions by combination with carboplatin were identified for the first time.

Keywords: Ceranib-2, ceramidase inhibitors, cytotoxicity, apoptosis, combined therapy.

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bana her türlü destek olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. A. Pınar ÖZTOPCU VATAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmalarımda ve eğitim alanında kendimi geliştirmemde büyük katkıları olan sayın Prof. Dr. Mustafa YAMAÇ, Prof. Dr. Selda KABADERE, Doç. Dr. Müge AYDIN SAYİTOĞLU, Doç. Dr. Mustafa UYANOĞLU, Doç. Dr. İlknur DAĞ, ve beni yetiştiren bölümümün tüm hocalarına teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda 214Z159 nolu projeyle gereken finansal desteği sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)' a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, iyi ve kötü her anımda beni destekleyen ve değerli fikirlerini benimle paylaşan sevgili arkadaşım Fulya PAK'a teşekkür ederim.

Son olarak tüm hayatım boyunca bana her türlü maddi ve manevi desteği sağlayan, yaşamımın her anında sevgilerini benden hiç eksik etmeyen babam İsmail YILDIZ, annem Nihal YILDIZ, dedem Hüseyin KESGİN, kardeşlerim Fatma Meltem YILDIZ, Ali Osman YILDIZ ve nişanlım Güntaç ÖZER'e teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **vi**
SUMMARY ..... **vii**
TEŞEKKÜR ..... **viii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xi**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **xii**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **xiv**
1. GİRİŞ ve AMAÇ **1**
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI **3**
2.1. Hücre Ölümü 3
2.1.1. Nekroz 3
2.1.2. Apoptoz 4
2.1.2.1. Hücre ölüm reseptörleri 5
2.1.2.2. Kaspazlar 6
2.1.2.3. Bcl-2 gen ailesi 7
2.1.2.4. Hücre içi kalsiyum miktarı artışı 7
2.1.2.5. Endoplazmik retikulum stresi 8
2.1.3. Apoptoz Mekanizmaları 8
2.1.3.1. Mitokondri aracılı apoptoz 8
2.1.3.2. Ölüm reseptörü aracılı apoptoz 9
2.1.4. Otofaji 9
2.2. Kanser İle İlgili Genel Bilgiler 10
2.3. Akciğer Kanseri 11
2.3.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri 11
2.3.1.1. Adenokarsinom 12
2.3.1.2. Büyük Hücreli Akciğer Karsinomu 12
2.3.1.3. Skuamöz Hücreli Karsinom 12
2.4. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Tedavisi 12
2.5. Sfingolipid Metabolizması 13
2.6. Seramid Molekülünün Yapısı ve Metabolizması 14
2.7. Biyoaktif Sfingolipidlerin Kanser Tedavisinde Hedeflenmesi 17
2.7.1. Seramid 17
2.7.2. Seramidaz Enzimi İnhibitörleri 18

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.7.3. Seramidaz Enzimi İnhibitörü Seranib-2 19
3.MATERYAL VE YÖNTEM 21
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar 21
3.2. Hücrelerin Temini ve Çoğaltılması 22
3.3. Hücre Ekimi ve İlaç Dozlarının Uygulanması 22
3.4. Hücre Morfolojilerinin Ters Işık Mikroskobunda Görüntülenmesi 24
3.5. Seranib-2'nin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi 24
3.6. Karboplatinin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi 25
3.7. Seranib-2 ve Karboplatin Dozlarının Kombine Olarak Uygulanması 25
3.8. Apoptotik ve Nekrotik DNA Fragmentasyonunun ELISA Yöntemi İle Belirlenmesi 26
3.9. Asit seramidaz aktivitesi ölçümü 27
3.10. Seranib-2'nin *CASP3, CASP9, BAX ve BCL-2* Genlerinin İfadesi Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi 28
3.10.1. RNA izolasyonu 29
3.10.2. cDNA sentezi 29
3.10.3. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile gen ekspresyonlarının belirlenmesi 30
4.BULGULAR VE TARTIŞMA 32
4.1. Seranib-2'nin A549 ve H460 Hücre Hatlarında Hücre Morfolojisi Üzerine Etkilerinin Ters Işık Mikroskobunda Görüntülenmesi 32
4.2. Seranib-2'nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi 37
4.3. Karboplatinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi 39
4.4. Karboplatin ve Seranib-2'nin Kombine Olarak Uygulanması Sonucu Oluşan Antagonistik/Sinerjistik Etkinin Belirlenmesi 41
4.5. Apoptotik ve Nekrotik DNA Fragmentasyonunun Kantitatif Olarak ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi 45
4.6. Seranib-2'nin Asit Seramidaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin ELISA yöntemiyle Belirlenmesi 48
4.7. Seranib-2'nin *CASP3, CASP9, BAX ve BCL-2* Genlerinin İfadesi Üzerindeki Etkisinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi İle Belirlenmesi 49
5.SONUÇ VE ÖNERİLER 52
KAYNAKLAR DİZİNİ 54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

2.1. Apoptoza uğrayan hücrede görülen morfolojik değişiklikler 5
2.2. Hücre ölüm reseptörleri ve hücre içi stres kaynaklı apoptozun şematik gösterimi 6
2.3. Sfingolipidlerin genel yapısı 13
2.4. Seramid/Sfingozin-1-fosfat Dengesi. 14
2.5. Sfingolipid metabolizması 16
2.6. Seranib-2'nin kimyasal yapısı 19
4.1. 24 saat süre ile uygulanan seranib-2 dozlarının A549 hücre hattındaki morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. 33
4.2. A549 hücre hattına 48 saat süre ile uygulanan seranib-2 dozlarının morfolojik etkilerinin görüntülenmesi. 34
4.3. H460 hücre hattında seçilen seranib-2 dozlarının 24 saat süreyle uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimler. 35
4.4. H460 hücre hattında seçilen seranib-2 dozlarının 48 saat süreyle uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimler. 36
4. 5. Seranib-2 dozları ile 24-48 saat süre ile muamele edilen A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi 37
4.6. Seranib-2 dozları ile 24-48 saat süre ile muamele edilen H460 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi 38
4.7. Karboplatin dozları ile 24-48 saat süre ile muamele edilen A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi.. 40
4.8. Karboplatin dozları ile 24-48 saat süre ile muamele edilen A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi 41
4.9. A549 hücrelerinde 24 ve 48 saatsüre ile uygulanan kombine tedavinin sitotoksik etkisinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi 42
4.10. A549 hücre hattında seranib-2, karboplatin ve kombine (seranib-2+karboplatin) tedavi uygulamalarının 24 ve 48 saatlik hücre sağkalımı oranları 43
4.11. H460 hücrelerinde 24 ve 48 saat süre ile uygulanan kombine tedavinin sitotoksik etkisinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi. 44
4.12. H460 hücre hattında seranib-2, karboplatin ve kombine (seranib-2+karboplatin) tedavi uygulamalarının 24 ve 48 saatlik hücre sağ kalımı oranları 45
4.13. Seranib-2 dozları ile 24 saat süre ile muamele edilen A549 hücrelerinde oluşan apoptotik ve nekrotik DNA fragmentasyon oranları. 46
4.14. Seranib-2 dozları ile 24 saat süre ile muamele edilen H460 hücrelerinde oluşan apoptotik ve nekrotik DNA fragmentasyon oranları 47

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

4.15. H460 hücre hattında denenen seranib-2 dozlarının asit seramidaz aktivitesi üzerindeki değişimlerinin değerlendirilmesi. 48

4.16. A549 hücrelerinde seranib-2 uygulanması sonucu doza bağlı olarak *CASP3*, *CASP9, BAX* ve *BCL-2* genlerinin mRNA ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi 50

4.17. H460 hücrelerinde seranib-2 uygulanması sonucu doza bağlı olarak *CASP3, CASP9, BAX ve BCL-2* genlerinin mRNA ifade düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi 51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge **Sayfa**

3. 1. Deneylerde kullanılan kimyasal malzemeler 21
3. 2. Seranib-2 ve doz grupları 23
3. 3. Karboplatin doz grupları 24
3. 4. cDNA reaksiyon karışımı bileşenleri 30
3. 5. cDNA sentezi protokolü 30
3. 6. Çalışmada kullanılan primer dizileri 31
3. 7. Gerçek zamanlı PZR yöntemi protokolü 31

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
˚C	Santigrat derece (Celcius degree)
µL	mikrolitre (10^{-6}litre)
µm	mikrometre (10^{-6} metre)
µM	mikromolar (10^{-6} molar)
cm^2	santimetrekare
dk	dakika
g	gram
mL	mililitre (10^{-3} litre)
mM	milimolar (10^{-3} molar)
nm	nanometre

Kısaltmalar	Açıklama
5RP7	H-Ras geniyle transforme edilmiş rat fibroblast hücre dizisi
A20	B lenfoma hücre dizisi
A549	İnsan akciğer adenokarsinomu hücre dizisi
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit)
AIF	Apoptoz indükleyici faktör
ANOVA	Tek yönlü varyans analizi
ASAH 1	N-Açilsfingozin Amidohidrolaz 1
Bax	Bcl-2 ile bağlantılı x proteini
Bcl-2	B hücre lenfoma-2
Ca^{++}	Kalsiyum iyonu
CAD	Kaspaz ile aktifleşen DNaz
CERT	Seramid transfer proteini
DED	Reseptör moleküllerle ilişki kuran efektör ölüm domaini
DISC	Ölümü tetikleyen sinyal kompleksi
DMEM	Dulbecco’s modified eagle’s medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklama
DTT	Dithiothreitol
DU145	İnsan prostat kanseri hücre dizisi
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ER	Endoplazmik retikulum
FBS	Fetal dana serumu (Fetal bovine serum)
H1299	İnsan akciğer epitelyal karsinomu hücre dizisi
H460	İnsan büyük hücreli akciğer karsinomu
HBSS	Hank'ın dengelenmiş tuz solüsyonu (Hank's Balance Salt Solution)
IC_{50}	Hücrelerin %50'sini öldüren inhibitör konsantrasyon
IAF	İnhibitör apoptoz faktörü
ICAD	Kaspaz ile aktifleşen DNaz inhibitörü
JB6	Fare epidermal tümör
KHDAK	Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
L929	Fare fibroblast hücre dizisi
LNCaP	İnsan prostat karsinom hücre dizisi
MCF-7	meme kanseri adenokarsinomu hücre dizisi
MDA-MB-231	meme epitelyal adenokarsinoma hücre dizisi
MEF	Fare embriyonik fibroblast hücreleri
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium bromid
$NaHCO_3$	Sodyum bikarbonat
NIH/3T3	Fare embriyonik fibroblast hücre dizisi
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (Fosfat buffer saline)
RAW 264.7	Fare makrofaj hücre dizisi
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPM	Dakikadaki devir sayısı
RT-PZR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
S1P	Sfingozin-1-fosfat
SKOV3	İnsan ovaryum kanseri hücre dizisi
Smac	İkincil mitokondri aracılı kaspaz aktivatörü

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar	Açıklama
SPT	Serin palmitol transferaz
TMB	3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine
TNF	Tümör nekroz faktör
UPR	Katlanmamış protein cevabı
vd.	ve diğerleri

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, mutasyona uğrayan bir hücrenin hücre ölümünden kaçarak kontrolsüz olarak çoğalması sonucu görülen metabolik bir hastalıktır (Ponder, 2001). Pek çok hücre oluşan bu mutasyonlar sonucu kanserleşme eğilimindedir. Bu nedenle çok farklı kanser çeşitleri oluşabilmektedir. Kanserle ilişkili ölümlerde akciğer kanseri, ilk sıralarda yer almaktadır (Spiro ve Porter, 2002). Akciğer kanserinin iki farklı çeşidi bulunmaktadır. Bunlar; küçük hücreli ve küçük hücreli dışı akciğer kanserleridir. Akciğer kanserlerinin yaklaşık %80'ini küçük hücreli dışı akciğer kanseri oluşturmaktadır (KHDAK) (Siegel vd., 2014). KHDAK hızlı bir şekilde çoğaldığı için çoğunlukla geç evrelerde teşhis edilmektedir (Dela Cruz vd., 2011). Tedavi için en iyi seçenek cerrahi müdahaledir fakat hastalığın ilerlemiş evrelerinde ve metastatik akciğer kanserli hastalarda cerrahi müdahale uygun değildir. Bu nedenle, hastalara yaygın olarak kemoterapi ve radyoterapi uygulanmaktadır. Kemoterapide kullanılan ilaçların çeşitli yan etkilerinin olması ve hücrelerin bu ilaçlara karşı direnç geliştirmesi hastalığın etkili bir şekilde tedavi edilmesini zorlaştırmaktadır (Eldridge, 2013). Tüm bu sebeplerden dolayı günümüzde halen akciğer kanserinin tedavisi için etkili yeni kemoterapötik ilaçların bulunmasına ve geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Sfingolipid metabolizmasında ikinci haberci olarak görev yapan seramid ve sfingozin-1 fosfatın (S1P) hücrelerde hücre döngüsü ve apoptoz üzerindeki karşılıklı etkileşimleri belirlenmiştir. Seramid molekülünün hücre ölümünü tetiklerken, S1P'ın ise hücre sağ-kalımını ve apoptozdan kaçışı sağladığı gözlenmiştir. Bu sebeple bu iki molekülün kanserli hücrelerin çoğalması üzerindeki etkilerinin araştırılması gündeme gelmiştir (Pettus vd., 2002). Yapılan çalışmalarda kanserleşen hücrelerdeki seramidaz enzimi aktivasyonunun artışı; seramid düzeyini azaltırken, S1P düzeyini arttırdığı belirlenmiştir. Bu nedenle hücre içi seramidaz enziminin düzeyi, seramid ve S1P dengesinin korunması açısından kanser tedavisinde oldukça önemli bir yer tutmaktadır (Obeid vd., 1993). Bu nedenle yapılan araştırmalarda kanserli hücrelerdeki seramidaz enzimini baskılayabilmek için çeşitli inhibitör moleküller kullanılmış ve olumlu sonuçlar alındığı tespit edilmiştir. Günümüzde yeni seramidaz enzimi inhibitörü moleküllerin arayışı sürmektedir.

Bu çalışmada, iki farklı KHDAK hücre dizilerinde seramidaz enzim inhibitörü olan seranib-2'nin doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı, ölümü ve gen ifadesi üzerindeki etkileri ilk kez araştırılmıştır. Ayrıca akciğer kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta olan karboplatin ile birlikte kombine verilerek hücre çoğalması üzerindeki antagonistik/sinerjistik etkileri araştırılmış ve bu sayede seranib-2'nin akciğer kanserinin tedavisi için geliştirilebilir ve/veya uygulanabilir bir ilaç olması hakkında ilk temel bilgiler elde edilmeye çalışılmıştır.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1. Hücre Ölümü

İnsan vücudunda embriyonik ve fetal gelişim sürecinde hücreler hızla bölünerek çeşitli doku ve organları oluşturmaktadır. Bu süreçte homeostazın sağlanabilmesi için bazı hücrelerin ölmesi gerekmektedir (Hengartner, 2000). Bununla beraber hücreler çeşitli sebeplerden dolayı mutasyonlara uğrayabilirler. Bu hücrelerin de kanserleşme sürecine girmemeleri için ölmeleri gerekmektedir. Hücresel dengenin korunması ve hasarlı hücrelerin organizma tarafından yok edilmesi sürecine "hücre ölümü" denilmektedir (Yıldırım vd., 2007; Altunkaynak ve Özbek, 2008). Hücre ölüm yolaklarındaki bozukluklar, hücrelerin ölümden kaçmasına ve sonuçta kanserleşmeye yol açmaktadır (Blank ve Shiloh 2007). Genel olarak morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal olarak ele alındığında farklı sebeplerle ortaya çıkabilen ve birbirinden farklı mekanizmalara sahip olan üç farklı hücre ölümü şekli bilinmektedir. Bunlar; nekroz, apoptoz ve otofaji olarak isimlendirilmektedir (Kroemer vd., 2009).

2.1.1. Nekroz

Nekroz genellikle enfeksiyon, inflamasyon ya da iskemi gibi patofizyolojik olayların bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Nekrozun en belirgin özellikleri; hücresel enerjinin tükenmesi, hücre membranının şişmesi ve parçalanması, membran lipitlerinin hasar görmesi, homeostatik iyon pompaları/kanallarının fonksiyonlarındaki kayıp ve apoptotik olmayan proteazların aktivasyonu olarak tanımlanmaktaır (Blank ve Shiloh, 2007). Hücresel içeriklerin ve öncül inflamatuvar moleküllerin hücreler arası boşluğa salınması sonucu inflamasyon yanıtın başlaması nekrozu diğer ölüm tiplerinden ayıran en belirgin özeliğidir (Jin ve El-Deiry, 2005).

Son yıllarda bazı nekrotik hücre ölümü formlarının programlanmış olabileceği gündeme gelmiştir. Yapılan bir çalışmada kaspaz inhibitörleri varlığında indüklenen TNF-α aracılığıyla oluşan hücre ölümü programlanmış nekroz olarak tanımlanmıştır (Zhang vd., 2009). Bir başka çalışmada ise kaspaz inhibitörlerinden bağımsız olarak

hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile programlı nekrozun tetiklendiği bildirilmiştir (Ardestani vd., 2013).

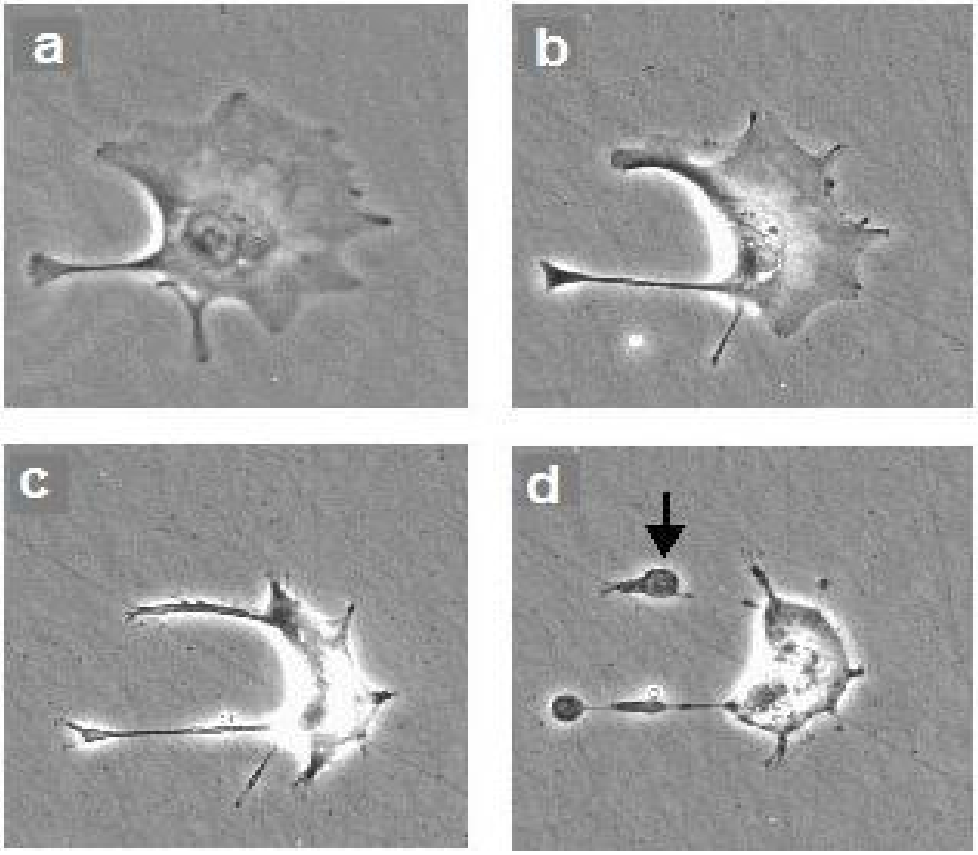
2.1.2. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında hücrelerde normal gelişim sırasında görülen programlanmış hücre ölümünü tanımlamak için kullanılmıştır (Kerr vd., 1972). Çok hücreli organizmaların gelişiminde ve sağlıklı genoma sahip hücre popülasyonunun devamlılığında rol oynayan önemli bir süreçtir (Gewies, 2003). Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizmadır (Altunkaynak ve Özbek, 2008). Apoptoz sürecinin hücrede; büyüme ve bölünme sinyalleri, tamiri mümkün olmayan hasarlar, miktarı artan reaktif oksijen türevleri gibi hücre içi sinyaller ve sitotoksik ajanlar, bazı kimyasallar ve iyonize radyasyon gibi hücre dışı sinyaller ile tetiklendiği bilinmektedir (Formigli vd., 2000; Debnath vd., 2005).

Apoptotik süreçte hücrelerde birtakım morfolojik ve kimyasal değişimler gözlenmektedir. Apoptoz uyarısı alan hücre bulunduğu ortamdan uzaklaşır, komşu hücrelerle bağlantısını koparır ve büzüşür, kromatini yoğunlaşır. DNA nukleozomlarından kesilir jel elektroforezinde tipik merdiven bant görünümü alır. Ancak hücre organelleri yapısal bütünlüklerini korur. Hücre zarı yapısında bulunan fosfotidil serin hücre zarının iç yüzünden dış yüzüne transloke olur (Ellis vd., 1991). Çekirdek küçülür, parçalara ayrılır. Hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde kopar, apoptotik cisimciklere ayrılır (Şekil 2.1). Apoptotik cisimcikler makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir, ancak inflamasyon görülmez. (Elmore, 2007).

Apoptozun düzenlenmesindeki defektler kansere yol açabilmektedir. Tümör hücreleri sıklıkla normal apoptotik sinyallere karşı direnç geliştirerek kontrolsüz büyüme eğilimindedir (Ashkenazi ve Dixit, 1998). Kanser hücrelerinde apoptoza karşı direnç gelişmesinde iki temel mekanizma rol oynamaktadır. Birincisi, mutasyonlar ve pro-apoptotik moleküllerin ekspresyonundaki kayıp, ikincisi de apoptoz inhibe edici moleküllerin aşırı ekspresyonudur (Freedman vd., 2004). Tümör hücreleri ile mücadelede

pro-apoptotik sinyallerin aktivasyonu ya da anti-apoptotik sinyallerin inhibisyonu kanser tedavisi için en kritik hedeflerdir (Foster, 2008).



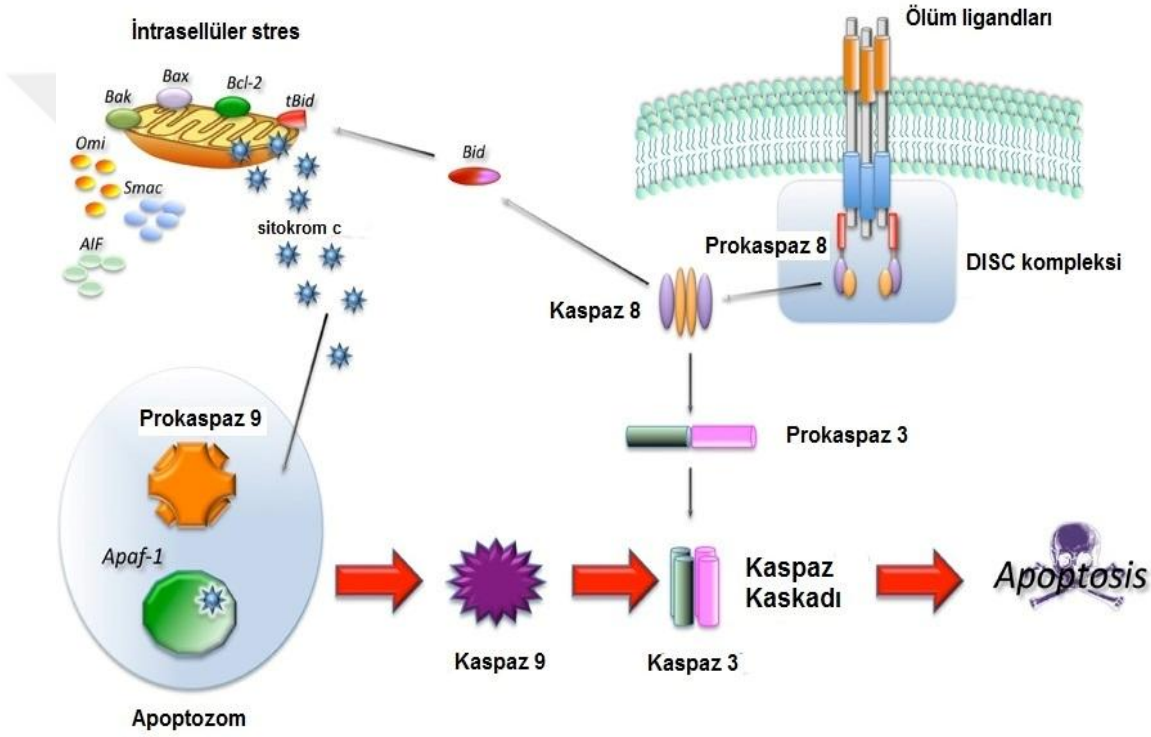
Şekil 2.1. Apoptoza uğrayan hücrede görülen morfolojik değişiklikler; a: çekirdekte kromatin yıkımı sonucu nükleer yoğunlaşma meydana gelir b: apoptotik hücrenin "at nalı" şeklinde bir görünümü olur ve hücre büzülmeye devam eder, c: hücre makrofajlar tarafından fagosite edilebilmek için hacmini küçültür, d: hücre membranında kabarcıklanmalar gözlenir, (→ : apoptotik cisimcikler) (Gültekin vd., 2008).

Apoptoz oldukça karmaşık bir süreçtir ve farklı sinyal mekanizmaları ile düzenlenmektedir. Genel olarak apoptozun düzenlenmesinde; hücre ölüm reseptörleri, kaspazlar, Bcl-2 ailesi, kalsiyum (Ca^{++}) iyon konsantrasyonu değişimi ve endoplazmik retikulum stresi rol almaktadır (Igney ve Krammer, 2002).

2.1.2.1. Hücre ölüm reseptörleri

Bu güne kadar hücre yüzeyinde Fas, TNF, DR4, DR5 ya da TRAIL gibi isimler alan farklı pek çok ölüm reseptörleri belirlenmiştir. Apoptotik sinyal geldiğinde bu ölüm

reseptörlerinin kendilerine özgü ligandları ile etkileşime girerek apoptotik süreci başlattıkları belirlenmiştir (Curtin ve Cotter, 2003). Oluşan reseptör-ligand kompleksi ölüm bölgeleri (death domain) ile etkileşime girerek ölüme sebep olan sinyal kompleksini (death- inducing signalling complex: DISC) oluşturur. Bu sinyal kompleksinin oluşması, inaktif halde bulunan prokaspaz 8'in aktif hale geçmesine neden olur. Kaspaz 8; ya direk prokaspaz 3'ü aktive ederek ya da Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bid'i aktifleştirerek mitokondri üzerinden apoptozu başlatır (Hung ve Chow, 2004) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Hücre ölüm reseptörleri ve hücre içi stres kaynaklı apoptozun şematik gösterimi (Favaloro vd., 2012).

2.1.2.2. Kaspazlar

Kaspazlar, hücre içinde prokaspazlar olarak isimlendirilen inaktif halde bulunan sistein aspartat spesifik proteazlardır. Aktif merkezlerinde sistein aminoasidi taşırlar ve hedefledikleri proteinleri aspartik asit birimlerinden kestikleri için kaspaz ismini almışlardır. Bugün bilinen memelilerde 14 tane kaspaz tanımlanmştır (Gewies, 2003). Tüm kaspazlar hücre içinde inakif olarak bulunurlar ve proteolitik işlemlerle kırılarak

aktif hale geçmektedirler. Fonksiyonlarına bağlı olarak, kaspazlar 3 grupta sınıflandırılabilirler:

1. İnflamatuar kaspazlar: İnflamasyon için gerekli olan kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -13 ve -14'ü içerir.

2. Başlatıcı kaspazlar: Apoptoz mekanizmasını başlatan bu enzimler, reseptör moleküllerle ilişki kuran efektör ölüm domaini (DED) (kaspaz-8 ve -10) ya da alıcı (CARD) (kaspaz -2, -9) prodomainlerine sahiptir.

3. Efektör kaspazlar: Bu sınıf yıkıcı kaspazları içerir (kaspaz-3, -6, -7). Tipik olarak çeşitli hücresel substratların yarılmasıyla apoptozun infaz aşamasında rol oynarlar ve kendilerinden bir önceki kaspazlar tarafından aktive edilerek çalışırlar (Degretev vd., 2003).

Kaspazlar aktifleştiklerinde DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inhibe ederler. Ayrıca nükleaz inhibitörlerini inaktif hale getirerek ve DNA'da fragmantasyona neden olurlar (Adrain ve Martin, 2001).

2.1.2.3. Bcl-2 gen ailesi

Bcl-2 gen ailesi pro-apoptotik (apoptozu indükleyici, Bad, Bax, Bid, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa) ve anti-apoptotik (apoptozu baskılayıcı, Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1) üyelerden oluşmaktadır. (Adrain ve Martin, 2001). Pro-apoptotik proteinler sitozolde yer alırlar. Sitokrom-c ve apoptoz indükleyici faktör (AIF) salınımını artırarak apoptozu indüklerler. Anti-apoptotik proteinler ise mitokondri dış membranında, endoplazmik retikulumda ve çekirdek zarında yer alırlar. Por oluşumunu sağlayıp iyon transportunu düzenlerler. Özellikle hücredeki kalsiyum iyon konsantrasyonu oranını kontrol ederler. Ayrıca kaspazların öncü formlarıyla sitokrom-c ve AIF salınımını bloke ederek apoptozu inhibe edebilirler (Adams ve Corry, 2001).

2.1.2.4. Hücre içi kalsiyum miktarı artışı

Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan Ca^{++} iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apoptoza götürmektedir. Sitoplazmada artan kalsiyum inaktif durumdaki

kalpain gibi kalsiyum bağımlı proteazları ve nükleazları aktifleştirerek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptoza özgü DNA kırıklarına neden olduğu belirlenmiştir (Gerschenson ve Rotello, 1993).

2.1.2.5. Endoplazmik retikulum stresi

Endoplazmik retikulum (ER) hücrelerde salgı proteinlerinin sentez, katlanma ve olgunlaşma işlevlerinin gerçekleştiği yerdir ve çoğu hücresel aktiviteler için gereklidir. Proteinlerin katlanmasının bozulması durumunda ER strese girer ve katlanmamış protein cevabı (UPR) olarak adlandırılan sinyal yolunu indükler. UPR katlanmamış proteinlerin birikimini azaltmak için cevap oluşturur ve ER işlevlerini düzenlemektedir. Fakat yine de adaptasyon sağlanamazsa ve protein birikimi devam ederse çevre dokuya zarar vermemek için hücre apoptoza yönlendirilir (Seydel ve Aksoy, 2012). ER stresi sonucunda gerçekleşen apoptoz iki yolla aktive olur. Birincisinde; ER membranında Bcl-2'ye bağlı olarak inaktif halde bulunan Bax ve Bak, ER stresi oluştuğunda konformasyonel değişikliklere ve oligomerizasyona uğrayarak ER membranında por oluşumuna neden olur. Bu da ER'den stoplazmaya kalsiyumun salınmasına yol açmaktadır. Sitozolde kalsiyum konsantrasyonunun artması kalpaini aktive etmektedir ve kalpain de prokaspaz-12'yi keser ve aktive eder. Aktive olan kaspaz-12 'de prokaspaz-9'u aktive ederek kaspaz kaskadı aktifleşir. Diğer apoptoz aktivasyon süreci mitokondri tarafından sitozolik kalsiyumun alınmasıyla başlar. Bu da mitokondriyal iç membran depolarizasyonuna ve sitokrom-c salınımına yol açar. Böylelikle kaspaz-9 aktive edilerek apoptotik süreç başlar (Lai vd., 2007).

2.1.3. Apoptoz mekanizmaları

Hücreler, hücre içi ölüm sinyalleri ile mitokondri aracılı ve hücre dışı ölüm sinyalleri ile ölüm reseptörü aracılı olarak apoptoza gidebilmektedir.

2.1.3.1. Mitokondri aracılı apoptoz

Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alınmasından sonra pro-apoptotik proteinlerden Bid; anti-apoptotik Bcl-2 proteinini inaktive eder. Böylelikle Bax ve Bak

aktifleşir ve mitokondri membranında por oluşumu indüklenerek membran geçirgenliğini artırır. Porlardan sitokrom-c, Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endo-G (Endonukleaz-G), Ca^{++} ve AIF salınımı gerçekleşir. Smac, kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu engelleyen inhibitör apoptotik faktörü (IAF) inhibe eder ve apoptozu hızlandırır (Hung ve Chow, 2004). Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, apoptotik proteaz aktive eden faktörün (Apaf-1) ATP kullanımıyla birleşmesi sonucunda sitozolde apoptozom denen bir kompleks oluşturur. Apoptozom kaspaz-9'u aktifleştirir. Kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de kaspaz ile aktifleşen DNase enziminin inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirerek kaspaz ile aktifleşen DNase'ı (CAD) serbest hale getirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın fragmante olmasına neden olur. AIF, çekirdeğe transloke olur ve parçalara ayırır. ENDO-G de DNA'yı parçalar (Palmer vd., 2000).

2.1.3.2. Ölüm reseptörü aracılı apoptoz

Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (Fas, TNFR, DR5) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF-alfa, TRAIL) bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Bu şekilde trimerik yapı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek death inducing singnaling complex (DISC) adı verilen yapıyı oluşturur (Adrain ve Martin, 2001). Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8 aktif hale gelir. Aktif kaspaz-8 doğrudan ve dolaylı olmak üzere 2 yolla kaspaz-3'ü aktive eder. Ya direkt kapsaz-8 kaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid'i aktifleştirerek dolaylı olarak mitokondriyal ölüm yolunda kaspaz-9'u aktive ettikten sonra kaspaz-3'ü aktive eder. Her 2 yolla da aktive olan kaspaz-3 yine CAD aktivasyonu ile DNA fragmantasyonuna neden olur (Hung ve Chow, 2004).

2.1.4. Otofaji

Otofaji, oksidatif stres, açlık ve büyüme faktörü kıtlığı gibi durumlarda hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomda parçalanması ile hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayan bir süreçtir (Mizushima vd., 2008). Aynı zamanda otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenezis, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücre içi

patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynadığı ortaya konulmuştur. Bu özelliklerinden dolayı otofaji mekanizmasının düzenlenmesindeki aksaklıklar, kansere, kardiyomiyopatiye, kas hastalıklarına ve nörodejeneratif hastalıklara sebep olabilmektedir (Levine ve Klionsky, 2004).

Son yıllarda Beclin-1 gibi tümör baskılayıcı genlerin otofajinin düzenlenmesinde de görev aldığı keşfedilmiştir. Bu durum otofajinin tümör baskılayıcı bir süreç olarak görülmesini sağlamıştır (White vd., 2011). Apoptoz ve otofajinin birlikte çalıştığını gösteren pek çok yayın bulunmaktadır. Bir tür topoizomeraz enzimi inhibitörü olan etoposit maddesinin kullanımında, fare embriyonik fibroblast hücrelerinde (MEF), artan seramid seviyesine bağlı olarak meme ve kolon karsinomalarında apoptozla beraber otofaji aktivasyonunun gerçekleştiği görülmüştür (Pattingre vd., 2009). ATP yoksunluğu durumunda apoptozun devamlılığı için otofaji sayesinde hücre içi ATP ihtiyacı giderilebilmektedir (Qu vd., 2007).

2.2. Kanser İle İlgili Genel Bilgiler

Kanser, mutasyon birikimi nedeniyle ölmesi gereken hasarlı hücrenin ölümden kaçarak kontrolsüz olarak çoğalması sonucu görülen metabolik bir hastalıktır (Ponder, 2001). Normal hücrelerin genomunda oluşan mutasyonlar, DNA'nın stabilitesinin bozulmasına ve hücrenin malignant özellik kazanmasına neden olmaktadır. Ortalama olarak bir insan hücresinde endojen hücresel süreçlere bağlı olarak günde 60.000'den fazla DNA hasarının doğal olarak oluştuğu düşünülmektedir (Bernstein vd., 2013). Hücrelerde oluşan DNA hasarı, tamir mekanizmaları tarafından onarılmakta, onarılamayacak durumdaki hatalar ise programlı hücre ölümüne yol açmaktadır. Ancak, kanser hücrelerinde DNA tamir mekanizmasından sorumlu genlerde meydana gelen mutasyon sonucunda kusurlu DNA tamir edilemez. Bununla birlikte hücreler kendilerini ölüme yönlendirecek mekanizmalardan kaçabilmekte ve böylelikle hasarlı genoma sahip yeni hücreler üretmeye devam etmektedir (Kanwal ve Kulsoom, 2016).

Kanser hücrelerinde ortak olarak gözlenen birtakım özellikler bulunmaktadır. Bu özellikler kanserin fizyolojik belirteçleri olarak kabul edilmekte ve tedavi için birer hedef olarak gösterilmektedirler. Bu özellikler;

- Kanser hücreleri dış kaynaklı büyüme sinyallerine ihtiyaç duymaz,
- Büyümeyi durdurucu sinyallere karşı duyarlı değildirler,
- Programlı hücre ölümünden kaçabilirler,
- Artan telomeraz aktivitesi ile yaşlanmaya karşı dirençlidirler,
- Kontrolsüz çoğalma özelliğine sahiptirler,
- Yeni kan damarları oluşturabilirler (anjiyogenezis),
- Farklı dokulara saldırarak bir bölgeden diğerine taşınabilirler (metastazis). (Hanahan ve Weinberg, 2011).

2.3. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, yirminci yüzyılın başlarında nadir görülen bir hastalık iken, sigara içme alışkanlığındaki artışa paralel olarak sıklığı giderek artmış ve dünyada en yaygın görülen kanser türlerinden biri haline gelmiştir (Spiro ve Porter, 2002). Tüm dünyada akciğer kanseri erkeklerde kanser olgularının %14'ünü, bayanlarda ise %13'ünü oluşturur ve görülme sıklığı açısından yapılan sıralamada her iki cinsiyet için de ikinci sırada yer almaktadır (Siegel vd., 2014). Akciğer kanseri için tanımlanan risk faktörleri arasında sigara tüketimi, asbest gibi kimyasallara veya pasif içiciliğe maruz kalma, radyasyon ve ailesel yatkınlık yer almaktadır (Clamon, 2015).

Akciğer kanserlerinin sınıflandırılması kanser hücrelerinin mikroskop altındaki görünümlerine göre yapılmaktadır. Buna göre akciğer kanserleri küçük hücreli ve KHDAK olmak üzere iki ana gruba ayrılarak incelenmektedir. Görülme sıklığı olarak küçük hücreli dışı akciğer kanseri vakaların yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır (Dela Cruz vd., 2011).

2.3.1. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri

En sık görülen akciğer kanseri türü olmakla birlikte, küçük hücreli akciğer kanserine göre daha yavaş ilerler. Bu kanser türü kendi içinde adenokarsinom, büyük hücreli akciğer karsinomu ve yassı (skuamöz) hücreli karsinom olarak üç ana gruba ayrılmaktadır (De Waele ve Van Schil, 2012).

2.3.1.1. Adenokarsinom

Adenokarsinom, kadınlar arasındaki en yaygın akciğer kanseri türüdür ve genellikle sigara kullanmayanlar arasında yaygındır. KHDAK vakalarının yaklaşık %40'ında görülür. Adenokarsinom, akciğerin dışa yakın dokularında başlar ve herhangi bir belirti vermeden uzun süre varlığını sürdürür (Langevin vd., 2014).

2.3.1.2. Büyük hücreli akciğer karsinomu

Büyük hücreli akciğer karsinomu mikroskop altında büyük yuvarlak hücreler şeklinde gözlendiği için bu isimle adlandırılmaktadır. Diğer küçük hücreli dışı akciğer kanseri çeşitlerine göre daha hızlı büyümekte ve yayılmaktadır. Yine adenokarsinom gibi belirti vermeden uzun süre varlığını sürdürdüğü bilinmektedir (Eldridge, 2013).

2.3.1.3. Skuamöz hücreli karsinom

Skuamöz hücreli karsinom, erkekler arasında kadınlara göre daha yaygındır ve sigara ile en çok ilişkilendirilen küçük hücreli dışı akciğer kanseri türüdür. Kanser hücreleri soluk borusuna yakın yerlere yerleştiği için diğer akciğer kanseri çeşitlerine göre daha erken belirti verdiği bilinmektedir (Eldridge, 2013).

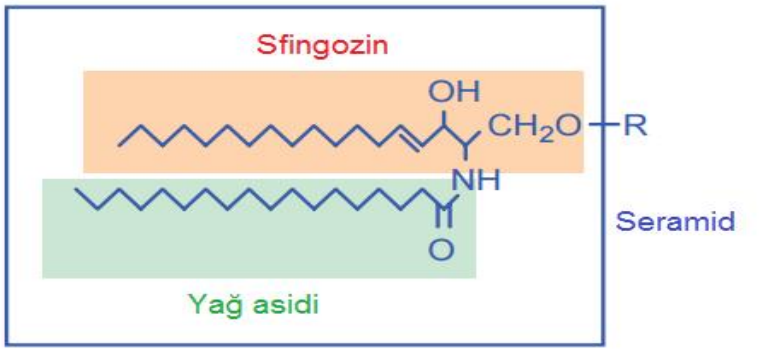
2.4. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Tedavisi

Günümüzde uygulanan KHDAK tedavileri, uzun dönem sağ kalım oranlarındaki düşüklük nedeni ile yetersiz kalmaktadır. Tedavi için en iyi seçenek cerrahi müdahaledir fakat hastalığın ilerlemiş evrelerinde ve metastatik akciğer kanseri hastalarında cerrahi müdahale uygun değildir. Bu nedenle, hastalara yaygın olarak kemoterapi ve radyoterapi uygulanmaktadır (Liao vd., 2009). Kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedaviler, hastalara bir yılı aşmayan sağ-kalım süresi sunabilmektedir. Ayrıca; kemoterapide kullanılan ilaçların çeşitli yan etkilerinin olması ve hücrelerin bu ilaçlara karşı direnç geliştirmesi hastalığın etkili bir şekilde tedavi edilmesini zorlaştırmaktadır (Ray vd., 2010). Bu nedenle hastaların sağ-kalım sürelerini uzatabilmek için son yıllarda alternatif

tedavilerin ve yeni biyolojik ajanların geliştirilmesi için çok fazla sayıda çalışma yapılmaktadır (Mendez vd., 2011).

2.5. Sfingolipid Metabolizması

Sfingolipidler ilk kez 1876 yılında J.L.W. Thudichum tarafından keşfedilmişlerdir. (Simons ve Ikonen, 1997). Ökaryotik hücrelerde membran lipidlerinin küçük (%10-20) ancak çok önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar. Yapılarında hidrofilik baş grubuna bağlı bir lipofilik kuyruk grubu bulunmaktadır. Lipid kısımları 18-20 karbon ihtiva eden düz zincirli bir amino alkol olan sfingoid bazı içermektedir. Memeli hücrelerinde bulunan sfingoid bazları; sfingozin, sfinganin (dihidrosfingozin) ve 4-hidroksisfinganin'dir. Sfingoid bazındaki amino grubuna uzun zincirli bir yağ asidi amid bağı ile bağlanmıştır (Holthuis vd., 2001). En temel sfingolipid türü seramid molekülüdür. Seramid molekülünde primer alkol grubundaki hidrojen yerine, farklı grupların gelmesiyle çeşitli sfingolipid türleri oluşmaktadır (Öğretmen ve Hannun, 2004). Örneğin; glikosfingolipidlerde bu grup çeşitli monosakkaritler iken, bir fosfosfingolipid olan sfingomiyelinde ise fosfokolindir (Holthuis vd., 2001)(Şekil 2.3).



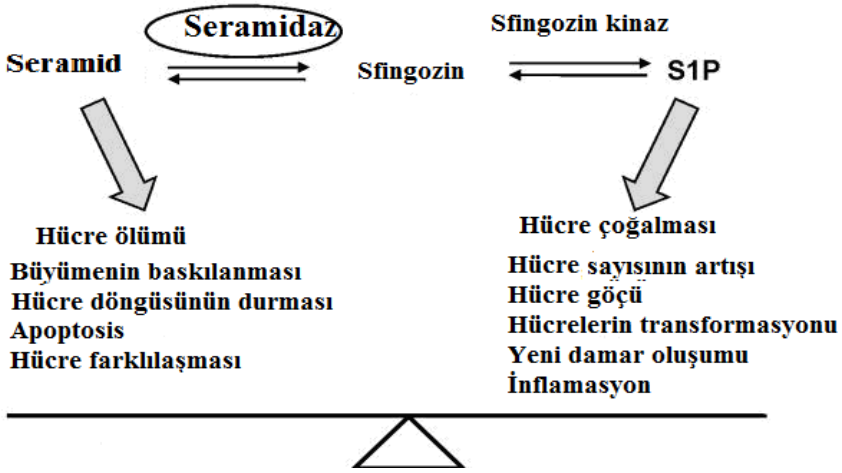
Sübstitüent (R)	Sfingolipid
H	Seramid
Fosfokolin	Sfingomiyelin
Şeker(ler)	Glikosfingolipid

Şekil 2.3. Sfingolipidlerin genel yapısı (Cazenave vd., 2002).

Uzunca bir süre sfingolipidlerin yalnızca membran yapısında görev aldıkları düşünülmüştür. Yapılan araştırmalar sonucunda ise aralarında seramid, sfingozin ve S1P

bulunduğu biyoaktif sfingolipid moleküllerinin birçok sinyal iletim yolaklarının düzenlenmesinde görev aldıkları belirlenmiştir (Bartke ve Hannun, 2009).

Sfingolipid metabolizmasında ikinci haberci olarak görev yapan seramid ve S1P hücrelerde hücre döngüsü ve apoptoz üzerindeki karşılıklı etkileşimleri belirlenmiştir. Seramid molekülünün hücre ölümünü tetiklerken, S1P'ın ise hücre sağ-kalımını artırdığı, apoptozdan kaçışa neden olduğu ve ilaç direncinin oluşmasını sağladığı gözlenmiştir. Bu sebeple bu iki molekülün kanserli hücrelerin çoğalması üzerindeki etkilerinin araştırılması gündeme gelmiştir (Pettus vd., 2002). Yapılan çalışmalarda kanserleşen hücrelerdeki seramidaz enzimi aktivasyonunun artışı; seramid düzeyini azaltırken, S1P düzeyini arttırdığı belirlenmiştir. Bu nedenle hücre içi seramidaz enziminin düzeyi, seramid ve S1P dengesinin korunması açısından kanser tedavisinde oldukça önemli bir yer tutmaktadır (Obeid vd., 1993)(Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Seramid/Sfingozin-1-fosfat Dengesi (Liu vd., 2009).

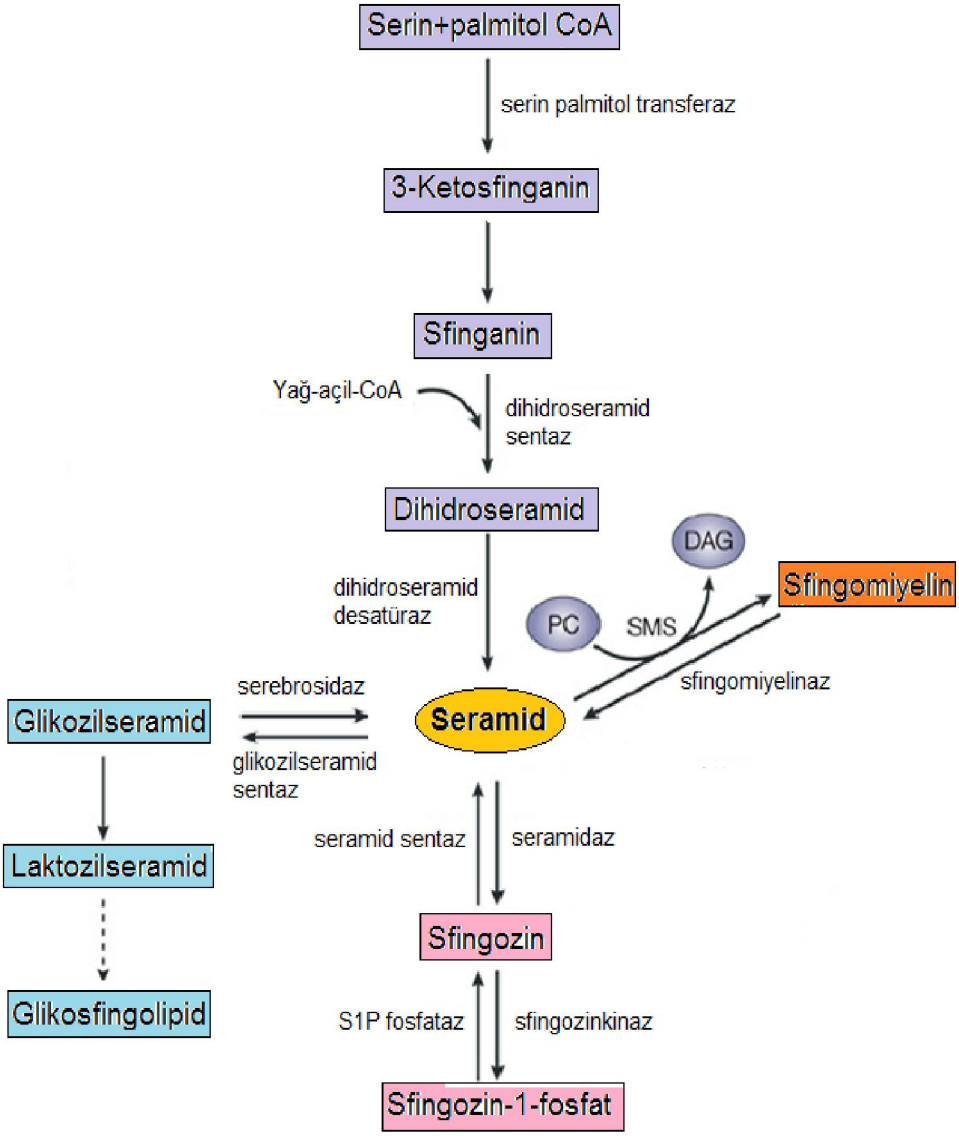
2.6. Seramid Molekülünün Yapısı ve Metabolizması

Seramid, bir sfingozin bazına çeşitli uzunluklardaki bir yağ asidi zincirinin amid bağı ile bağlanması sonucu oluşmaktadır. Bu yağ asitlerinin uzunluğu C_{14} ile C_{26} arasında değişmektedir (Perry ve Hannun, 1998). Seramid, hücrede daha kompleks sfingolipidlerin üretiminde öncül molekül olarak kullanılmaktadır (Öğretmen ve Hannun, 2004).

Genel olarak seramidler iki farklı mekanizma ile hücrede üretilmektedir. Bunlardan birincisi de novo sentezi, ikincisi ise sfingomiyelin ve glikozilseramid gibi sfingolipidlerin hidrolizi sonucu üretilmesidir (Mandon vd., 1992). De novo yolakta serin, palmitol-CoA ile serin palmitol transferaz enzimi aracılığıyla birleşerek 3-keto-sfinganin oluşur. 3-keto-sfinganin ise indirgenerek sfinganin (dihidrosfingozin) meydana gelir. Sfinganin molekülünün de hemen ardından uzun zincirli bir yağ asidi ile dihidroseramid sentaz enzimi yardımıyla N-açilasyonu sonucu dihidroseramid oluşturulmaktadır. Sonrasında ise dihidroseramid molekülünde desatüraz enzimi aracılığıyla 4-5 trans çift bağın oluşumu sonucunda seramid molekülü oluşmaktadır (Yasuda vd., 2003). Seramid molekülünün de novo sentezi ER'de gerçekleşirken, daha kompleks sfingolipidlere dönüşüm golgi cisimciğinde meydana gelmektedir. Bunun için seramid molekülü ya veziküler yolla ya da seramid transfer proteini (CERT) aracılığıyla ER'den golgi cisimciğine taşınmaktadır (Levy ve Futerman, 2010). Hidroliz yolağında ise sfingomiyelinaz enzimi aracılığıyla sfingomiyelin hidrolize edilerek seramid ve fosfokolin meydana gelir. Glikozilseramid molekülünün serebrosidaz enzimi aracılığıyla hidrolize edilmesiyle de hücrede yine seramid elde edilir (Senkal ve Obeid, 2015) (Şekil 2.5).

Hücrelerde seramid molekülü birikiminin 4 farklı yolla gerçekleştiği bilinmektedir;

a) Serin palmitol transferaz (SPT) ve seramid sentaz enzimleri aracılığıyla de novo seramid sentezi (Hannun, 1996).
b) Sfingomiyelinin sfingomiyelinaz enzimi aracılığıyla hidrolizi (Bielawska vd., 1996)
c) Glikozilseramid molekülünün serebrosidaz enzimi ile hidrolizinin uyarılması ya da sentezinin baskılanması (Abe vd., 1995).
d) Seramid molekülünün seramidaz enzimi ile hidrolizinin baskılanması (Hannun ve Obeid, 2002).



Şekil 2.5. Sfingolipid metabolizması, SMS: sfingomiyelin sentaz, PC: fosfokolin, DAG: Diaçil gliserol (Öğretmen ve Hannun, 2004).

Seramid molekülünün hücrelerdeki artışı DNA hasarı, hipoksi, stres ve apoptotik moleküllerin indüklenmesiyle gerçekleşmektedir (Perry ve Hannun, 1998). Hücrelerdeki seramid miktarının artması ise hücre çoğalmasının baskılanması, apoptozun indüklenmesi, telomeraz aktivitesinin baskılanması ve yaşlanmaya neden olmaktadır (Öğretmen ve Hannun, 2004).

2.7. Biyoaktif Sfingolipidlerin Kanser Tedavisinde Hedeflenmesi

2.7.1. Seramid

Birçok çalışma tarafından seramid molekülünün pro-apoptotik bir ajan olarak öne sürülmesinin iki sebebi vardır. Bunlardan birincisi apoptoz sinyalinin oluşmasından önce saptanan seramid üretimindeki artışıdır (Grullich vd., 2000). İkincisi ise hücreye dışarıdan seramid verilmesi sonucunda apoptozun indüklenmesidir (Obeid vd., 1993). Hücrede artan seramid miktarı; birçok protein kinaz ve fosfatazın aktivasyonuna, kaspaz kaskadının aktifleşmesine, hücrede birçok organelde fonksiyon bozukluğuna ve bunun sonucunda da apoptoza neden olmaktadır (Morales vd., 2007).

Araştırmacılar hücre içine girebilen sentetik kısa zincirli C2- ve C6-seramid gibi seramid analoglarını deneysel amaçlı sentezlemişlerdir (Morales vd., 2007). Obeid ve arkadaşlarının C2-seramid molekülünü kullanarak yapmış oldukları çalışmada ilk kez seramid molekülünün hücre içerisindeki artışının apoptoza neden olduğunu belirlemişlerdir (Obeid vd., 1993). Farklı bir çalışmada ise C2- ve C6-seramid moleküllerinin apoptoz ile karakterize edilen DNA fragmentasyonunu indüklediği tespit edilmiştir (Kolesnick vd., 2000; Bielawska vd., 1993).

Seramid mitokondride hidroliz veya de novo sentez ile üretilebilmektedir (Birbes vd., 2001). Hem sfingomiyelinaz enziminin mitokondride aşırı ekspresyonuyla, hem de TNF-α uyarımıyla mitokondriyal seramid birikiminin Bax translokasyonuna, sitokrom c salınımına ve apoptoza neden olduğu belirlenmiştir (Bionda vd., 2004). Bcl-2 molekülünün seramid aracılı apoptozu engellemesi (Smyth vd., 1996), ekzojen seramid moleküllerinin mitokondriyal apoptozla ilişkili olduğunu göstermektedir (Srinivasan vd., 1996). Ekzojen C2- ve C6-seramid moleküllerinin birçok hücre hattında mitokondriyal apoptozu tetiklediği bilinmektedir. Genel olarak, hem ekzojen seramidler hem de seramid üretimine neden olan ölüm sinyalleri mitokondriyal fonksiyon bozukluğuna, kaspaz aktivasyonuna ve apoptoza neden olduğu gözlenmiştir (Birbes vd., 2001).

2.7.2. Seramidaz enzimi inhibitörleri

Seramidaz enzimlerinin seramid molekülünü parçalayarak sfingozin ve S1P seviyelerini kontrol etme yeteneklerinden dolayı hücre sağ-kalımında rol oynayan önemli düzenleyici moleküller olduğu bilinmektedir. Seramidaz enziminin asit, nötral ve alkalin seramidaz olmak üzere üç farklı çeşidi vardır. (Mao ve Obeid, 2008).

Sfingolipid metabolizmasında görev alan enzimlerin moleküler teşhislerinin yapılmasıyla bu metabolizmayı kapsayan moleküler yolakların gözlemleri kolaylaşmıştır. Buna ek olarak, yapılan çalışmalar sonucunda bu enzimlerin hücrenin farklı bölgelerinde görev aldığı gösterilmiştir. Enzimlerin bu şekildeki lokalizasyonu sfingolipid metabolizmasının karmaşıklığını göstermektedir. Ayrıca, bu enzimlerin hücre içerisindeki seviyelerinin kanser türlerine göre farklılık göstermesi sfingolipid metabolizmasındaki enzimlerin karsinogenezde farklı görevlerinin olduğunu ortaya koymaktadır (Merrill vd., 1997).

Normal hücrelere göre asit seramidaz enzim düzeyi özellikle prostat, melanoma ve baş-boyun kanseri hücrelerinde normal hücrelere göre yüksek düzeyde bulunmuştur (Beckham vd., 2011; Proksch vd., 2011). Seramidaz enziminin baskılanmasının prostat kanseri hücrelerinde apoptozu uyardığı ve kanser büyümesini engellediği gösterilmiştir (Holman ve Turner, 2008). Benzer şekilde bağırsak kanseri (Selzner vd., 2001) ve melanoma (Bektas vd., 2005) hücrelerinde de seramidaz enziminin baskılanmasının apoptozu uyardığı tespit edilmiştir. Shah ve arkadaşları da büyük granüllü lenfositli lösemi (LGL) hücrelerinde seramidaz enzim düzeyinin arttığını ve seramidaz enziminin baskılanmasının ise hücrelerde apoptozu uyardığını göstermişlerdir (Shah vd., 2008).

Ayrıca yapılan çalışmalarda seramidaz enzim düzeyi yüksek olan kanserli hücrelerde kullanılan kemoterapötik ajanlara karşı daha kolay direnç geliştiği belirlenmiştir. Karaciğer kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada seramidaz aktivitesinin artmasına paralel olarak ilaç direncinin arttığı belirlenmiştir (Saad vd., 2007). Prostat kanseri hücrelerinde yapılan diğer bir çalışmada ise seramidaz enzim artışının apoptozu uyaran ilaçlara (doxorubisin, etoposit, sisplatin, seramid analoğu) karşı

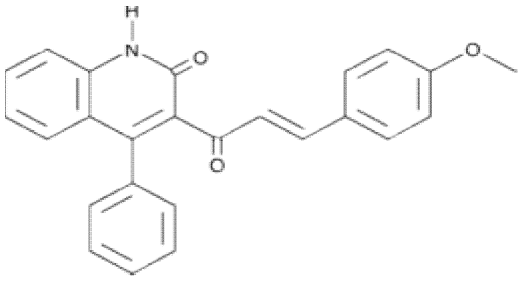
direnç oluşumunu tetiklediği, enzimin aktivitesinin baskılanmasının ise bu direnci azalttığı tespit edilmiştir (Morales vd., 2006).

Bu bilgiler doğrultusunda araştırmacılar seramidaz enzimini baskılayabilmek için çeşitli inhibitör moleküller geliştirmişlerdir. Örneğin; asit seramidaz inhibitörü olan B13 prostat kanseri hücrelerinde apoptozu uyardığı belirlenmiştir (Hannun ve Linardic, 1993). Kolon karsinoma hücrelerinde seramid miktarı sağlıklı hücrelere göre daha az seviyede bulunmuş, ekzojen seramid ya da seramidaz inhibitörü B13 ile tedavi sonucu hücre içerisinde seramid miktarı artırılarak apoptozun indüklenmesi sağlanmıştır (Holman vd., 2008; Selzner vd., 2001). Fibrosarkoma hücre (L929) hattında asit seramidaz enziminin aşırı ekpresyonunun TNF-α aracılı apoptozu önlediği ve ekzojen seramid veya asit seramidaz inhibitörü N-oleoylethanolamine ile tedavi sonucunda ise TNF-α direnci ortadan kaldırdığı belirlenmiştir (R´enert vd., 2009).

Seramidaz enzimi inhibitörlerinin nekrotik hücre ölümü ile bağlantılarını araştıran çalışma sayısı çok azdır. Epitelyal akciğer adenokarsinomu (A549) hücre hattı ile yapılan bir çalışmada glikozilseramid sentaz inhibitörü (DL-PDMP) ve seramidaz inhibitörü (D-NMAPPD) ile kombine verilmiştir. Meydana gelen seramid artışına bağlı lizozomal bozulma sonucu hücrelerde nekrozun gerçekleştiği bildirilmiştir (Yamane, 2015).

2.7.3. Seramidaz enzimi inhibitörü seranib-2

Seranib-2 yeni üretilmiş hücresel seramidaz aktivitesini baskılayan bir ilaçtır. Molekül formülü 3-(3-(4-methoksifenil)asirilol)-4-fenilguinolin-2(1H)-1'dir (Draper vd., 2011) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Seranib-2'nin kimyasal yapısı (Draper vd., 2011).

Seranib-2'nin insan ovaryum kanseri hücrelerinde (SKOV3) seramidaz aktivitesini baskıladığı, hücre seramid düzeyini arttırdığı, S1P düzeyini azalttığı ve bu sayede tümör büyümesini azalttığı ve hücrelerin çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir (Draper vd., 2011). Bir başka çalışmada ise H-Ras geniyle transforme edilmiş rat fibroblast (5RP7) hücrelerinde seranib-2'nin sfingozin miktarını artırarak golgi kompleksinde fragmentasyona neden olduğu ve bunun sonucunda hücreyi apoptoza sürüklediği tespit edilmiştir (Vejselova vd., 2014). Bir diğer çalışmada ise insan prostat kanseri (DU145, LNCaP) hücre hatlarında seranib-2'nin düşük dozlarında anti-proliferatif etkisinin olduğu ve apoptozu indüklediği belirtilmiştir (Kuş vd., 2015). Tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde, seramidaz enzim aktivitesinin baskılanmasının kanserli hücrelerde ilaç direncinin kırılması ve apoptozun indüklenmesi açısından önemli olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada, seramidaz enzim inhibitörü olan seranib-2'nin iki farklı KHDAK hücre dizisinde hücre canlılığı, morfolojisi, ölümü ve gen ifadesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca akciğer kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta olan karboplatin ile birlikte kombine verilerek hücre çoğalması üzerindeki antagonistik/sinerjistik etkileri incelenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Deneysel çalışmaların tamamı Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Hücresel Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasal ve sarf malzemeler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 1 Deneylerde kullanılan kimyasal malzemeler

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma
Fetal Bovine Serum (Fetal Dana Serumu, FBS)	Sigma
Penisilin-Streptomisin Çözeltisi	Hyclone
%0,25 Tripsin-EDTA Çözeltisi	Sigma
Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline, PBS)	Sigma
Dimetil Sülfoksit (DMSO)	Carlo Erba
3-(4,5-Dimetiltriazol-2-il)-2,5difeniltetrazolium bromid (MTT)	Applichem
Tripan Mavisi	Sigma
Hank'ın Dengelenmiş Tuz Çözeltisi (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS)	Sigma
Seranib-2	Cayman
Karboplatin	Carbodex
RNA İzolasyon Kiti	Roche
cDNA Sentez Kiti	Roche
Green Master Kiti	Roche
Hücre Ölümünü Belirleme Kiti	Roche
İnsan ASAH1 ELISA kiti	Cloud-clone corp.

%99.8'lik Etanol (C_2H_5OH)	Riedel de Haen
Sodyum Bikarbonat ($NaHCO_3$)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	İnvitrogen

3.2. Hücrelerin Temini ve Çoğaltılması

Çalışmada küçük hücreli dışı akciğer kanseri KHDAK çeşitlerinden adenokarsinom türü için A549, büyük hücreli akciğer karsinomunu için ise H460 hücre dizisi seçilmiştir. Seçilen hücre dizileri Amerikan Kültür Koleksiyonu'ndan temin edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmaları steril kabin altında gerçekleştirilmiş olup her çalışmadan önce kabin, 30 dakika UV lamba ile steril edilmiştir. Hücreler %10'luk Fetal Dana Serumu (FBS) ve %1 penisilin-streptomisin antibiyotik solüsyonu içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) içerisinde, 37 ^{0}C'de, % 5 CO_2 ve % 95 nem içeren ortamda önce 25 cm^2'lik, daha sonra 75 cm^2'lik flasklarda inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Kültür kaplarındaki hücreler ters ışık mikroskobu kullanılarak canlılık, çoğalma ve kontaminasyon bakımından günlük olarak takip edilmiştir. Hücrelerin besi ortamı ise rutin olarak iki günde bir değiştirilmiştir.

3.3. Hücre Ekimi ve İlaç Dozlarının Uygulanması

Hücre sayımı için tripan mavisi canlılık boyası kullanılmıştır. Bu metodun temel prensibi, canlı hücreler içlerine boyayı almazken, ölü hücrelerin boyayı hücre içine almasıdır. Tripan mavisi bu sayede sadece ölü hücreleri boyamaktadır. Hücreler tripan mavisi ile oda ısısında 5 dakika muamele edildikten sonra hücre sayım cihazında (Cedex XS, Innovatis) sayılmıştır.

Hücre sayımı sonucunda 96 kuyucuklu kültür kaplarında her bir kuyucuğa 100µl hacimde $1x10^4$ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Kültür kapları hücrelerin tabana yapışması için 37 ^{0}C'de, % 5 CO_2 ve % 95 nem içeren inkübatörde 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.

Seranib-2 (Cayman) toz halinde temin edilerek, dimetil sülfoksit (DMSO) içinde 10 mM ana stok olacak şekilde çözülmüştür. Daha sonra ana stok solüsyon DMEM ile dilüe edilerek 1 µM' dan 100 µM' a kadar seranib-2 dozları hazırlanmıştır. Ayrıca en yüksek iki doz olan 75 µM ve 100 µM için sadece DMSO içeren çözücü kontrol grubu deney gruplarına eklenmiştir (Çizelge 3.2). İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklara hazırlanan dozlar (100 µl) ilave edilerek hücreler 24 ve 48 saat süre ile muamele edilmiştir. İlaç içermeyen kuyucuklara ise 100 µl besiyeri ilave edilerek kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her bir doz için en az 8 kuyu kullanılmış ve deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

Çizelge 3. 2. Seranib-2 ve doz grupları

Sıra	**Uygulanan doz**
1	Kontrol grubu (sadece besiyeri uygulandı)
2	1 µM seranib-2 doz grubu
3	5 µM seranib-2 doz grubu
4	10 µM seranib-2 doz grubu
5	25 µM seranib-2 doz grubu
6	50 µM seranib-2 doz grubu
7	75 µM seranib-2 doz grubu
8	100 µM seranib-2 doz grubu
9	75 µM çözücü kontrol (DMSO) doz grubu
10	100 µM çözücü kontrol (DMSO) doz grubu

Karboplatin (Carbodex) flakon halinde temin edilmiş, molaritesi 10 mM olacak şekilde üzerine saf su eklenerek ana stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra DMEM ile dilüe edilerek 1 ile 100 µM arasındaki karboplatin dozları Çizelge 3.3'te gösterildiği gibi hazırlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklara dozlar (100 µl) ilave edilerek hücreler 24 ve 48 saat süre ile muamele edilmiştir. İlaç içermeyen kuyucuklara ise 100 µl besiyeri ilave edilerek kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her bir doz için en az 8 kuyu kullanılmıştır ve deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

Çizelge 3. 3. Karboplatin doz grupları

Sıra	**Uygulanan doz**
1	Kontrol grubu (sadece besiyeri uygulandı)
2	1 µM karboplatin doz grubu
3	5 µM karboplatin doz grubu
4	10 µM karboplatin doz grubu
5	25 µM karboplatin doz grubu
6	50 µM karboplatin doz grubu
7	75 µM karboplatin doz grubu
8	100 µM karboplatin doz grubu

3.4. Hücre Morfolojilerinin Ters Işık Mikroskobunda Görüntülenmesi

Seranib-2'nin farklı dozlarının uygulandığı A549 ve H460 hücre hatlarında doza ve zamana bağlı oluşan morfolojik değişimler ters ışık mikroskobunda (Nikon Eclipse, TC100) incelenmiştir. Doza ve zamana bağlı olarak oluşan hücresel değişiklikler Kameram 21 programı yardımıyla görüntülenmiştir.

3.5. Seranib-2'nin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Seranib-2'nin A549 ve H460 hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkisi Mossmann tarafından tanımlanan 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) yöntemi ile belirlenmiştir (Mossman, 1983).

MTT yöntemi, hücre canlılığının belirlenmesi için sıkça kullanılan pratik bir kolorimetrik yöntemdir. MTT boyası, hücrelere aktif olarak alınabilen ve mitokondriye bağlı bir reaksiyon ile renkli, suda çözünmeyen formazana indirgenen bir maddedir. Hücrelerin MTT indirgeme özelliği hücre canlılığının ölçütü olarak alınır ve MTT analizi sonucunda elde edilen boya yoğunluğu canlı hücre sayısı ile doğru orantı gösterir (Abe ve Matsuki, 2000).

Her deneyden önce 5mg/mL MTT (Applichem), Hank'in dengelenmiş tuz solüsyonu (HBSS, Sigma) içerisinde çözülerek 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek taze

olarak hazırlanmıştır. Muamele süreleri sonunda 20 µL MTT solüsyonu her bir kuyuya eklenerek 37^0C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültür kabının içeriği uzaklaştırılarak her bir kuyuya 100 µL DMSO eklendikten sonra karanlık ortamda 5 dakika bekletilmiştir. Kültür kapları ELISA cihazında (BioTek, Powerwave XS) 550 nm dalga boyunda mikroplate okuyucu ile spektrofotometrik olarak absorbans değerleri ölçülmüştür. Deneyler en az 3 kez tekrarlanmıştır. Kontrol grubunun absorbans değerine göre kuyucuklardaki absorbans değerlerinin yüzdesi "Sitotoksisite (%) = Doz grubunun absorbansı x 100 / Kontrol grubunun absorbansı" formülüne göre hesaplanmıştır. Ardından elde edilen veriler IBM SPSS Statistics v22 programında One-Way ANOVA testiyle analiz edilmiş ve anlamlılık dereceleri hesaplanmıştır (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$). Kontrol grubuna göre % 50 oranında hücre ölümüne neden olan doz hesaplanarak, IC_{50} değeri olarak kabul edilmiştir.

3.6. Karboplatinin Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Karboplatin dozları ile 24 ve 48 saat süre muamele sonunda her kuyuya 20 µL MTT solüsyonu eklenerek 37^0C'de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kültür kabının içeriği uzaklaştırılarak her bir kuyuya 100 µL DMSO eklendikten sonra karanlık ortamda 5 dakika bekletilmiştir. Kültür kapları ELISA cihazında (BioTek, Powerwave XS) 550 nm dalga boyunda mikroplate okuyucu ile spektrofotometrik olarak absorbans değerleri ölçülmüştür. Deneyler en az 3 kez tekrarlanmıştır. Kontrol grubunun absorbans değerine göre kuyucuklardaki absorbans değerlerinin yüzdesi "Sitotoksisite (%) = Doz grubunun absorbansı x 100 / Kontrol grubunun absorbansı" formülüne göre hesaplanmıştır. Ardından elde edilen veriler IBM SPSS Statistics v22 programında One-Way ANOVA testiyle analiz edilmiş ve anlamlılık dereceleri hesaplanmıştır (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$). Kontrol grubuna göre % 50 oranında hücre ölümüne neden olan doz hesaplanarak, IC_{50} değeri olarak kabul edilmiştir.

3.7. Seranib-2 ve Karboplatin Dozlarının Kombine Olarak Uygulanması

Akciğer kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta olan karboplatinin seranib-2 ile birlikte kombine verildiğinde iki ilaç arasındaki antagonistik/sinerjistik etkileşimleri her iki hücre hattında araştırılmıştır.

Seranib-2 ve karboplatinin aynı dozlarının 24 ve 48 saat süre ile 1:1 oranında iki hücre hattına kombine olarak verilmesi sonucunda oluşan sitotoksik etki MTT yöntemi ile saptanmıştır. Deneyler en az 3 kez tekrarlanmıştır. Kontrol grubunun absorbans değerine göre kuyucuklardaki absorbans değerlerinin yüzdesi "Sitotoksisite (%) = Doz grubunun absorbansı x 100 / Kontrol grubunun absorbansı" formülüne göre hesaplanmıştır. Ardından elde edilen veriler, IBM SPSS Statistics v22 programında One-Way ANOVA testiyle analiz edilmiştir (* : $p<0.05$, ** : $p<0.01$, *** : $p<0.001$).

Seranib-2 ve karboplatin arasındaki antagonistik/sinerjistik etkileşim ise "İlaç etkileşimi katsayısı "CDI= (Kombine doz absorbansı/ seranib-2 absorbansı x karboplatin absorbansı) x100" formülüne göre belirlenmiştir. CDI< 1 için sinerjistik etkileşim, CDI>1 için antagonistik etkileşim olduğu kabul edilmiştir (Dalpu vd., 2014).

3.8. Apoptotik ve Nekrotik DNA Fragmentasyonunun ELISA Yöntemi İle Belirlenmesi

Apoptotik ve nekrotik DNA fragmentasyonunu kantitatif olarak belirlemek amacıyla kolorimetrik bir ELISA kiti olan Hücre Ölümü Belirleme ELISA Kiti (Roche) kullanıldı.

Bu deneyde her iki hücre dizisi için MTT yönteminden elde edilen sonuçlar göz önüne alınarak üç farklı doz seçilmiştir. Bu dozlar A549 hücre dizisi için 10, 25 ve 50 µM; H460 hücre dizisi içinse 5, 10 ve 25 µM olarak belirlenmiştir. Herhangi bir doz ilave edilmeyen kuyucuklar kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

Hücre sayımından sonra, 96 kuyucuklu kültür kaplarına $1x10^4$ hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda seçilmiş olan seranib-2 dozlarıyla hücreler 24 saat süreyle muamele edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklar ters ışık mikroskobunda incelenerek her doz grubu ve kontrol grubu için iki adet kuyu seçilmiş ve kültür kabı 25 ^{0}C'de, 200 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjün ardından seçilen kuyuların içeriği otomatik pipet ile çekilerek nekrotik ölümün araştırılması amacıyla eppendorf tüplere etiketlenerek ayrılmıştır. Ardından apoptotik ölümün araştırılması amacıyla içeriği çekilen kuyulara 200 µL lizis tamponu eklenerek karanlık ortamda oda

sıcaklığında 30 dakika inkübe edilerek hücre lizatları elde edilmiştir. İnkübasyon sonunda 96 kuyucuklu kültür kabı tekrar 25 ^{0}C'de, 200 g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve streptavidin kaplı kültür kabına nekroz için süpernatant, apoptoz içinse hücre lizatı örneklerinin her birinden 20 µL eklenmiştir. Anti-Histon Biotin, Anti-DNA POD ve inkübasyon tamponu bir eppendorf tüp içerisinde birleştirilerek örneklerin yüklendiği her kuyuya 80 µL eklenmiş ve 2 saat boyunca karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyuların içeriği dökülerek 300 µL yıkama tamponuyla 3 kez yıkanmıştır. Ardından her bir kuyuya 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzthiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) substratından 100 µL eklenmiş ve 12 dakika boyunca 250 g'de çalkalanarak karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Süre sonunda her bir kuyuya ABTS durdurma solüsyonundan 100 µL eklenmiş ve hemen ardından 405 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında okuma yapılmıştır. Kontrol ve doz gruplarına ait DNA fragmentasyon oranları "Zenginleştirme faktörü= Doz grubu absorbansı/ Kontrol grubu absorbansı" formülüyle hesaplanmıştır. Ardından elde edilen veriler IBM SPSS Statistics v22 programında t-testi ile analiz edilmiş ve anlamlılık dereceleri ölçülmüştür (* : $p<0.05$).

3.9. Asit seramidaz aktivitesi ölçümü

Çalışmada seranib-2'nin 5, 10 ve 25 µM dozlarının seramidaz enzim aktivitesi üzerindeki baskılayıcı etkisi İnsan N-Açilsfingozin Amidohidrolaz 1 (ASAH 1) İçin Enzim Bağlı İmmunosorbent Deney Kiti (Cloud-Clone Corp.) ile H460 hücre dizisi kullanılarak araştırılmıştır.

Sayımdan sonra 25 cm^{2}'lik kültür kaplarına 1x10^{6} hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda seranib-2 dozları kültür kaplarına ekilmiştir. Bir gün sonra tripsinlenen hücreler 4 ^{0}C'de, 1200 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilmiştir. 1 mL PBS ile yıkanan hücreler tekrar 4 ^{0}C'de, 1200 rpm'de, 5 dakika santrifüj edildikten sonra sıvı azot içerisinde dondurulmuş ve ılık su içerisinde eritme işlemine tabii tutulmuştur. Bu işlem 3 kez tekrarlanarak hücre zarlarının kırılması ve hücre içeriğinin dışarı çıkması sağlanmıştır. Ardından örnekler 4 ^{0}C'de, 3000 rpm'de, 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatantlar 1,5 mL'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır.

Kit içerisinden çıkan standart solüsyonundan (200 ng/mL) 8 adet her biri bir öncekinin ½' si oranında ara dilüsyonlar hazırlanmıştır. (100 ng/ml, 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12.5 ng/ml, 6.25 ng/ml, 3.12 ng/ml, 1.56 ng/ml, 0 ng/ml). Kit içerisinden çıkan Biotin bağlı ASAH1 antikoru kaplı kültür kabına standart dilüsyonları ve örneklerden 100 µL eklenerek 2 saat boyunca karanlıkta 37 ^{0}C'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda kültür kabı ters çevrilerek içeriği dökülmüştür. 100 µL belirleme reaktifi A'dan her bir kuyuya eklenmiş ve 1 saat boyunca 37 ^{0}C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında tüm içerik ters çevrilerek dökülmüştür. Yıkama solüsyonundan her bir kuyuya 350 µL eklenerek 1 bekletilmiş ve içerik uzaklaştırılmıştır. 3 kez yıkama işlemi yapıldıktan sonra belirleme reaktif B'den 100 µL her bir kuyuya eklenmiş ve 37 ^{0}C'de, 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda yıkama işlemi 5 kez yapılmıştır. Her bir kuyuya 90 µL 3,3′,5,5′-Tetramethylbenzidine (TMB) substratı solüsyonundan eklenmiş ve karanlık ortamda 37 ^{0}C'de 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Süre sonunda her kuyuya 50 µL reaksiyon durdurma solüsyonundan eklenmiştir. Son olarak 405 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında okuma yapılmıştır. Doz grupları kontrol grubuna göre kıyaslanarak GraphPad Prism 6 programında t-testi ile analiz edilmiş ve anlamlılık dereceleri ölçülmüştür (* : $p<0.05$).

3.10. Seranib-2'nin *CASP3, CASP9, BAX* ve *BCL-2* Genlerinin İfadesi Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

Seranib-2'nin farklı dozları ile muamele edilen A549 ve H460 hücre dizilerindeki apoptotik hücre ölümünde anahtar rol oynayan *CASP3*, *CASP9*, *BAX* ve *BCL-2* gen ekspresyonlarının düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile belirlenmiştir.

Deneyde A549 hücrelerinde seranib-2'nin seçilen 10, 25 ve 50 µM dozları, H460 hücrelerinde ise 5, 10 ve 25 µM dozları çalışılmıştır. Ayrıca sadece besiyeri içeren kontrol grubu oluşturulmuştur.

Hücre sayımının ardından 25 cm$^{2'}$lik kültür kaplarına 1x10^6 hücre olacak şekilde ekilmiş ve 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Ardından seçilen seranib-2 dozlarıyla hücreler 24 saat süre ile muamele edilmiştir. Süre sonunda tripsin ile kaldırılan hücreler

santrifüj tüpüne aktarılarak 4 ^{0}C'de, 1200 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantı uzaklaştırılan örnekler sonra 1 mL PBS içerisinde süspanse edilmiş ve 4 ^{0}C'de, 1200 rpm'de, 5 dakika tekrar santrifüj edilmiştir.

3.10.1. RNA izolasyonu

RNA izolasyonu için High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche) kullanılmıştır. Santrifüj edilen örneklerden PBS uzaklaştırıldıktan sonra her bir tüpe 400 µL olacak şekilde liziz tamponu ilave edilerek vortekslenmiştir. Kit içerisinden çıkan toplama tüplerine filtre tüpleri geçirilerek lizatlar filtre tüplerine aktarılmış ve 4^{0}C'de, 8000 g'de, 15 saniye santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonunda toplama tüpünde biriken içerik dökülmüştür. Her örnek için 10 µL DNase + 90 µL DNase inkübasyon tamponu hazırlanarak her bir tüpe 100 µL eklenmiş ve 15 dakika inkübe edilmiştir. Süre sonunda filtre tüplerine 500 µL Yıkama Tamponu I eklenmiş ve 4^{0}C'de, 8000 g'de, 15 saniye santrifüj yapılmıştır. Toplama tüpündeki içerik dökülmüş ve 500 µL Yıkama Tamponu II eklenerek 4^{0}C'de, 8000 g'de, 15 saniye santrifüj yapılmıştır. Tekrar toplama tüpündeki içerik dökülmüş ve 200 µL Yıkama Tamponu II eklenerek 4^{0}C'de, 13000 g'de, 2 dakika santrifüj yapılmıştır. Filtre tüpleri steril 1,5 ml'lik eppendorf tüplere geçirilmiş ve 50 µL Ayrıştırma Tamponu eklenerek 4^{0}C'de, 8000 g'de, 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Eppendorf tüplerde toplanan tüm RNA örneklerinin Nanodrop (Thermo) cihazında ölçümleri yapılmış ve cDNA sentezi için 100 ng/µl RNA örneği kullanılmıştır.

3.10.2. cDNA sentezi

cDNA sentezi için Transcriptor First Strand cDNA Sentez Kiti (Roche) kullanılmıştır. İlk olarak 1µg/10µL RNA örneği, 1 µL random hekzamer ile karıştırılarak (toplam hacim 11 µL) gerçek zamanlı PZR cihazında 65^{0}C'de, 10 dakika inkübe edilmiştir. Ardından cDNA reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

Random hekzamer ile inkübasyondan sonra her örneğe 9 µL Çizelge 3.4'te belirtilen cDNA reaksiyon karışımından eklenmiş (toplam hacim 20 µL) ve PZR cihazında Çizelge 3.5'te belirtildiği gibi toplamda 1 saat 17 dakika inkübe edilmiştir. cDNA sentezinin ardından örnekler 1/5 oranında sulandırılmıştır.

Çizelge 3. 4. cDNA reaksiyon karışımı bileşenleri

Malzemeler	Final Konsantrasyon	Miktar
5X Tampon	1,25X	4 µL
10mM dNTP	1mM	2 µL
0,1 M DTT	0,1 M	1 µL
Ters transkriptaz enzimi	20 Unit	1 µL
RNase inhibitörü	40 Unit	1 µL

Çizelge 3. 5. cDNA sentezi protokolü

40 ^{0}C	Ramp: 5	600 saniye
55 ^{0}C	Ramp: 5	3600 saniye
85 ^{0}C	Ramp: 3	420 saniye

3.10.3. Gerçek zamanlı PZR yöntemi ile gen ekspresyonlarının belirlenmesi

CASP3, CASP9, BAX ve *BCL-2* genlerinin mRNA ifade düzeyleri, gerçek zamanlı PZR yöntemi ile belirlenmiştir. Referans (housekeeping) gen olarak *HPRT1* geni kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerlerin listesi Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çalışmada FastStart Essential DNA Green Master kiti (Roche) kullanıldı. Toplam 10 µL hacim içerisinde; 2,5 µl cDNA, 0,5 µl forward primer, 0,5 µl reverse primer, 5 µl Syber Green Master karışımı ve 1,5 µl apirojenik su kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Ardından amplifikasyonlar Light Cycler (Roche) cihazı kullanılarak gerçekleştirildikten sonra (Çizelge 3.7) Ct değerleri elde edilmiştir. Sonrasında housekeeping Ct değerinden hedef genlerin Ct değeri çıkartılarak ($Ct_{housekeeping}$– $Ct_{hedef\ gen}$) ΔCt değeri bulunmuştur. Ardından ΔΔCt hesaplamak için ΔCt değerlerinden her genin kendine ait kontrol grubunun ΔCt değeri çıkarılmıştır ($\Delta Ct_{hedef\ örnek}$-$\Delta Ct_{hedef\ kontrol}$). Son olarak elde edilen ΔΔCt değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesaplamıştır (Livak ve Schmittgen, 2001). İstatistiksel analizler GraphPad Prism 6 programında $2^{-\Delta\Delta Ct}$ verileri kullanılarak t-testi ile yapılmıştır. (*:$p<0.05$).

Çizelge 3. 6. Çalışmada kullanılan primer dizileri

Primer	Yönü (5'→3')	Uzunluk (bp)	Dizi
CASP3	**Forward**	18	5' CTGGTTTTCGGTGGGTGT 3'
	Reverse	23	5' CCACTGAGTTTTCAGTGTTCTCC 3'
CASP9	**Forward**	20	5' GGAAGCCCAAGCTCTTTTTC 3'
	Reverse	19	5' AAGTGGAGGCCACCTCAAA 3'
BAX	**Forward**	18	5' CAAGACCAGGGTGGTTGG 3'
	Reverse	18	5' CACTCCCGCCACAAAGAT 3'
BCL-2	**Forward**	18	5' TACCTGAACCGGCACCTG 3'
	Reverse	20	5' GCCGTACAGTTCCACAAAGG 3'

Çizelge 3. 7. Gerçek zamanlı PZR yöntemi protokolü

Denatürasyon (1 döngü)	95^0C	Ramp: 5	600 saniye
3 Aşamalı amplifikasyon (45 döngü)	95^0C	Ramp: 5	20 saniye
	60^0C	Ramp: 4	20 saniye
	72^0C	Ramp: 5	45 saniye
Erime (Melting) (1 döngü)	65^0C	Ramp: 4	60 saniye
	95^0C	Ramp: 0,1	1 saniye

4.BULGULAR VE TARTIŞMA

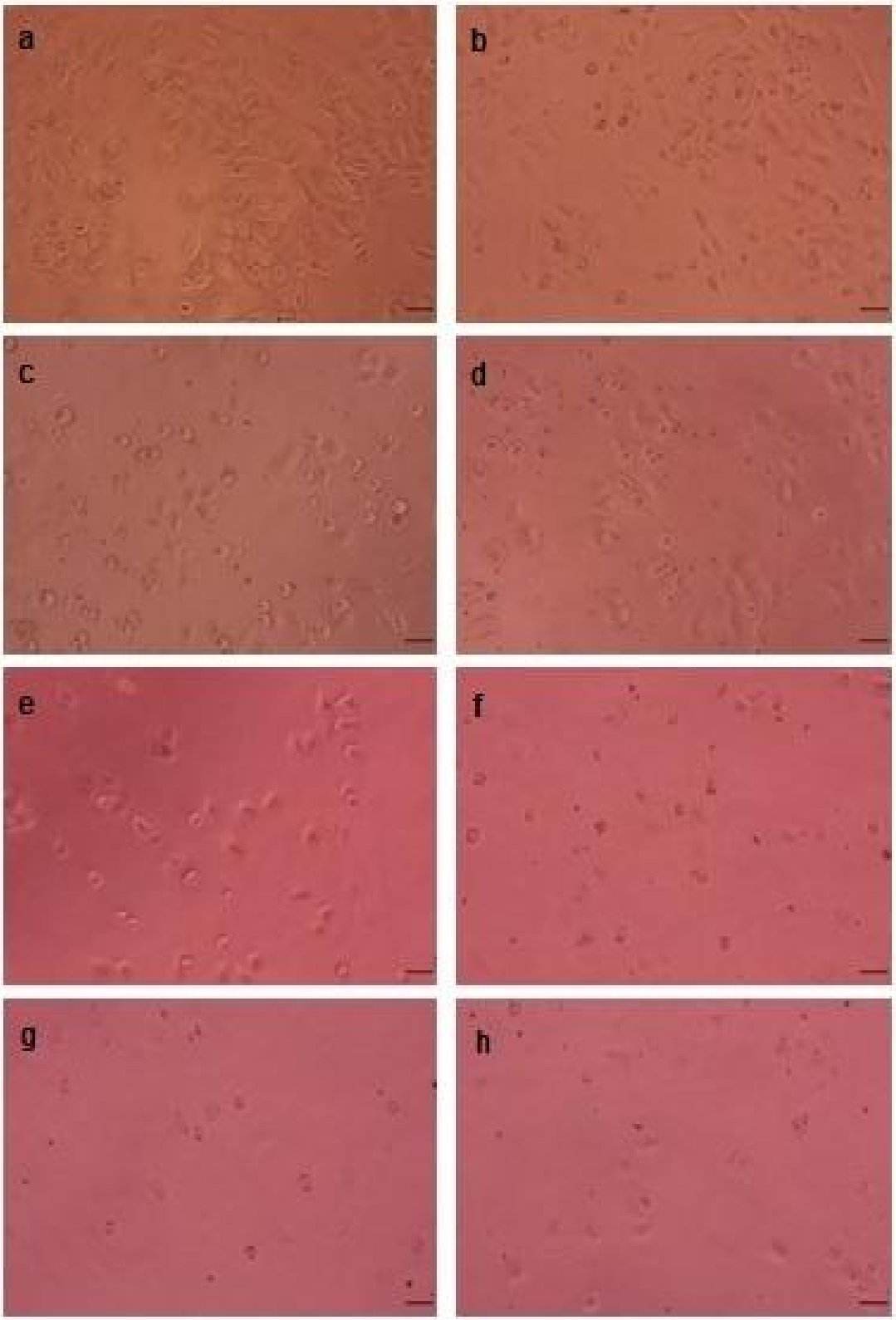
4.1. Seranib-2'nin A549 ve H460 Hücre Hatlarında Hücre Morfolojisi Üzerine Etkilerinin Ters Işık Mikroskobunda Görüntülenmesi

Çalışmada, uygulanan 1, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 µM seranib-2 dozlarının insan epitelyal akciğer adenokarsinomu (A549) ve insan büyük hücreli akciğer karsinomu (H460) hücreleri üzerindeki 24 ve 48 saatlik morfolojik etkileri ters ışık mikroskobu yardımıyla incelenmiştir.

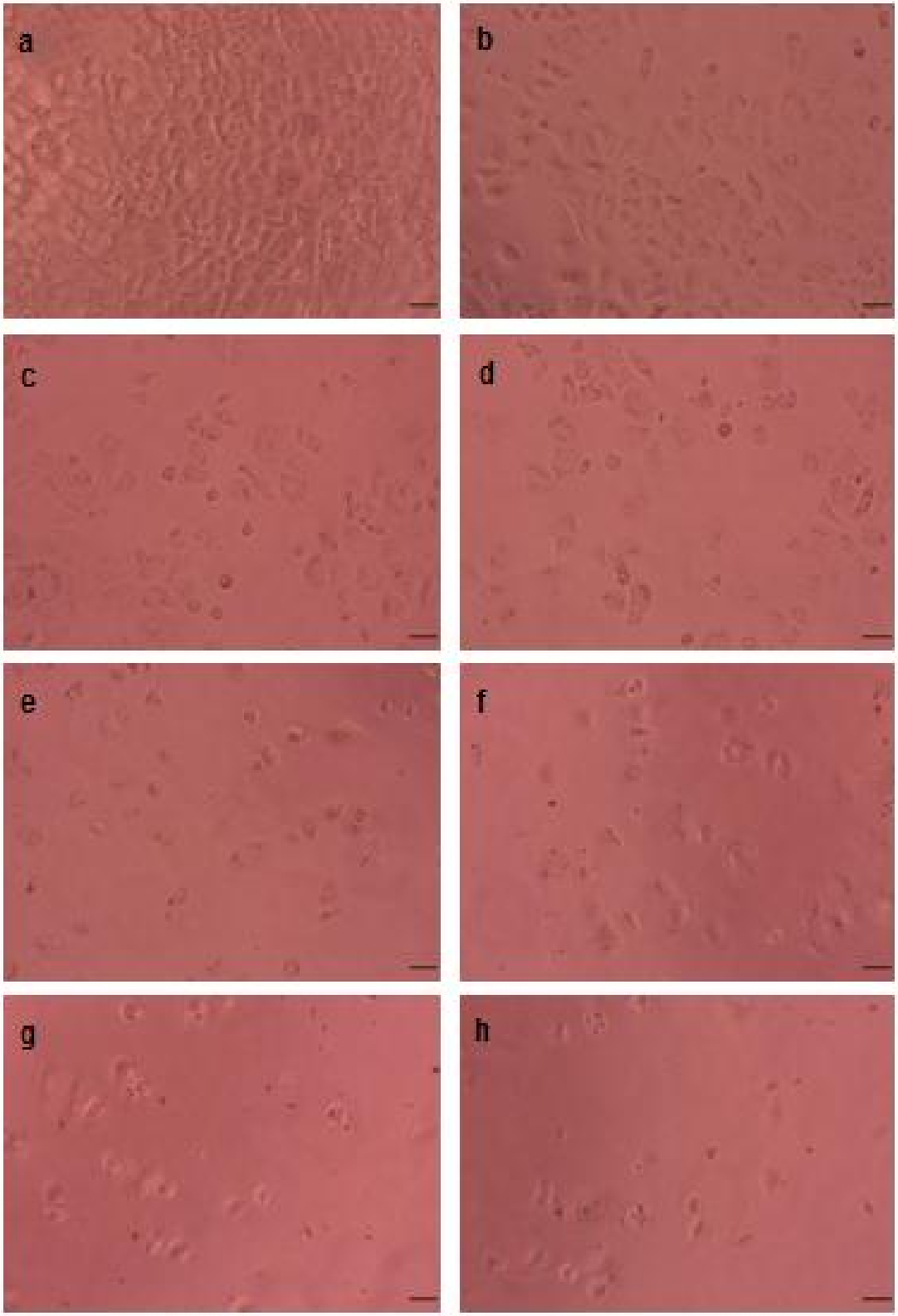
24 ve 48 saat süre ile denenen seranib-2 dozlarının A549 hücre hattında 1 µM dozundan itibaren doza bağlı olarak artan bir şekilde hücre sayısında azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Ayrıca kontrol hücreleri ile kıyaslandığında doz artışına bağlı olarak hücre morfolojisinde yuvarlaklaşma ve hacimce küçülmenin gerçekleştiği belirlenmiştir (Şekil 4.1; Şekil 4.2).

H460 hücre hattında da seranib-2 ile 24 ve 48 saatlik muamele sonucunda A549 hücre hattında olduğu gibi doz artışına bağlı olarak hücre sayısında azalma olduğu belirlenmiştir. Hücre morfolojisi incelendiğinde ise kontrol hücrelerinin bir arada kümeler oluştururken, seranib-2 dozları uygulanan hücrelerde bu özelliğin doz artışına bağlı olarak ortadan kalktığı, yüksek dozlarda ise hücrelerin birbirinden tamamen ayrıldığı gözlenmiştir (Şekil 4.3; Şekil 4.4).

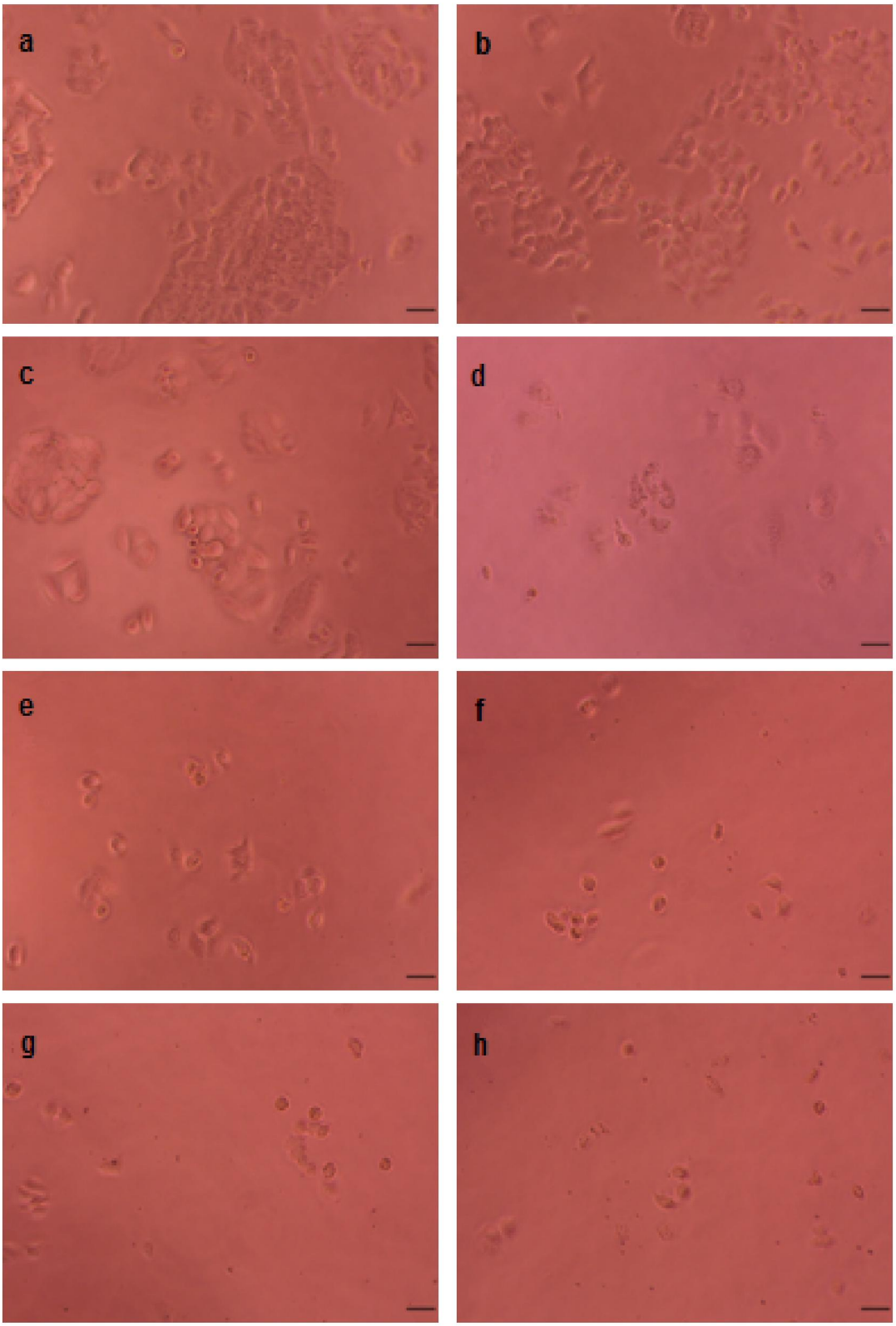
Benzer şekilde insan prostat kanseri (LNCaP) hücrelerinde konfokal mikroskop ile yapılan çalışmada 10, 25, 50 µM seranib-2 ile muamele edilen hücrelerde morfolojik değişikliklerin olduğu, hücrelerin hacimce küçüldüğü ve birbirlerinden ayrıldığı gözlenmiştir (Kuş vd., 2015). Konfokal mikroskop ile yapılan bir başka çalışmada ise fibroblast (NIH/3T3) hücrelerinde de 5 µM seranib-2 uygulanmasının hücre membranında büzülmeye neden olduğu bu sebeple hücrelerin normal morfolojilerini kaybettikleri rapor edilmiştir (Vejselova vd., 2014).



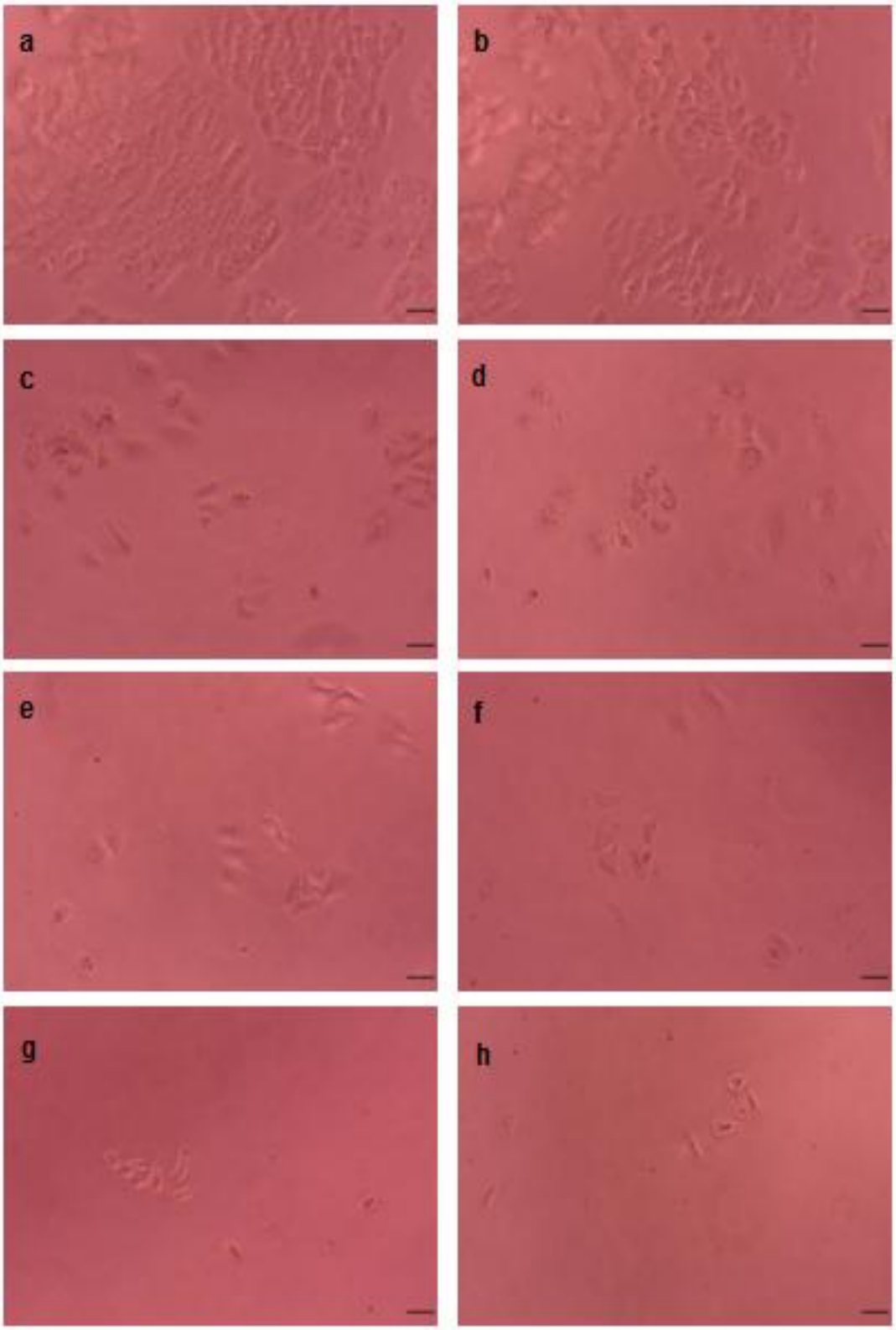
Şekil 4.1. 24 saat süre ile uygulanan seranib-2 dozlarının A549 hücre hattındaki morfolojik etkilerinin görüntülenmesi (100x) (a:Kontrol; b: 1µM; c: 5 µM; d: 10 µM; e: 25 µM; f: 50 µM; g: 75 µM; h: 100 µM).



Şekil 4.2. A549 hücre hattına 48 saat süre ile uygulanan seranib-2 dozlarının morfolojik etkilerinin görüntülenmesi (100x) (a:Kontrol; b: 1µM; c: 5 µM; d: 10 µM; e: 25 µM; f: 50 µM; g: 75 µM; h: 100 µM).



Şekil 4.3. H460 hücre hattında seçilen seranib-2 dozlarının 24 saat süreyle uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimler (100x) (a:Kontrol; b: 1µM; c: 5 µM; d: 10 µM; e: 25 µM; f: 50 µM; g: 75 µM; h: 100 µM).

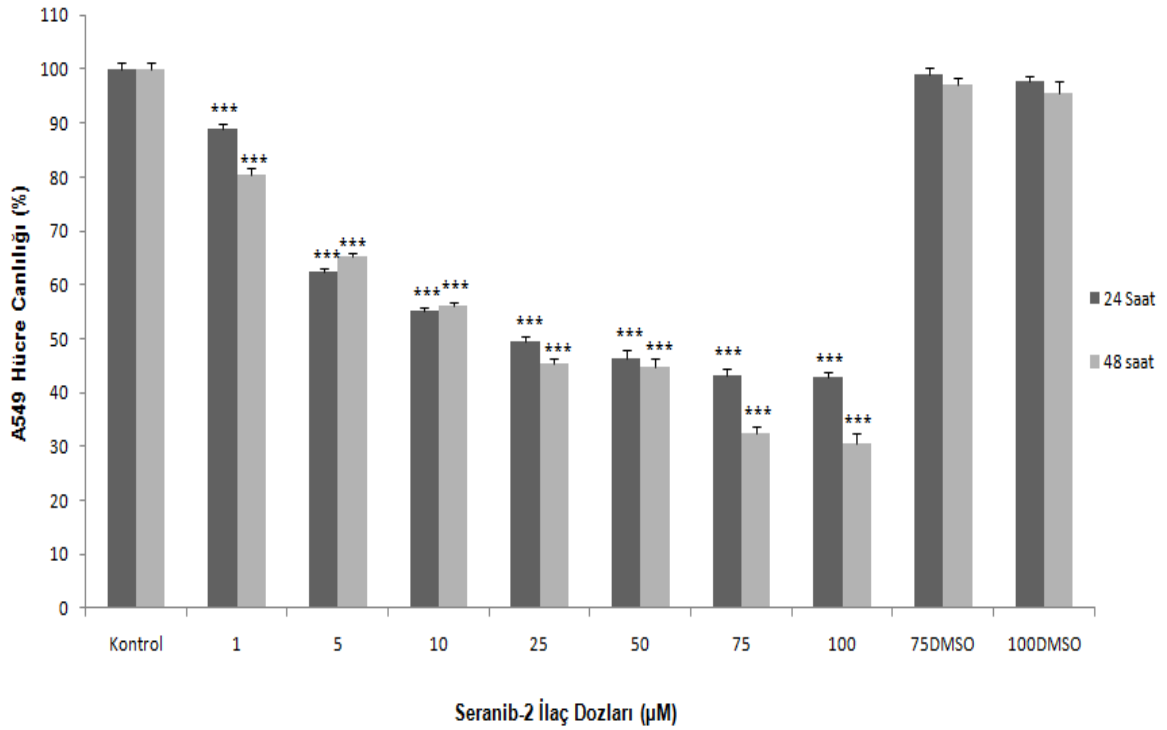


Şekil 4.4. H460 hücre hattında seçilen seranib-2 dozlarının 48 saat süreyle uygulanması sonucunda kontrol grubuna kıyasla hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimler (100x)(a:Kontrol; b: 1µM; c: 5 µM; d: 10 µM; e: 25 µM; f: 50 µM; g: 75 µM; h: 100 µM).

4.2. Seranib-2'nin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Çalışmada A549 ve H460 hücre dizilerine 1, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 µM seranib-2 dozları ile en yüksek dozlar olan 75 ve 100 µM için sadece DMSO içeren çözücü kontrol dozları 24 ve 48 saat süre ile uygulanmıştır.

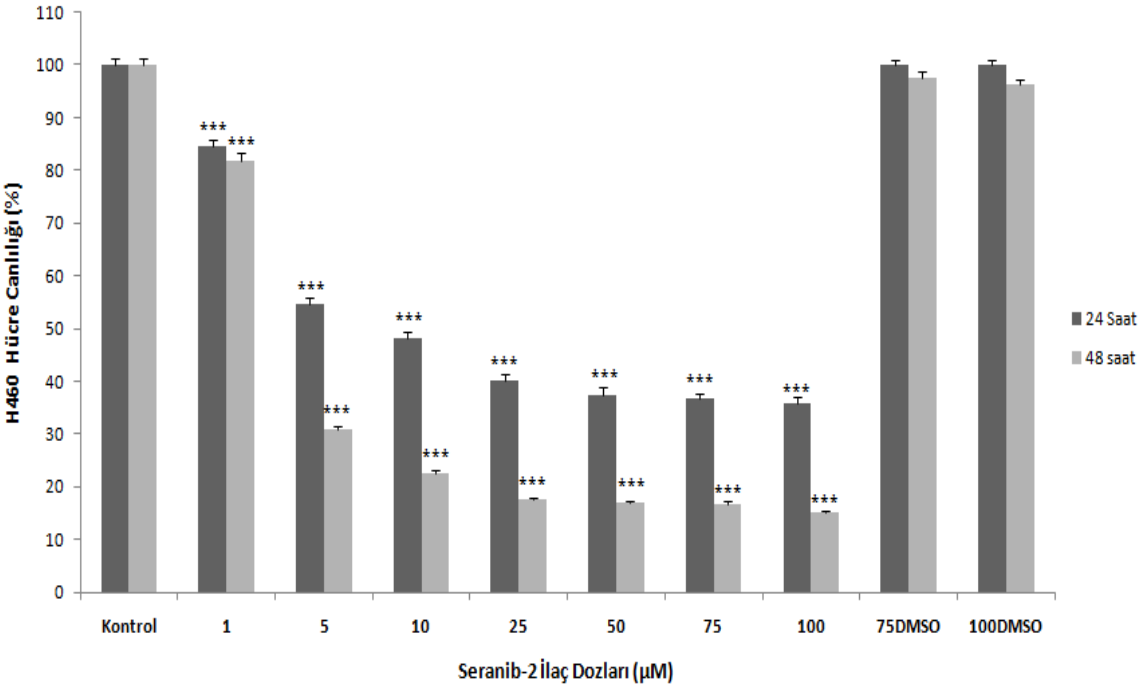
A549 hücre hattında 24 saat süre ile denenen seranib-2 dozlarının % 12, 38, 45, 51, 54, 57 ve 58 oranında hücre canlılığında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$; Şekil 4.5). Kontrole göre % 50 oranında hücre ölümüne neden olan doz olarak ifade edilen IC_{50} değeri 24 saat için 22 µM olarak hesaplanmıştır. 48 saat süre ile denenen seranib-2 dozlarının % 20, 35, 44, 55, 56, 68 ve 70 oranında hücre yaşam oranında azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$; Şekil 4.5). Kontrole göre % 50 oranında hücre ölümüne neden olan doz olarak ifade edilen IC_{50} değeri ise 48 saat için 18 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 5. Seranib-2 dozları ile 24-48 saat süre ile muamele edilen A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: $p<0,001$).

Denenen seranib-2 dozlarının H460 hücre hattında 24 saat süre ile uygulanması sonucunda hücre canlılığında sırasıyla % 16, 46, 52, 60, 63, 64 ve 65 oranında azalmaya

neden olduğu belirlenmiştir ($p<0,001$; Şekil 4.6). IC_{50} değeri ise 24 saat için 8 µM olarak hesaplanmıştır. 48 saatlik uygulama sonucunda ise hücre canlılığının sırasıyla % 19, 70, 78, 83, 84, 85 ve 86 oranında azaldığı hesaplanmıştır ($p<0,001$; Şekil 4.6). 48 saat için IC_{50} değeri 3 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.6. Seranib-2 dozları ile 24-48 saat süre ile muamele edilen H460 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: $p<0,001$).

Ayrıca her iki hücre hattında hem 24 hem de 48 saatlik 75 ve 100 µM çözücü kontrol uygulamalarında kullanılan DMSO miktarının hücre yaşam oranı üzerinde herhangi bir baskılayıcı özellik göstermediği belirlenmiştir ($p>0,05$; Şekil 4.5; Şekil 4.6).

Çalışmamızın sonuçları daha önceki çalışmalardan elde edilen verilerle büyük bir benzerlik göstermektedir. Draper ve ark., yapmış oldukları çalışmada da çalışmamızın bulgularıyla benzer bir şekilde seranib-2'nin farklı dozlarının insan ovaryum kanseri (SKOV3) hücrelerinde 72 saat süre ile muamelesi sonucunda hücrelerin çoğalmasını baskıladığı MTS yöntemi ile gösterilmiştir. Çalışmada 72 saat için IC_{50} değeri 0.73 µM olarak belirlenmiştir (Draper vd., 2011). Diğer bir çalışmada ise H-Ras geniyle transforme edilmiş rat fibroblast (5RP7) hücrelerinde seranib-2'nin 0.1 ve 20 µM arasında değişen dozlarıyla 24 saat ile muamele edilmesi sonucunda hücre canlılığındaki

azalış MTT yöntemi ile tespit edilmiş ve IC_{50} değeri 3 µM olarak hesaplanmıştır (Vejselova vd., 2014). Benzer şekilde insan prostat kanseri (LNCaP, DU145) hücre dizileri ile yapılan başka bir çalışmada ise MTT yöntemiyle seranib-2'nin iki hücre hattında da doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı tespit edilmiştir (Kuş vd., 2015).

KHDAK hücreleri üzerinde (A549 ve H460) ilk defa denen seranib-2'nin benzer şekilde daha önce denenen farklı kanser hücrelerinde olduğu gibi doz artışına bağlı olarak hücre çoğalması üzerinde baskılayıcı bir etkiye neden olduğu ve bu etkinin süre artışı ile daha belirgin bir şekilde ortaya çıktığı görülmüştür. İki hücre hattı karşılaştırıldığında seranib-2'nin H460 hücre dizisi üzerinde hücre çoğalmasını daha düşük dozlarda baskıladığı belirlenmiştir.

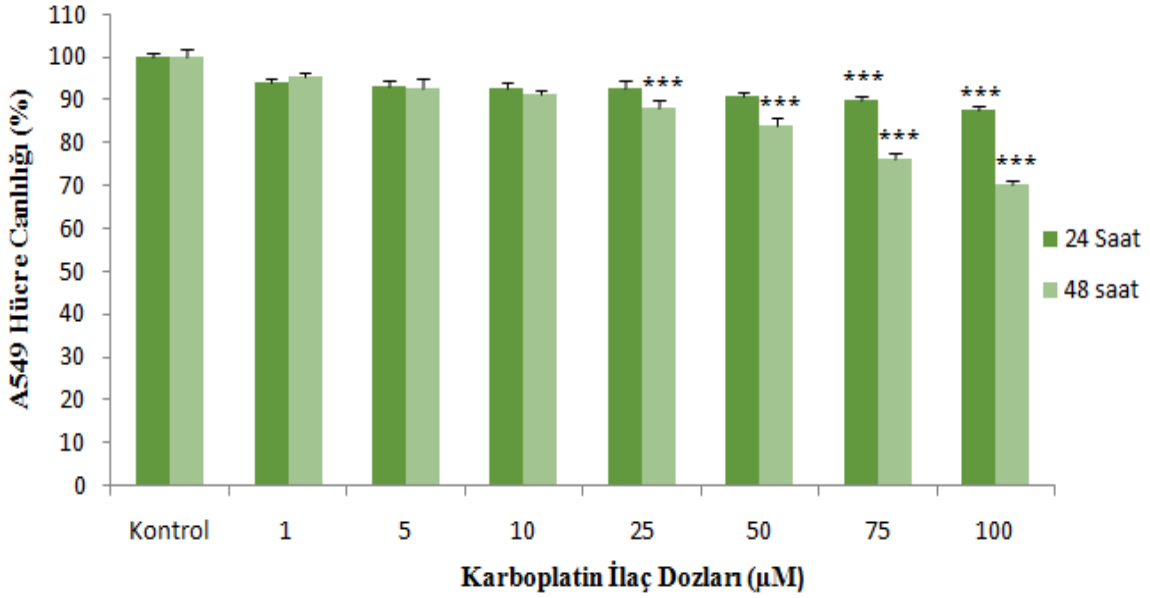
4.3. Karboplatinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Akciğer kanseri tedavisinde platin analoğu olan ilaçlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Klinik kullanıma sunulan ilk platin analoğu sisplatindir. Karboplatin ise sisplatine karboksisiklobutan eklenmesiyle üretilmiş olan bir kemoterapötik ajandır. Biyolojik aktiviteleri karşılaştırıldığında hem karboplatinin hem de sisplatinin DNA' ya eşit miktarda çapraz bağlandığı ve eşit etkinlikte oldukları anlaşılmıştır. Buna ek olarak karboplatinin sisplatine göre yan etkilerinin daha az olduğu rapor edilmiştir (Lokich ve Anderson, 1998). Çalışmada bu nedenle karboplatin pozitif kontrol olarak seçilmiştir.

Karboplatin'in küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre dizileri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla mitokondriyal aktiviteye dayalı kantitatif ölçüm yapılmasını sağlayan MTT yöntemi kullanılmıştır. Çalışmamızda, A549 ve H460 hücre dizilerine 1, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 µM karboplatin dozları 24 ve 48 saat süre ile uygulanmıştır.

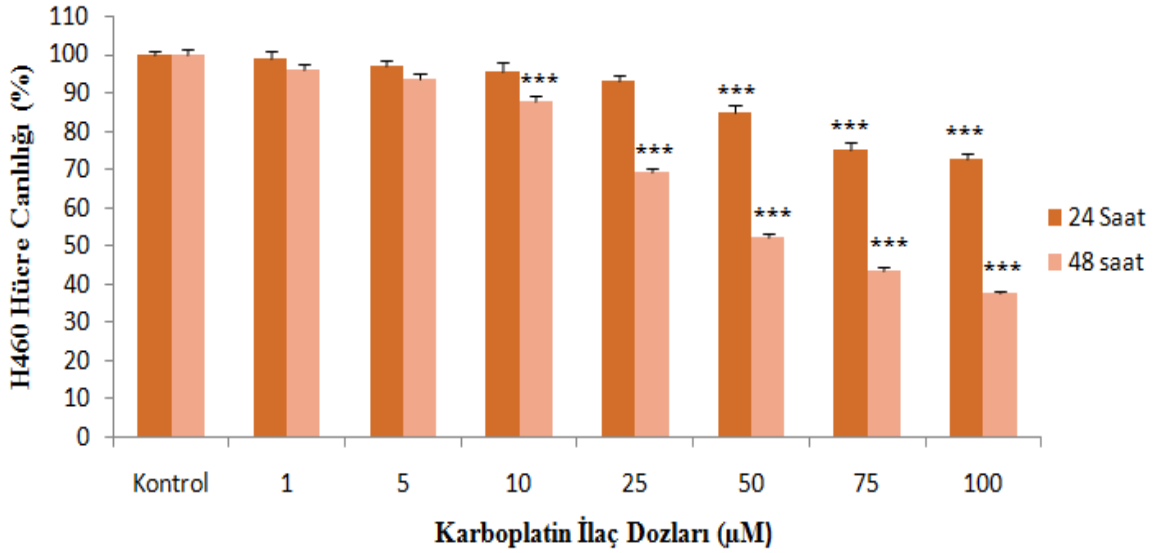
Yapılan deneylerin sonucunda A549 hücre hattında 1, 5, 10, 25 ve 50 µM karboplatin dozlarının 24 saatlik uygulaması sonucunda hücre canlılığı üzerinde çoğalmayı baskılayıcı bir etki göstermediği ($p > 0,05$) belirlenmiştir. 75 ve 100 µM dozlarının ise hücre çoğalmasını kontrole göre sırasıyla % 11 ve 13 oranında azalttığı

tespit edilmiştir (***:p<0,001; Şekil 4.7). Karboplatinin A549 hücreleri ile 48 saat muamelesi sonucunda ise 1, 5 ve 10 µM dozlarında etki gözlenmezken (p> 0,05); 25, 50, 75 ve 100 µM dozlarında hücre yaşam oranını sırasıyla yaklaşık % 12, 16, 24 ve 30 oranında azalttığı tespit edilmiştir (***:p<0,001; Şekil 4.7). Hem 24 hem de 48 saat için herhangi bir IC_{50} değeri hesaplanamamıştır.



Şekil 4.7. Karboplatin dozları ile 24-48 saat süre ile muamele edilen A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: p<0,001).

H460 hücreleri ile 24 saat karboplatin uygulamasında 1, 5, ve 10 µM dozlarında hücre çoğalmasını baskılayıcı bir etki gözlenmemesine rağmen (p> 0,05), 25, 50, 75 ve 100 µM dozlarında hücre yaşam oranını kontrole göre sırasıyla % 7, 16, 25 ve 28 oranında azalttığı tespit edilmiştir. (***:p<0,001; Şekil 4.8). 48 saatlik uygulaması sonucunda ise 1 ve 5 µM dozlarında sitotoksik bir etki gözlenmezken (p> 0,05) diğer dozlarda sırasıyla % 13, 31, 48, 57 ve 63 oranında hücre canlılığında azalma tespit edilmiştir (***:p<0,001; Şekil 4.8). IC_{50} değeri 24 saat için bulunamazken, 48 saat için 55 µM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.8. Karboplatin dozları ile 24-48 saat süre ile muamele edilen A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: p<0,001).

Akciğer kanseri ile yapılmış farklı çalışmalarda da kullanılan maddelerin hücre çoğalmasını baskılayıcı etkilerinin karşılaştırılması amacıyla karboplatin sıklıkla pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır. Örneğin; A549 hücre hattında yapılan bir çalışmada karboplatinin 48 saat süre ile uygulanması sonucunda IC_{50} değeri 141 µM olarak hesaplanmıştır (Liu vd., 2013). A549 hücre hattında yapılan farklı çalışmalarda ise 72 saatlik uygulama sonucunda karboplatinin IC_{50} değeri 72 (Ye vd., 2009) ve 69 µM (Ye vd., 2010) olarak belirlenmiştir. IC_{50} değerleri arasındaki farklılıkların uygulama süreleri, deney koşulları ve hücre sayılarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Seranib-2 ve karboplatin uygulaması sonuçları karşılaştırıldığında her iki hücre hattında da seranib-2'nin karboplatine göre daha düşük dozlarda sitotoksik etki gösterdiği ve hücre çoğalmasını baskıladığı belirlenmiştir.

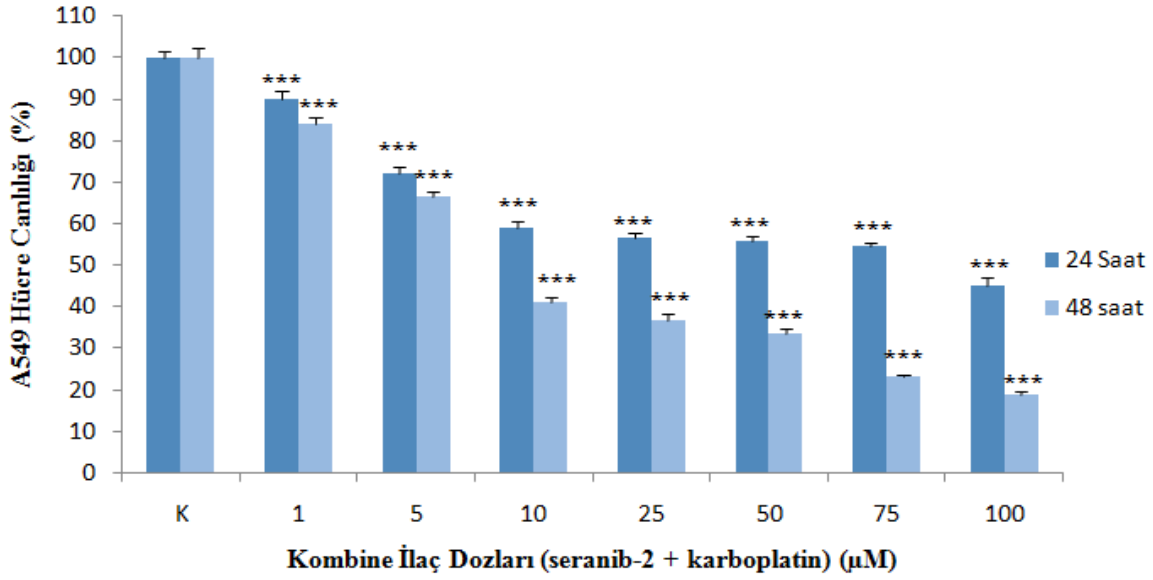
4.4. Karboplatin ve Seranib-2'nin Kombine Olarak Uygulanması Sonucu Oluşan Antagonistik/Sinerjistik Etkinin Belirlenmesi

Bu çalışma için seranib-2 ve karboplatin'in aynı konsantrasyonlardaki dozları 1:1 oranında birleştirilerek 1, 5, 10, 25, 50, 75 ve 100 µM kombine (seranib-2+karboplatin) dozları hazırlanmıştır. A549 ve H460 hücre hatları 24 ve 48 saat süre ile belirlenen dozlar ile muamele edilmiştir. MTT yöntemi sonucu elde edilen veriler kullanılarak seranib-2 ve

karboplatin'in antagonistik/sinerjistik etkileşimleri ilaç etkileşimi kat sayıları CDI= (Kombine doz absorbansı/ seranib-2 absorbansı x karboplatin absorbansı) x100 formülüyle hesaplanarak belirlenmiştir.

Yapılan deneylerin sonucunda A549 hücre hattında kombine tedavinin 24 saat süreyle uygulanması sonucunda hücre canlılığında sırasıyla % 10, 28, 41, 44, 45, 46 ve 55 oranında azalma tespit edilmiştir ($p<0,001$). IC_{50} değeri 86 µM olarak hesaplanmıştır. Kombine tedavinin 48 saat süreyle uygulanması sonucunda ise hücre canlılığında sırasıyla % 17, 34, 59, 64, 67, 77 ve 81 oranında azalma tespit edilmiştir ($p<0,001$). IC_{50} değeri ise 48 saat için 8 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9).

A549 hücre hattında 24 saatlik seranib-2, karboplatin ve kombine (seranib-2+karboplatin) uygulamaları karşılaştırıldığında; seranib-2' de IC_{50} değeri 22 µM olarak hesaplanmasına rağmen karboplatin uygulamasında herhangi bir IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. İki ilaç kombine halde aynı hücre grubuna uyguladığında ise IC_{50} değeri 86 µM olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre karboplatin seranib-2 ile kombine olarak uygulandığında seranib-2'nin etkinliğini belirgin bir şekilde azaltmıştır.



Şekil 4.9. A549 hücrelerinde 24 ve 48 saatsüre ile uygulanan kombine tedavinin sitotoksik etkisinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: $p<0,001$).

A549 hücre hattında seranib-2, karboplatin ve kombine (seranib-2+karboplatin) uygulamaları karşılaştırıldığında ise; seranib-2' de 48 saatlik uygulamada IC_{50} değeri 18 µM olarak hesaplanmasına rağmen, karboplatin uygulamasında herhangi bir IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Kombine uygulanan grupta ise IC_{50} değerleri 8 µM olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre seranib-2'nin karboplatin ile birlikte 48 saat süre ile kombine uygulanmasının A549 hücre hattının çoğalması üzerinde daha toksik bir etkiye neden olduğu belirlenmiştir.

A549 hücre hattında ilaç etkileşimi katsayısı formülüne göre yapılan hesaplama sonucunda 24 saatte karboplatin ve seranib-2 arasında antagonistik bir etkileşim oluşurken, 48 saatte 10 µM dozundan itibaren iki ilaç birlikte çalışarak sinerjistik bir etki gösterdiği hesaplanmıştır (sinerjistik etki: CDI< 1, antagonistik etki: CDI>1) (Şekil 4.10).

A549 24 saat				
	Seranib-2	Karboplatin	Kombine	CDI
Kontrol	100	100	100	
1 µM	88,86	93,97	90,01	1,08
5 µM	62,55	93,01	72,2	1,24
10 µM	55,21	92,87	59,1	1,15
25 µM	49,61	92,72	56,58	1,23
50 µM	46,33	91,01	55,76	1,32
75 µM	43,17	89,95	54,46	1,40
100 µM	42,88	87,5	45,24	1,21

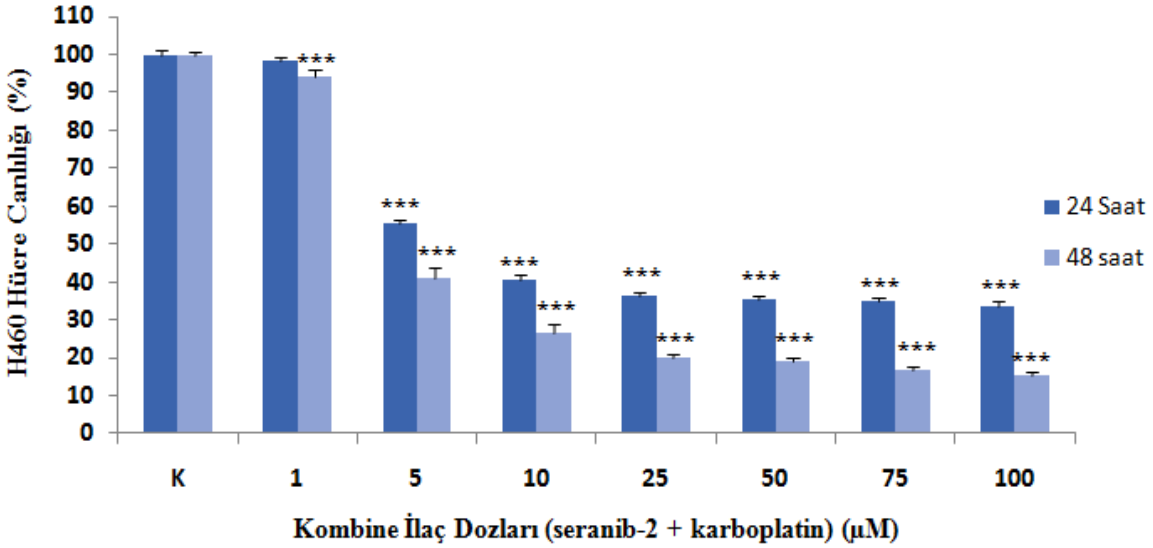
A549 48 saat				
	Seranib-2	Karboplatin	Kombine	CDI
Kontrol	100	100	100	
1 µM	80,46	95,44	83,97	1,09
5 µM	65,3	92,56	66,69	1,10
10 µM	56,06	91,36	41,16	0,80
25 µM	45,28	88,33	36,91	0,92
50 µM	44,72	84,05	33,63	0,89
75 µM	32,34	76,13	23,36	0,95
100 µM	30,54	70,33	19,01	0,89

*CDI= (Kombine / Seranib-2 x Karboplatin) x100

Şekil 4.10. A549 hücre hattında seranib-2, karboplatin ve kombine (seranib-2+karboplatin) tedavi uygulamalarının 24 ve 48 saatlik hücre sağkalımı oranları (%),Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir. CDI: İlaç etkileşimi katsayısı.

Kombine tedavinin H460 hücre hattında 24 saat süreyle uygulanması sonucunda 1 µM dozunda etki görülmezken ($p>0,05$) diğer dozlarda hücre canlılığında sırasıyla %45, 60, 64, 65, 66 ve 67 oranında azalma tespit edilmiştir ($p<0,001$). IC_{50} değeri 7 µM olarak hesaplanmıştır. 48 saatlik uygulama sonucunda ise hücre canlılığında sırasıyla % 7, 59, 74, 80, 82, 84 ve 85 oranında azalma tespit edilmiştir ($p<0,001$). IC_{50} değeri ise 48 saat için 4 µM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.11).

H460 hücre hattında seranib-2, karboplatin ve kombine (seranib-2+karboplatin) uygulandığında ise; seranib-2' de 24 saatlik uygulamada IC_{50} değeri 8 µM olarak hesaplanmasına rağmen, karboplatin uygulamasında herhangi bir IC_{50} değeri hesaplanamamıştır. Kombine tedavi uygulanan grupta ise IC_{50} değerleri 7 µM olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre seranib-2'nin karboplatin ile birlikte 24 saat süre ile kombine uygulanmasının H460 hücre çoğalması üzerinde belirgin bir değişikliğe neden olmadığı hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. H460 hücrelerinde 24 ve 48 saat süre ile uygulanan kombine tedavinin sitotoksik etkisinin mitokondriyal aktivite bakımından değerlendirilmesi. Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir (***: $p<0,001$).

Seranib-2, karboplatin ve kombine (seranib-2+karboplatin) uygulamaları 48 saat süre ile denendiğinde H460 hücre hattında; seranib-2' de IC_{50} değeri 3µM, karboplatin uygulaması sonucunda IC_{50} değeri 55 µM ve kombine uygulanan grupta ise IC_{50} değerleri 4 µM olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre seranib-2'nin karboplatin ile birlikte 48 saat süre ile kombine uygulanmasının H460 hücre çoğalması üzerinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir.

H460 hücre hattında 24 saatte karboplatin ve seranib-2 arasında yalnızca 10 ve 25 µM dozlarında sinerjistik bir etkileşim oluşurken, 48 saatte iki ilaç arasında antagonistik bir etkileşim gözlenmiştir (sinerjistik etki: CDI< 1, antagonistik etki: CDI>1) (Şekil 4.12).

H460 24 saat				
	Seranib-2	Karboplatin	Kombine	CDI
Kontrol	100	100	100	
1 µM	84,62	98,98	98,23	1,17
5 µM	54,56	96,93	55,47	1,05
10 µM	48,09	95,71	40,58	0,88
25 µM	40,26	93,12	36,21	0,97
50 µM	37,48	84,91	35,32	1,11
75 µM	36,59	75,25	34,75	1,26
100 µM	35,81	72,95	33,69	1,29

H460 48 saat				
	Seranib-2	Karboplatin	Kombine	CDI
Kontrol	100	100	100	
1 µM	81,85	95,93	93,99	1,20
5 µM	30,92	93,93	41,03	1,41
10 µM	22,69	87,83	26,4	1,32
25 µM	17,58	69,39	20,21	1,66
50 µM	16,87	52,21	18,92	2,15
75 µM	16,72	43,51	16,58	2,28
100 µM	15,16	37,56	15,5	2,72

*CDI= (Kombine / Seranib-2 x Karboplatin) x100

Şekil 4.12. H460 hücre hattında seranib-2, karboplatin ve kombine (seranib-2+karboplatin) tedavi uygulamalarının 24 ve 48 saatlik hücre sağ kalımı oranları (%), Kontrol grubu %100 olarak kabul edilmiştir, CDI: İlaç etkileşimi katsayısı.

Yapılan literatür taraması sonucunda seranib-2'nin karboplatin ile birlikte kombine olarak denendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla beraber seranib-2'nin SKOV3hücrelerinde ovaryum kanseri tedavisinde kullanılan paklitaksel ile kombine olarak 72 saat süre ile muamele edildiği rapor edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda seranib-2 ve paklitaksel arasında sinerjistik bir etkileşim olduğu ve seranib-2'nin paklitakselin neden olduğu sitotoksik etkiyi artırdığı tespit edilmiştir (Draper vd., 2011). Farklı hücre hattı ve farklı kemoterapötik ilaçlar kullanılması nedeniyle sinerjistik/antagonistik etkinin değişebileceği görülebilmektedir.

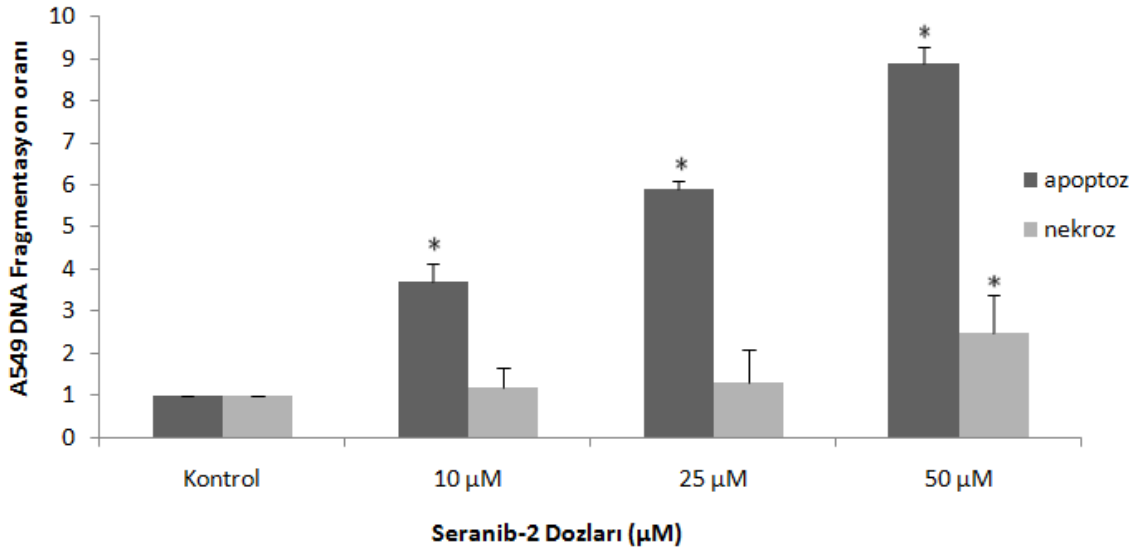
4.5. Apoptotik ve Nekrotik DNA Fragmentasyonunun Kantitatif Olarak ELISA Yöntemiyle Belirlenmesi

Farklı seranib-2 dozları uygulanan A549 ve H460 hücre hatlarındaki apoptotik ve/veya nekrotik hücre ölümü sonucunda oluşan DNA fragmentasyonunu kantitatif olarak belirlemek amacıyla Hücre Ölümü Belirleme ELISA Kiti (Roche) kullanılmıştır.

A549 hücrelerine 10, 25 ve 50 µM, H460 hücrelerine ise 5, 10 ve 25 µM seranib-2 dozları 24 saat süre ile uygulanmıştır. DNA fragmentasyon oranları kit protokolünde

belirtilen formüle göre hesaplanmış olup, ilaç uygulanmayan kontrol hücrelerinin zenginleştirme faktörü 1 (EF_K:1) olarak kabul edilmiştir.

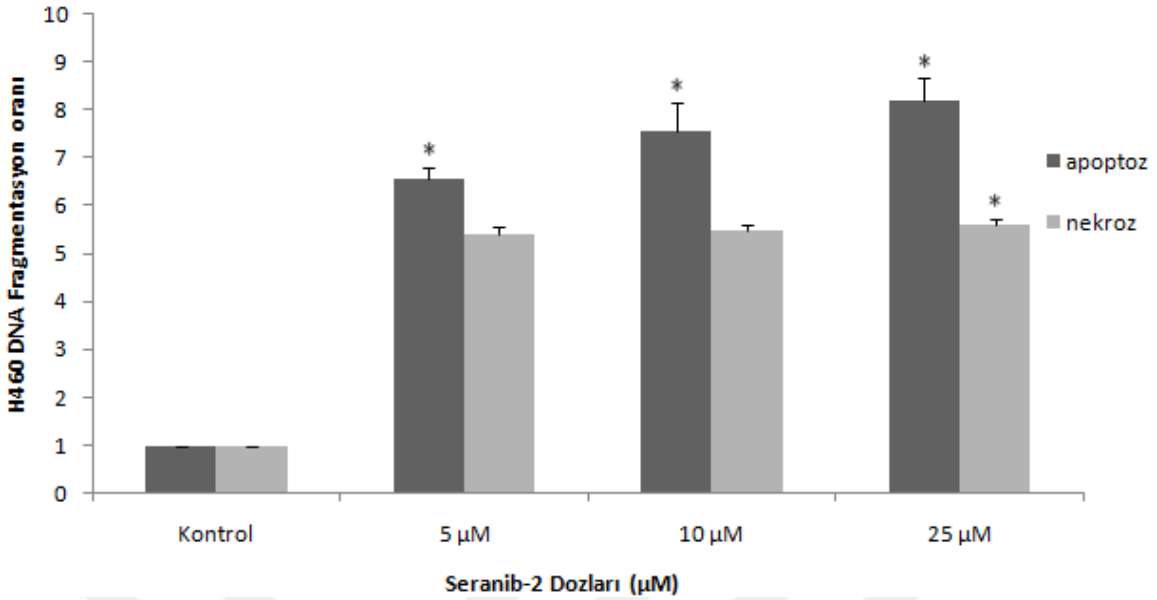
A549 hücre hattında seçilen dozlar kontrol grubu ile kıyaslandığında apoptotik etkinin doza bağlı olarak sırasıyla 3,7; 5,9 ve 8,9 kat arttığı hesaplanmıştır ($p<0,05$). Nekrotik etkinin ise sadece 50 µM dozunda 2,5 kat arttığı ($p<0,05$), diğer dozlarda ise anlamlı bir artış gözlenmediği belirlenmiştir ($p>0.05$; Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Seranib-2 dozları ile 24 saat süre ile muamele edilen A549 hücrelerinde oluşan apoptotik ve nekrotik DNA fragmentasyon oranları (*: $p<0,05$). Kontrol grubunun zenginleştirme faktörü 1 (EF_K:1) olarak kabul edilmiştir.

H460 hücre hattında seçilen dozlar kontrol grubu ile kıyaslandığında ise apoptotik etkinin sırasıyla 6,5; 7,5 ve 8,2 kat arttığı, nekrotik etkinin ise sırasıyla 5,4; 5,5; 5,6 kat arttığı tespit edilmiştir ($p<0,05$; Şekil 4.14).

Uygulanan seranib-2 dozlarının her iki hücre hattında da nekroza kıyasla apoptotik hücre ölümünü daha fazla tetiklediği tespit edilmiştir. Ayrıca A549 hücrelerine göre H460 hücrelerinde apoptotik DNA fragmentasyon oranının doza bağlı olarak daha fazla artış gösterdiği gözlenmiştir.



Şekil 4.14. Seranib-2 dozları ile 24 saat süre ile muamele edilen H460 hücrelerinde oluşan apoptotik ve nekrotik DNA fragmentasyon oranları (*: $p<0,05$). Kontrol grubunun zenginleştirme faktörü 1 (EF_K:1) olarak kabul edilmiştir.

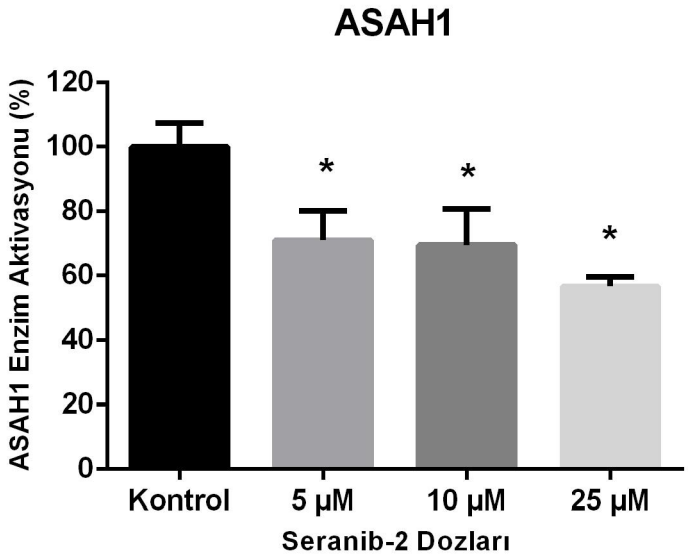
Raisovaa ve ark., HaCat keratinosit ve iki farklı seramid duyarlı melanoma (A375 ve M186) hücre dizilerinde seramidaz inhibitörü olan D-NMAPPD ile 24 saat boyunca 25 µM dozunu uygulamış ve HaCat keratinositlerinde kontrol hücrelerine kıyasla 7,5 kat, A375 hücrelerinde 3,5 kat ve M186 hücrelerinde 3 kat daha fazla apoptotik DNA fragmentasyonu gözlemlemişlerdir (Raisovaa vd., 2002). Furlong ve ark., T-lösemi (Jurkat ve CCRF-CEM) hücreleri ile Lfcin B ve seramidaz inhibitörü D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol'ün (MAPP) 25 ve 50 µM dozlarının kombine dozları ile 12 saat muamele edilmesi sonucunda yalnız Lfcin B uygulamasına kıyasla sitotoksik etkide ve apoptotik DNA fragmentasyonunda artış tespit etmişlerdir (Furlong vd., 2008). Farklı seramidaz inhibitörleri kullanılarak yapılan çalışmalarda da seramidaz enziminin inhibe edilmesinin DNA'ya hasar verdiği ve apoptotik süreci başlattığı görülmektedir. Çalışmamızda kullanılan sermidaz inhibitörü seranib-2'nin de benzer şekilde etki gösterdiği gözlenmiştir.

Hücre içerisinde artan seramid miktarının A20 B lenfoma, Jurkat T lösemi, fare makrofaj (RAW 264.7), sıçan fibroblast (L929) ve fare epidermal tümör (JB6) hücrelerinde serbest radikal artışına bağlı olarak apoptozun yanı sıra pogramlı nekroza neden olduğu da tespit edilmiştir (Villena vd., 2008; Ardestani vd., 2013; Davis vd.,

2000). Benzer şekilde çalışmamızda da nekrotik bir etki gözlenmiştir. Bu nekrotik etkinin apoptotik etkiye oranla daha az olduğu hesaplanmıştır.

4.6. Seranib-2'nin Asit Seramidaz Aktivitesi Üzerine Etkisinin ELISA yöntemiyle Belirlenmesi

Çalışmada seçilen seranib-2 dozlarının H460 hücrelerinde asit seramidaz aktivitesi üzerindeki etkisi İnsan ASAH 1 ELISA Deney Kiti ile spektrofotometrik olarak tespit edilmiştir. Ayrıca denenen dozların etkilerini kıyaslamak amacıyla sadece besiyeri içeren kontrol grubu oluşturulmuştur.



Şekil 4.15. H460 hücre hattında denenen seranib-2 dozlarının asit seramidaz aktivitesi üzerindeki değişimlerinin değerlendirilmesi (*: $p<0.05$).

Seçilen seranib-2 dozları ile H460 hücreleri 24 saat süre ile muamele edilmiş ve ASAH1 enziminin kontrole kıyasla doz gruplarında sırasıyla % 29, 31 ve 44 oranında doza bağlı olarak azalış gösterdiği hesaplanmıştır. (Şekil 4.15).

Çalışmamızda görüldüğü gibi seranib-2 hücre içerisindeki seramidaz enzimini baskıladığı gösterilmiştir. Benzer bir şekilde Draper ve ark. da, SKOV3 hücrelerini farklı seranib-2 dozları ile 24 saat süre ile muamele ettiklerinde asit seramidaz aktivitesinde 28 µM dozunda %50 oranında azalış tespit etmişlerdir (Draper vd., 2011).

4.7. Seranib-2'nin *CASP3, CASP9, BAX* ve *BCL-2* Genlerinin İfadesi Üzerindeki Etkisinin Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR Yöntemi İle Belirlenmesi

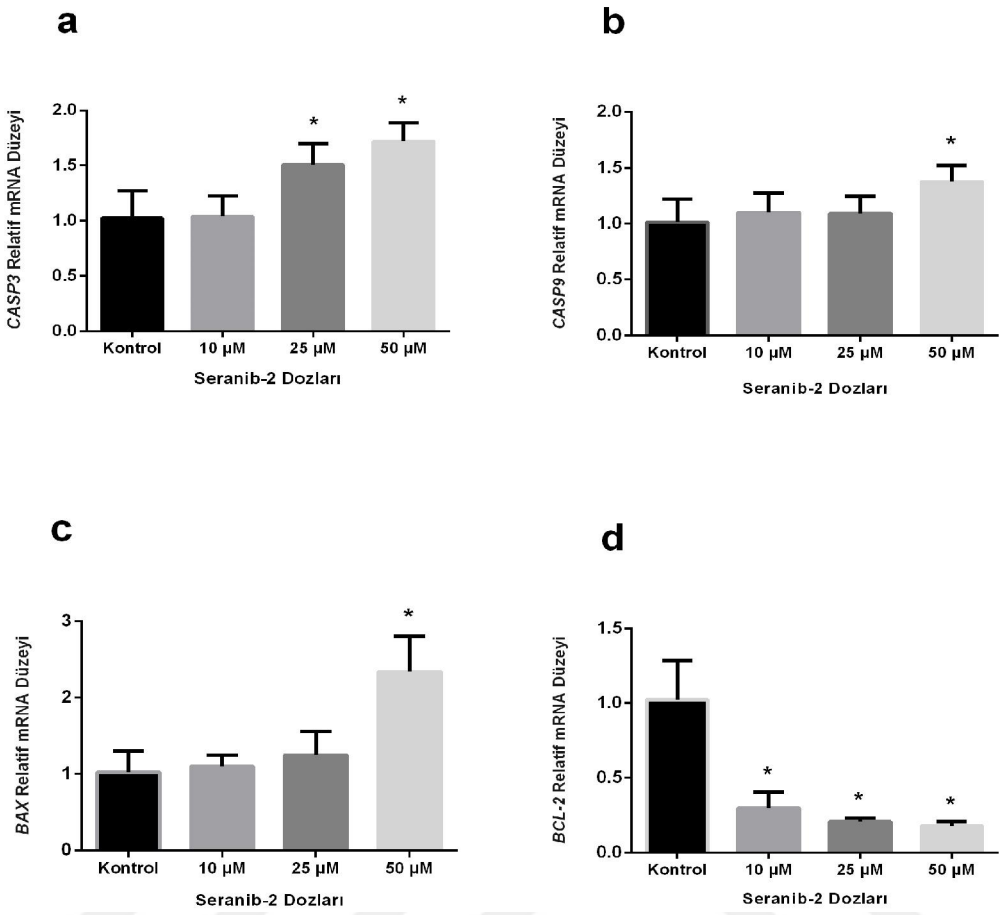
A549 ve H460 hücre hatlarında 24 saat süreyle uygulanan farklı seranib-2 dozlarında apoptotik hücre ölümünde anahtar rol oynayan *CASP3, CASP9, BAX* ve *BCL-2* genlerinin mRNA ifade düzeyleri kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Genlerin mRNA ifade düzeylerindeki relatif kat artışları $2^{-\Delta\Delta ct}$ formülüne göre hesaplanmıştır. Hedef genlerin ifade düzeyleri *HPRT1* geninin mRNA ifade düzeyine göre normalize edilmiştir.

A549 hücre hattında uygulanan 10, 25 ve 50 µM seranib-2 dozlarında *CASP3* geninin mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığında; 10 µM dozunda anlamlı bir artış görülmemiştir. 25 ve 50 µM dozunda ise doza bağlı olarak sırasıyla 1,5 ve 1,7 kat artış olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$; Şekil 4.16 a).

CASP9 geninin mRNA ifade düzeyinde ise kontrole göre kıyaslandığında 10 ve 25 µM dozlarında anlamlı bir artış görülmezken ($p>0,05$), 50 µM dozunda ise 1,4 kat artış olduğu hesaplanmıştır ($p<0.05$; Şekil 4.16 b).

BAX geninin mRNA ifade düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 10 ve 25 µM dozlarında anlamlı bir etki görülmezken ($p>0,05$), 50 µM dozunda ise 2,4 kat artış olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$; Şekil 4.16 c).

BCL-2 geninin mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığında ise doz artışına bağlı olarak 10, 25 ve 50µM dozlarında sırasıyla 0,7; 0,8 ve 0,9 kat azalış olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$; Şekil 4.16 d).



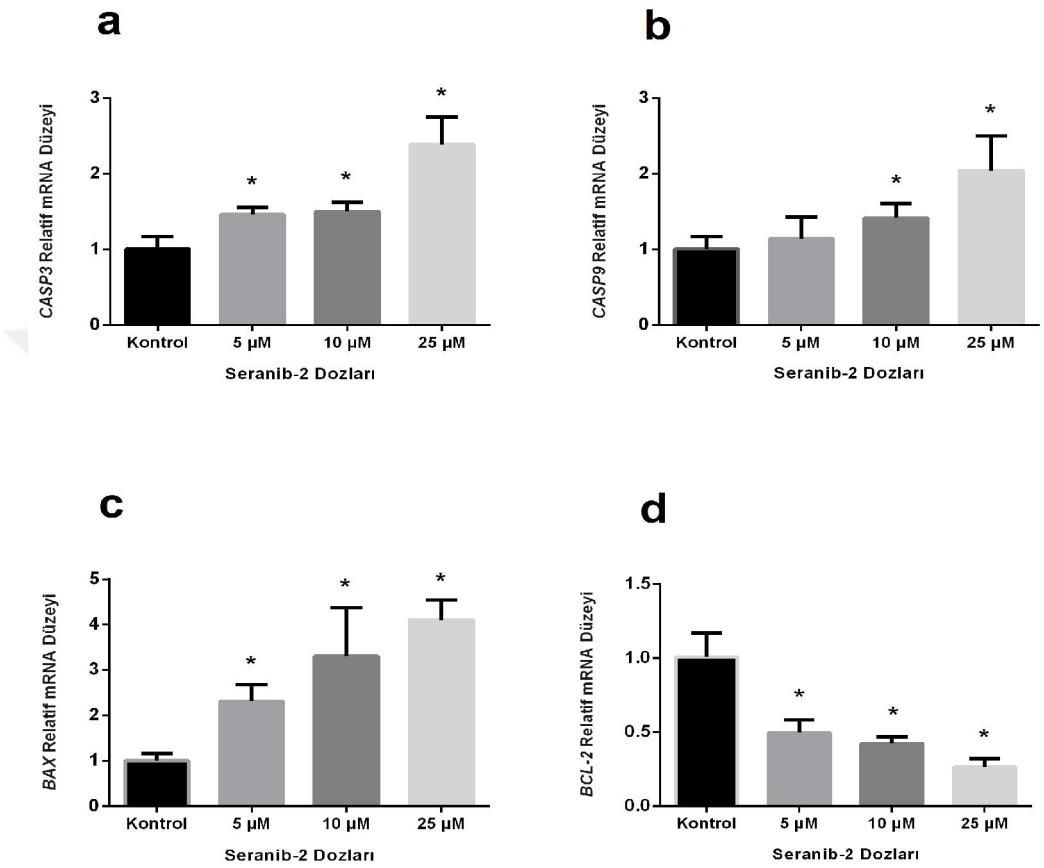
Şekil 4.16. A549 hücrelerinde seranib-2 uygulanması sonucu doza bağlı olarak a:*CASP3*, b: *CASP9,* c: *BAX* ve d: *BCL-2* genlerinin relatif mRNA düzeylerinin oransal değişimi (*:$p<0.05$).

H460 hücre hattında ise 5, 10 ve 25 µM seranib-2 dozları 24 saat süreyle denenmiştir. *CASP3* geninin mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığında sırasıyla 1,4; 1,5 ve 2,4 kat arttığı hesaplanmıştır ($p<0.05$; Şekil 4.17 a).

CASP9 geninin mRNA ifade düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 5 µM dozunda anlamlı bir artış görülmezken ($p>0,05$), 10 ve 25 µM dozlarında ise 1,4 ve 2,1 kat olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$; Şekil 4.17 b).

BAX geninin mRNA ifade düzeyi kontrole göre kıyaslandığında 5, 10 ve 25 µM dozlarında sırasıyla 2,3; 3,3 ve 4,1 kat artış olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$; Şekil 4.17 c).

BCL-2 geninin mRNA ifade düzeyi doz grupları kontrole göre kıyaslandığında ise doza bağlı olarak 5, 10 ve 25 µM dozlarında sırasıyla 0,5; 0,6 ve 0,7 kat azalış olduğu bulunmuştur ($p<0.05$; Şekil 4.17 d).



Şekil 4.17. H460 hücrelerinde seranib-2 uygulanması sonucu doza bağlı olarak a: *CASP3,* b: *CASP9*, c: *BAX* ve d: *BCL-2* genlerinin mRNA düzeylerinin kontrol grubuna göre oransal değişimi (*:$p<0.05$).

Soans ve ark., insan epitelyal akciğer karsinomu (H1299) hücre hattında sfingomiyelinaz enzimini aktifleştirerek hücre içerisindeki seramid miktarını artırmışlardır. Sonuç olarak *CASP3, CASP9* ve *BAX* ekspresyonunda artış belirlerken, *BCL-2* ekspresyonunda azalış tespit etmişlerdir (Soans vd., 2014). Bir diğer çalışmada ise Vethakanraj ve ark., meme kanseri adenokarsinomu (MCF-7 ve MDA-MB-231) hücre hatlarında seranib-2 dozlarının 24 saat süre ile muamele edilmesi sonucunda *BAX* ekspresyonunda artış gözlemlerken, *BCL-2* ekspresyonunda azalış belirlemişlerdir (Vethakanraj vd., 2015). Apoptotik sürecin çalışmasında kritik rol oynayan *CASP3, CASP9, BAX* ve *BCL-2* genlerinin mRNA ifadeleri üzerinde seranib-2'nin etkili olduğu açık bir şekilde çalışmamızın verileriyle de görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kanserli hücrelerde, seramidaz enzim aktivitesinin baskılanması sonucunda apoptotik sürecin indüklenmesi ve oluşan ilaç direncinin kırılmasının keşfedilmesi ile seramidaz enzim inhibitörleri ile yapılan çalışmalar önem kazanmıştır. Bu nedenle bu çalışmada seramidaz enzim inhibitörü olan seranib-2'nin epitelyal akciğer adenokarsinomu (A549) ve epitelyal büyük hücreli akciğer karsinomu (H460) hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak hücre canlılığını azalttığı morfolojik ve spektrofotometrik olarak belirlendi. Ayrıca apoptotik DNA fragmentasyon oranını artırdığı hesaplandı. Apoptotik süreçte rol oynayan kaspaz-3, kaspaz-9 ve Bax genlerinin ekspresyonunda artışa neden olurken, Bcl-2 geninin ekspresyonunda azalışa neden olduğu gözlendi. Seranib-2 ve karboplatin uygulaması sonuçları karşılaştırıldığında her iki hücre hattında da seranib-2'nin karboplatine göre daha düşük dozlarda sitotoksik etki gösterdiği ve hücre çoğalmasını baskıladığı belirlendi. Son olarak seranib-2'nin kemotropötik bir ajan olarak akciğer kanserinin tedavisinde aktif olarak kullanılan karboplatin ile birlikte kombine uygulanması sonucunda oluşturacakları sinerjistik/antagonistik etkileşim ilk kez incelendi.

Çalışmamızın akciğer kanseri hürelerinde yapılan ilk çalışma olması nedeniyle verilerinin ileride yapılacak olan in vitro ve in vivo çalışmalara rehberlik edeceğini düşünmekteyiz. Araştırmamızdan elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, seranib-2'nin KHDAK hücrelerinin tedavisinde güçlü sitotoksik ve apoptotik etkilerinden dolayı yeni kemoterapötik ajanların tasarlanması ve geliştirilmesinde etkili bir ilaç olacağına inanmaktayız.

Ayrıca seranib-2'nin kanserli hücrelerdeki etki mekanizması hakkında yapılan çalışmaların sayısı oldukça azdır. Örneğin; apoptotik süreçteki seranib-2'nin etki mekanizması hala tam olarak anlaşılmış değildir. Bu nedenle süreçte görev alan moleküller ve sinyal yolakları ile olan ilişkisinin detaylı olarak çalışılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Seranib-2’nin hücre ölüm çeşitlerinden biri olan otofajik ölüme neden olup olmadığı araştırılmamıştır. Bu nedenle ileride yapılacak çalışmalarda seranib-2’nin otofaji ve otofaji mekanizmalarında görev alan moleküller üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığı incelenebilir.

Ayrıca farklı kemoterapötik ajanlarla seranib-2’nin kombine etkileşimleri farklı hücrelerde çalışılmaya açık diğer bir konudur.

Sonuç olarak seranib-2 KHDAK hücreleri üzerinde güçlü sitotoksik bir ajandır. Kanser hücrelerinin apoptoza yönlendirilmesinde etkili olabilecek ajanların tasarlanması ve geliştirilmesine imkan sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abe, A., Radin, N.S., Shayman, J.A., Wotring, L.L., Zipkin, R.E., Sivakumar, R., Ruggieri, J.M., Carson, K.G., Ganem, B., 1995, Structural and streochemical studies of potent inhibitors of glucosylceramide synthase and tumor cell growth, J. Lipid Res., 36, 611-621.

Abe, K., Matsuki, N., 2000, Measurement of cellular 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT, Neuroscience Research, 38, 325-329.

Adams, J.M., Cory, S., 2001, Life or death decions by the Bcl-2 family, Trends. Biochem Sci., 26:61-6.

Adrain, C., Martin, S.J., 2001, The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas, Trends Biochem Sci., 26:390-7.

Altunkaynak, B. Z., Özbek, E., 2008, Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?, Tıp Araştırmaları Dergisi: 2008 : 6 (2) :93 -104.

Ardestani, S., Deskins, D.L., Young, P.P., 2013, Membrane TNF-alpha-activated programmed necrosis is mediated by Ceramide-induced reactive oxygen species, Journal of Molecular Signaling, J Mol Signal, 8-12.

Ashkenazi, A., Dixit, V.M., 1998, Death receptors: signaling and modulation, Science, 281: 1305-1308.

Bartke, N., Hannun, Y. A., 2009, Bioactive sphingolipids: metabolism and function, Journal of Lipid Research, 50, 91-96.

Beckham, T.H., Elojeimy, S., Cheng, J.C., Turner, L.S., 2011, Targeting sphingolipid metabolism in head and neck cancer: rational therapeutic potentials, Expert Opininon On Therapeutic Targets, 14(5), 529-539.

Bektas, M., Jolly, P.S., Müller, C., Eberle, J., Spiegel, S., Geilen, C.C., 2005, Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression, Oncogene, 24,178-87.

Bernstein, C., Holubec, H., Bhattacharyya, A. K., Nguyen, H., Payne, C. M., Zaitlin, B., Bernstein, H., 2011, Carcinogenicity of deoxycholate, a secondary bile acid, Archives of Toxicology, 85 (8): 863–71.

Bielawska, A., Greenberg, M.S., Perry, D., Jayadev, S., Shayman, J.A., McKay, C., Hannun, Y.A., 1996, (IS,'R)-D-erythro-2-(N-myrstoylamino)-1-phenyl-1-propanol as an inhibitor of ceramidase, J. Biol. Chem., 271: 12646-12654.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Bionda, C., Portoukalian, J., Schmitt, D., Rodriguez- Lafrasse, C., Ardail, D., 2004, Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria?, Biochemical Journal, 382, 527–533.

Birbes, H., El Bawab, S., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2001, Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis, FASEB Journal, 15, 2669–2679.

Blank, M., Shiloh, Y., 2007, Programs for cell death, Cell Cycle, 6(6): 686-695.

Cazenave, S.M., Abadie, N.A., Ségui, B., Gouazé, V.,Tardy, C., Cuvillier, O., Levade, T. 2002, General Sphingolipid Structure, Expert Reviews, http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM4_28/S146239940200546Xsup004.htm, erişim tarihi: 19.01.16

Clamon, G., 2015, Chemoprevention and Screening for Lung Cancer: Changing Our Focus to Former Smokers, Clinical Lung Cancer, 16(1): 1-5.

Curtin, J.F, Cotter, T.G., 2003, Live and let die: regulatory mechanism in Fas mediated apoptosis, Cell Signal, 15:983-92.

Daphu, I., Horn, S., Stieber, D., Varughese, J.K., Spriet, E., Dale, H.A. , Skaftnesmo, K.O. , Bjerkvig, R., Thorsen, F., 2014, In Vitro Treatment of Melanoma Brain Metastasis by Simultaneously Targeting the MAPK and PI3K Signaling Pathways, Int. J. Mol. Sci. , 15, 8773-8794.

Davis, M.A., Flaws, J.A., Young, M., Collins, K., Colburn, N.H., 2000, Effect of ceramide on intracellular glutathione determines apoptotic or necrotic cell death of JB6 tumor cells, Toxicol Sci. 53(1):48-55.

De Waele, M.N., Van Schil, P.E., 2012, Invasive Staging and Restaging in Non-Small Cell Lung Cancer, Bulletin of Thoracic Surgery, 3(3):141-144.

Debnath, J., Baehrecke, E.H., Kroemer, G., 2005, Does autophagy contribute to cell death?, Autophagy, 1: 66-74.

Degretev, A., Boyce, M., Yuan, J., 2003, A decade of caspases, Oncogene, 22: 8543-8567.

Dela Cruz, C.S., Tanove, L.T., Matthey, R.A., 2011, Lung Cancer: epidemiology, etiology, and prevention, Clin. Chest. Med., 32: 605-644.

Draper, J.M., Xia, Z., Smaith R.A., Zhuang, Y., Wang, W., Smith, C.D., 2011, Discovery and evaluation of inhibitors of human ceramidase, Mol Cancer Ther, 10, 2052-61.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Eldridge, L., 2013, Types of Lung Cancer, About.com, http://lungcancer.about.com/od/otherresources/a/nonsmallcell.html, erişim tarihi: 17.01.2016

Ellis, R.E., Yuan, J., Horvitz, H.R., 1991, Mechanisms and functions of cell death, Annu. Rev. Cell Biol., 7: 663-698.

Elmore, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death, Toxicol. Pathol., 35(4): 495-516.

Favaloro, B., Allocati, N., Graziano, V., Di Ilio, C., De Laurenzi, V., 2012, Role of Apoptosis in disease, Aging, 4(5):330-49.

Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G.E., Capaccioli, S., Orlandini, S.Z., 2000, Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis, J. Cell Physiol., 182: 41-49.

Foster, I., 2008, Cancer: A cell cycle defect, Radiography, 14: 144-149.

Freedman, M.L., Penney, K.L., Stram, D.O., Le Marchand, L., Hirschhorn, J.N., Kolonel, L.N., Altshuler, D., Henderson, B.E., Haiman, C.A., 2004, Common variation in BRCA2 and breast cancer risk: a haplotype-based analysis in the Multiethnic Cohort, Hum. Mol. Genet., 13: 2431–2441.

Furlong, S.J., Ridgway, N.D., Hoskin, D.W., 2008, Modulation of ceramide metabolism in T-leukemia cell lines potentiates apoptosis induced by the cationic antimicrobial peptide bovine lactoferricin, Internatıonal Journal of Oncology, 32: 537-544.

Gerschenson, L. E, Rotello, R. J., 1993, Apoptosis: a different type of cell death, FASEB J., 6:2450-2455.

Gewies, A., 2003, Introduction to Apoptosis, ApoReview, 1: 1-26.

Grullich, C., Sullards, M.C., Fuks, Z., Merrill Jr., A.H., Kolesnick, R., 2000, CD95(Fas/APO-1) signals ceramide generation independent of the effector stage of apoptosis, Journal of Biological Chemistry, 275, 8650–8656.

Gültekin, N., Karaoğlu, K., Küçükateş, E., 2008, Hücrede apoptoz ve sağkalım mekanizmalarının keşfedilmesi ve yeni potansiyel tedavi stratejileri, Türk Kardiyol Dern Arş., 36:120-130.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011, Hallmarks of cancer: the next generation, Cell, 144: 646-674.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hannun, Y.A., 1996, Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress, Science, 274:1855-1859.

Hannun, Y.A., Linardic, C.M., 1993, Sphingolipid breakdown products: anti-proliferative and tumor-suppressor lipids, Biochimica et Biophysica Acta,1154, 223–236.

Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2002, The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind, J. Biol. Chem, 277: 25847–25850.

Hengartner, M.O., 2000, The biochemistry of apoptosis, Nature, 407, 770.

Holman, D.H., Turner, L.S., El-Zawahry A., 2008, Lysosomotropic acid ceramidase inhibitor induces apoptosis in prostate cancer cells, Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 61, 231–242.

Holthuis, J. C. M., Pomorski, T., Raggers, R. J., Sprong, H., Van Meer, G., 2001, The Organizing Potential of Sphingolipids in Intracellular Membrane Transport, Physiological Reviews, 81, 1689-1723.

Hung, R. W. Y, Chow, A. W., 2004, Dissecting the "end game": clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assesment of apoptosis, Clin Invest Med. 27:324-44.

Igney, F.H, Krammer, P.H., 2002, Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis, Nat Rev Cancer, 2(4):277-88.

Jin, Z., El-Deiry, W.S., 2005, Overview of Cell Death Signaling Pathways, Cancer Biology & Therapy, 4(2): 139-163.

Kanwal T., Kulsoom G., 2016, Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms, Cancer Biol Med, 13(1): 120–135.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, Br. J. Cancer, 26:239-257.

Kolesnick, R.N., Go˜ni, F.M., Alonso, A., 2000, Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects, Journal of Cellular Physiology, 184, 285–300.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, ES, Baehrecke EH, Blagosklonny, MV, El-Deiry, WS, Golstein, P., Green, DR, Hengartner, M., Knight RA, Kumar, S., Lipton, SA, Malorni, W., Nuñez, G., Peter, ME, Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G., 2009, Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, Cell Death Differ. ,16(1): 3–11.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kuş, G., Kabadere, S., Uyar, R., Kutlu, H.M., 2015, Induction of apoptosis in prostate cancer cells by the novel ceramidase inhibitor ceranib-2, In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal, 51,1056–1063.

Lai, E., Teodoro, T., Volchuk, A., 2007, Endoplasmic reticulum stress: Signaling the unfolded protein response, Physiology, 22:193–201.

Langevin, S.M., Kratzke, R.A., Kelsey, K.T., 2014, Epigenetics of lung cancer, Translational Research, 165(1): 74-90.

Levine, B., Klionsky, D.J., 2004, Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy, Dev. Cell, 6: 463-477.

Levy, M., Futerman, A. H., 2010, Mammalian Ceramide Synthases, IUBMB Life, 62(5): 347–356.

Liao, Y.C., Shih, Y.W., Chao, C.H., Lee, X.Y., Chiang, T.A, 2009, Involvement of the ERK Signaling Pathway in Fisetin Reduces Invasion and Migration in the Human Lung Cancer Cell Line A549, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 8933–41.

Liu, W., Su, J., Jiang, J., Li, X., Ye, Q., Zhou, H., Chen, J., Li, Y., 2013, Two mixed-NH3/amine platinum (II) anticancer complexes featuring a dichloroacetate moiety in the leaving group, Scientific Reports, 3 : 2464.

Liu, X., Cheng, J.C., Turner, L.S., Elojeimy, S., Beckham, T.H., Bielawska, A., Keane, T.E., Hannun, Y.A., Norris J.S., 2009, Acid ceramidase upregulation in prostate cancer: role in tumor development and implications for therapy, Expert Opin Ther Targets., 13, 1449-1458.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta}$CT Method, Methods, 25: 402–408.

Lokich, J., Anderson, N., 1998, Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: An analysis of the literature, Annals of Oncology, 9: 13-21.

Mandon, E.C., Ehses, I., Rother, J., Echten, G., Sandhoff, K., 1992, Subcellular localization and membrane topology of serine palmitoyltransferase, 3-dehydrosphinganine reductase, and sphinganine N-acyltransferase in mouse liver, J. Biol. Chem. 267 11144–11148.

Mao, C., Obeid, L.M., 2008, Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, andsphingosine-1-phosphate, Biochimica et Biophysica Acta, 1781, 424–434.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Mendez, M., Custadio, A., Provencio, M., 2011, New molecular targeted therapies for advanced non-small-cell lung cancer, J. Thorac. Dis., 3(1): 30-56.

Merrill, A.H. Jr, Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Spiegel, S., Shayman, J.A., Schroeder , J.J., Riley, R.T., Voss, K.A., Wang, E., 1997, Sphingolipids--the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology, Toxicol Appl Pharmacol, 142(1):208-25.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J., 2008, Autophagy fights disease through cellular self-digestion, Nature, 451: 1069-1075.

Morales, A., Lee, H., Go˜ni, F.M., Kolesnick, R., Fernandez-Checa, J.C., 2007, Sphingolipids and cell death, Apoptosis, 12, 923–939.

Morales, A., Paris, R., Villanueva, A., Lacuna, L., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J.C., 2006, Pharmacological inhibition or small interfering RNA targeting acid ceramidase sensitizes hepatoma cells to chemotherapy and reduces tumor growth in vivo, Oncogene, 26,905-916.

Mossman, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, Journal of Immunological Methods, 65, 55-63.

Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A., Hannun,Y.A., 1993, Programmed cell death induced by ceramide, Science, 259, 1769–1771.

Öğretmen, B., Hannun, Y.A., 2004, Biologically Active Sphingolipids In Cancer Pathogenesis And Treatment, Nature, 4: 604-615.

Palmer, A.M., Greengrass, P.M., Cavalla, D., 2000, The role of mitochondria in apoptosis, Drug News &Perspectives, Vol. 13, No.6, 378-384.

Pattingre, S., Bauvy, C., Carpentier, S., Levade, T., Levine, B., Codogno, P., 2009, Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy, J. Biol. Chem., 284(5): 2719-2728.

Perry, D.K, Hannun, Y.A., 1998, The role of ceramide in cell signaling, Biochim. Biophys. Acta, 1436: 233-243.

Pettus, B.J., Chalfant, C.E., Hannun, Y.A., 2002, Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives, Biochimicaet Biophysica Acta, 1585, 114–125.

Ponder, B.A.J., 2001, Cancer genetics, Nature, 411: 336-341.

Proksch, D., Klein, J.J., Arenz, C., 2011, Potent inhibition of acid ceramidase by novel B-13 analogues, J Lipids, 971618, 1-8.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Qu, X., Zou, Z., Sun, Q., Luby-Phelps, K., Cheng, P., Hogan, R.N., Gilpin, C., Levine, B., 2007, Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development, Cell, 128: 931-946.

R´enert, A.F., Leprince, P., Dieu, M., 2009, The proapoptotic C16-ceramide-dependent pathway requires the deathpromoting factor Btf in colon adenocarcinoma cells, Journal of Proteome Research, 8, 4810–4822.

Raisovaa, M., Goltza, G., Bektasa, M., Bielawskab, A., Riebelinga, C., Amir M. Hossinia, A.M., Eberlea, J., Hannun, Y.A., Orfanosa, C.E., Geilena, C.C., 2002, Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCaT keratinocytes, FEBS Letters, 516, 47-52.

Ray, M.R., Jablons D., He B., 2010, Lung cancer therapeutics that target signaling pathways: an update, Exper review of respiratory Medicine, 4(5), 631–45.

Saad, A.F., Meachham, W.D., Bai, A., Anelli, V., Elojeimy, S., Mahdy, A.E.M., Turne, L.S., Cheng, J., Bielawska, A., Bielawska, J., Keane, T.E., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., Norris, J.S., Liu, X., 2007, The functional effects of acid ceramidase overexpression in prostate cancer progression and resistance to chemotherapy, Cancer Biol Ther, 9, 1455-1460.

Selzner, M., Bielawska, A., Morse M.A., 2001, Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer, Cancer Research, 61, 1233–1240.

Senkal, C. E., Obeid, L. M., 2015, Sphingolipids in the Pathogenesis of Head and Neck and Lung Cancers: Translational Aspects for Therapy and Biomarker Development, Bioactive Sphingolipids in Cancer Biology and Therapy, 235-257.

Seydel, G.Ş., Aksoy, K., 2012, Endoplazmik Retikulum Stresi ve Apoptozis Mekanizması, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi, 21(4):221-235.

Shah, M.V., Zhang, R., Irby, R., Kothapalli, R., Liu, X., Arrington, T., Frank, B., Lee, N.H., Loughran, T.P., 2008, Molecular profiling of LGL leukemia reveals role of sphingolipid signaling in survival of cytotoxic lymphocytes, Neoplasis, 112,770-781.

Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A., 2014, A Cancer Journal For Clinicians, Cancer statistics,2014, 64: 9-29.

Simons, K., Ikonen, E., 1997, Functional rafts in cell membranes, Nature, 387, 569–572.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Smyth, M.J., Perry, D.K., Zhang, J., Poirier, G.G., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 1996, prICE: a downstream target for ceramide-induced apoptosis and for the inhibitory action of Bcl-2, Biochemical Journal, 316, 25–28.

Soans, E., Evans, S.C., Cipolla, C., Fernandes, E. 2014, Characterizing the Sphingomyelinase Pathway Triggered by PRIMA-1 Derivatives in Lung Cancer Cells with Differing p53 Status, Antıcancer Research 34: 3271-3284.

Spiro, S.G., Porter, J.C. 2002, Lung cancer-Where are we today? Current advances in staging on nonsurgical treatment, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 166: 1166-1196.

Srinivasan, A., Foster, L.M., Testa M.P., 1996, Bcl-2 expression in neural cells blocks activation of ICE/CED-3family proteases during apoptosis, Journal of Neuroscience, 16, 5654–5660.

Vejselova, D., Kutlu, H.M., Kuş, G., Kabadere,S., Uyar, R., 2014, Cytotoxic and apoptotic effects of ceranib-2 offering potential for a new antineoplastic agent in the treatment of cancer cells, Turk J Biol, 38: 916-921.

Vethakanraj, H.S., Babu, T.A., Sudarsanan, G.B., Duraisamy, P.K., Kumar, S.A., 2015, Targeting ceramide metabolic pathway induces apoptosis in human breast cancer cell lines, Biochemical and Biophysical Research Communications, 464, 833-839.

Villena, J., Henriquez, M., Torres, V., Moraga, F., Díaz-Elizondo, J., Arredondo, C., Chiong, M., Olea-Azar, C., Stutzin, A., Lavandero, S., Quest, A.F., 2008, Ceramide-induced formation of ROS and ATP depletion trigger necrosis in lymphoid cells, Free Radic Biol Med., 44(6):1146-60.

White, E.J., Martin, V., Liu, J., Klein, S.R., Piya, S., Gomez-Manzano, C., Fueyo, J., Jiang, H., 2011, Autophagy regulation in cancer development and therapy, Am. J. Cancer Res., 1(3): 362-372.

Yamane, M., 2015, Palmitoyl-ceramide accumulation with necrotic cell death in A549 cells, followed by a steep increase in sphinganine content, Biochimie Open, 11–27.

Yasuda, S., Nishijima, M., Hanada, K., 2003, Localization, topology and function of the LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase in mammalian cells, J. Biol. Chem. 278 (2003) 4176–4183.

Ye, Q.S., Liu, W.P., Chen, X.Z., Yu, Y., Chang, Q.W., Hou, S.Q., 2010, Synthesis and In Vitro Cytotoxicity of Cis-[Pt(NH3)(NH2OH)Cl2], Arch Pharm Res., 33(6) 807-811.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Ye, Q.S., Xie, M.J., Liu, W.P., Chen, X.Z., Yu, Y., Chang, Q.W., Hou, S.Q., 2009, Synthesis, Characterization and Cytotoxicity of Dihalogeno-platinum(II) Complexes with L-Histidine Ligand, Chem. Pharm. Bull., 57(4) 424-427.

Yıldırım, A., Bardakcı, F., Karataş, M., Tanyolaç B., 2007, Moleküler Biyoloji, Nobel yayınları, Ankara, s.456.

Zhang, D.W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.J., Lin, S.C., Dong, M.Q., Han, J., 2009, RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis, Science, 8: 332-336.