



**MESANE KANSERİNDE KUKURBİTASİN B VE SİSPLATİN'İN ANTİ-
PROLİFERATİF ETKİLERİNİN HÜCRE ÖLÜM YOLAKLARINDA
ARAŞTIRILMASI**

Yener KURMAN

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2021

Yener KURMAN tarafından hazırlanan “Mesane Kanseriinde Kukurbitasin B ve Sisplatin’in Anti-Proliferatif Etkilerinin Hücre Ölüm Yolaklarında Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Ece KONAÇ

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 01/02/2021

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Yasemin DÜNDAR
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Yener KURMAN tarafından hazırlanan “Mesane Kanserinde Kukurbitasin B ve Sisplatin’in Anti-Proliferatif Etkilerinin Hücre Ölüm Yolaklarında Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Turgut ULUTİN

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/ ~~onaylamıyorum~~

Tez Savunma Tarihi: 01/02/2021

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Yasemin DÜNDAR
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Yener KURMAN tarafından hazırlanan “Mesane Kanserinde Kukurbitasin B ve Sisplatin’in Anti-Proliferatif Etkilerinin Hücre Ölüm Yolaklarında Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Tez Savunma Tarihi: 01/02/2021

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır. .

Prof. Dr. Yasemin DÜNDAR
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Yener KURMAN tarafından hazırlanan “Mesane Kanseriinde Kukurbitasin B ve Sisplatin’in Anti-Proliferatif Etkilerinin Hücre Ölüm Yolaklarında Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Üye: Prof. Dr. Cenk Y.BİLEN

Üroloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~.

Tez Savunma Tarihi: 01/02/2021

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Yasemin DÜNDAR
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Yener KURMAN tarafından hazırlanan “Mesane Kanseriinde Kukurbitasin B ve Sisplatin’in Anti-Proliferatif Etkilerinin Hücre Ölüm Yolaklarında Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Üye: Prof. Dr. Sinan SÖZEN

Üroloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Tez Savunma Tarihi: 01/02/2021

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Yasemin DÜNDAR
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Yener KURMAN tarafından hazırlanan “Mesane Kanseriinde Kukurbitasin B ve Sisplatin’in Anti-Proliferatif Etkilerinin Hücre Ölüm Yolaklarında Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / ~~OY ÇOKLUĞU~~ ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. H. İlke ÖNEN

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~.

Tez Savunma Tarihi: 01/02/2021

Jüri üyeleri tarafından DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Yasemin DÜNDAR
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

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

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

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

Yener KURMAN

01.02.2021

MESANE KANSERİNDE KUKURBITASIN B VE SISPLATİN'İN ANTI- PROLİFERATİF ETKİLERİNİN HÜCRE ÖLÜM YOLAKLARINDA ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Yener KURMAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2021

ÖZET

Mesane kanseri, dünya çapında kanser ölümlerinin önemli bir kısmından sorumlu olan bir malignitedir. Sisplatin (Sis) bazlı kemoterapi, mesane kanseri hastaları için standart tedavi rejimidir, ancak etkinliği yüksek toksisite ve ilaç direncinin gelişmesi ile sınırlıdır. Birçok çalışmada Kukurbitasin B (KuB)'nin apoptoz ve otofajiyi uyararak anti-kanserojen etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında KuB'nin MB49 mesane singeneik fare tümör modeli üzerindeki potansiyel rolü araştırılmıştır. MB49 hücre hattına KuB ve sisplatinin tekli ve kombine dozları uygulanarak hücre canlılığı WST-1 yöntemi ile ölçülmüştür. Tümör modeli oluşturulduktan sonra, fareler dört gruba ayrılarak belirtilen doz ve sürelerde KuB ve sisplatin uygulanmıştır. Apoptoz (Bcl-2, Bax, Kaspaz-3, bölünmüş Kaspaz-3) ve otofaji proteinlerinin (Beklin-1 ve LC3I, LC3II) ifade seviyeleri Western Blot yöntemi ile tespit edilmiştir. PI3K-Akt sinyal yolu ile ilişkili proteinlerin göreceli fosforilasyon seviyelerini belirlemek için fosfo-protein array analizi yapılmıştır. Ajan uygulamaları sonrası tümör dokuları ve organlar, hematoksil-eozin boyanarak analiz edilmiştir. Bulgularımız, KuB'nin, Bcl-2 ifadesini inhibe ettiğini; Bax ve bölünmüş kaspaz 3'ün ifadelerini artırdığını göstermiştir. LC3II miktarı, KuB ile tedavi edilen hücrelerde belirgin şekilde artmıştır. KuB; p27, PRAS40 ve Raf-1 proteinlerinin fosforilasyonunu azaltmıştır. KuB ve Sis kombinasyonu sinerjik olarak AKT, ERK1/ERK2, mTOR, BAD proteinlerinin fosforilasyonunu azaltırken, AMPKα fosforilasyonunu artırmıştır. PI3K/AKT/mTOR, KuB'nin hedeflerinden olan bir sinyal yolağı olarak bulunmuştur. KuB ve Sis kombinasyonu tümör gelişimini önemli ölçüde azaltmış ve aynı zamanda akciğer, karaciğer, böbrek, kalp ve mesane üzerinde toksik etki göstermemiştir. Sonuçlarımız, KuB'nin mesane kanserinde geleneksel tedaviyi destekleyebilen yeni bir ajan olabileceğini göstermektedir. Çalışmamız mesane kanseri tedavisinde yeni yolların aydınlatılması ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önemlidir.

Bilim Kodu : 1055.1
AnahtarKelimeler : Mesane kanseri, Kukurbitasin B, Sisplatin, Apoptoz, Otofaji, MB49 Singeneik Fare Modeli
Sayfa Adedi : 118
Danışman : Prof. Dr. Ece KONAÇ

INVESTIGATION OF ANTI-PROLIFERATIVE EFFECTS OF CUCURBITACIN B AND CISPLATIN ON THE CELL DEATH PATHWAYS IN BLADDER CANCER

(Ph. D. Thesis)

Yener KURMAN

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

February 2021

ABSTRACT

Bladder cancer is a malignancy that is responsible for a significant proportion of cancer deaths around the world. Cisplatin (Cis)-based chemotherapy is the standard regimen for bladder cancer patients, but its effectiveness is limited by high toxicity and the development of drug resistance. It has been reported in many studies that Cucurbitacin B (CuB) has anti-carcinogenic effects by stimulating apoptosis and autophagy. Here we explored the potential role of CuB on MB49 bladder syngeneic mouse tumor model. Single and combined doses of CuB and Cis were applied to MB49 cell line and the cell viability was determined by WST-1 method. After the tumor model was established, the mice were divided into four groups and administered CuB and cis at the indicated doses and times. The expression levels of apoptosis (Bcl-2, Bax, Caspase-3, cleaved Caspase-3) and autophagy proteins (Beclin-1 and LC3I, LC3II) were detected by Western Blot. Phospho-protein array analysis was performed to determine the relative levels of phosphorylation of proteins which are associated with the PI3K-Akt signaling pathway. After agent applications, tumor tissues and organs were analyzed by staining hematoxylin-eosin. Our findings showed that CuB inhibits Bcl-2 expression and increases the expression of Bax and cleaved caspase 3. LC3II is markedly up-regulated in CuB-treated cells. CuB reduced the phosphorylation of p27, PRAS40, and Raf-1 proteins. CuB and Cis combination synergistically decreased phosphorylation of AKT, ERK1/ERK2, mTOR, BAD levels and increased the level of AMPK α . PI3K/AKT/mTOR has been found to be a signaling pathway that is one of the targets of CuB. The combination of CuB and Cis significantly reduced tumor growth and also had no toxic effects on the lung, liver, kidney, heart and bladder. Our results show that CuB may be a new agent that can support traditional treatment for bladder cancer. Our study is important in enlightening new ways in the treatment of bladder cancer and developing new treatment methods.

ScienceCode : 1055.1

Keywords : Bladder cancer, Cucurbitacin B, Cisplatin, Apoptosis, Autophagy, MB49 Syngeneic Mouse Model

Page Number : 118

Supervisor : Prof. Dr. Ece KONAÇ

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında, hoşgörüsü, emeği ve engin akademik bilgileri ile yoluma ışık tutan, hem akademisyenliği hem de insanlığı ile bana daima örnek olan, desteğini her zaman hissettiğim tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof.Dr. Ece KONAÇ'a,

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Hacer İlke ÖNEN'e, doktora eğitimimdeki desteklerinden dolayı Sayın Doç. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a, doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmamda, dostluğu, içten yardımlarıyla bana her zaman destek olan ve kendisiyle çalışmaktan kıvanç duyduğum değerli arkadaşım Dr.İlker KILIÇCIOĞLU'na, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalındaki tüm değerli çalışma arkadaşlarıma,

Yaşamımda ve eğitimimde her zaman yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli anne ve babama teşekkür ederim.

Bu çalışmayı; 01/2018–28 nolu proje kodu ile destekleyen Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne ve YÖK-Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı'na (ÖYP) teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Mesane Anatomisi ve Biyolojisi.....	7
2.2. Mesane Kanseri.....	9
2.2.1. Epidemiyoloji.....	9
2.2.2. Etiyoloji ve Risk Faktörleri.....	13
2.2.3. Evreleme ve Derecelendirme	15
2.2.4. Teşhis	18
2.2.5. Tedavi.....	19
2.2.6. Sisplatin	21
2.2.7. Mesane Kanseri Patolojisi ve Farklı Tipleri	22
2.2.8. Mesane Kanseri Gelişiminde Rol Oynayan Mekanizmalar	24
2.2.9. Mesane Kanseri Alt Tipleri.....	29
2.2.10. Mesane Kanseri Fare Modelleri.....	33
2.2.11. MB49 Singeneik Mesane Kanseri Fare Modeli.....	37
2.3. Hücre Ölüm Yolakları	38
2.3.1. Apoptoz	38
2.3.2. Otofaji	42

	Sayfa
2.4. Kukurbitasin B	47
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. Gereçler.....	49
3.1.1. Kullanılan cihazlar	49
3.1.2. Kullanılan sarf malzemeleri	49
3.1.3. Kullanılan kimyasallar.....	50
3.1.4. Kullanılan kitler	51
3.1.5. Kullanılan antikorlar	51
3.1.6. Kullanılan besiyeri, tampon ve çözeltilerin hazırlanışı	51
3.2. Yöntemler.....	54
3.2.1. Hücre Hattı	54
3.2.2. Hücre Kültürü.....	54
3.2.3. Hücre Çözülmesi, Pasajlanması ve Dondurulması	54
3.2.4. Ajan Uygulamaları ve Hücre Canlılığının Belirlenmesi	55
3.2.5. Dokulardan Protein İzolasyonu.....	56
3.2.6. Protein Miktar Tayini	57
3.2.7. Western Blot Yöntemi	57
3.2.8. AKT Yolağı Proteinlerinin, Fosforilasyon Değişim Miktarlarının Belirlenmesi.....	59
3.2.9. Mesane Kanseri Fare Modelinin Oluşturulması	60
3.2.10. Histopatolojik İnceleme	64
3.2.11. İstatistiksel Analiz.....	64
4. BULGULAR.....	65
4.1. <i>İn Vitro</i> Deney Bulguları	65
4.1.1. MB49 Fare Mesane Kanseri Hattında Kukurbitasin B ve Sisplatinin Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkilerinin Değerlendirilmesi	65
4.2. <i>İn Vivo</i> Deney Bulguları	67

Sayfa

4.2.1. Mesane Kanseri MB49 Fare Modelinde Ajan Uygulaması Sonrası Tümör Gelişiminin Değerlendirilmesi.....	67
4.2.2. Kukurbitasin B ve Sisplatin Uygulamalarına Bağlı Olarak Tümör Dokularında Apoptoz ve Otofaji Yolaklarına Ait Proteinlerin İfade Değişimlerinin İncelenmesi.....	70
4.2.3. Ajan Uygulamalarına Bağlı Olarak PI3K/AKT Yolağı İle Bağlantılı Proteinlerdeki Fosforilasyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi	72
4.2.4. Histopatolojik Değerlendirmeler	75
5. TARTIŞMA.....	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
KAYNAKLAR.....	95
EKLER.....	113
EK-1. Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı	114
Ek-1. Devam.....	115
Ek-2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Katılım Sertifikası.....	116
ÖZGEÇMİŞ.....	117

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. GLOBOCAN 2018 Türkiye Kanseri Verileri.....	11
Çizelge 2.2. Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları.....	12
Çizelge 2.3. 70 ve üzeri yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları	12
Çizelge 2.4. 2017 Mesane kanseri TNM sınıflandırması	17
Çizelge 3.1. %10'luk SDS-PAGE için ayırma jelinin bileşenleri.....	58
Çizelge 3.2. %5'lik SDS-PAGE için yığınlama jelinin bileşenleri	59

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Erkek alt idrar yolunun anatomisi	8
Şekil 2.2. Mesane katmanlarının şeması	9
Şekil 2.3. GLOBOCAN 2018 Türkiye kanser verilerine göre tüm yaş gruplarındaki erkeklerdeki yeni vaka sayıları	11
Şekil 2.4. Mesane kanseri gelişimine sebep olan risk faktörleri	15
Şekil 2.5. Ürotelyal karsinomun derece sınıflandırması	16
Şekil 2.6. Tümör, Düğüm, Metastaz (TNM) sistemine göre mesane kanserinin evrelendirilmesi	18
Şekil 2.7. Mesane kanserinin patolojik evrelerinin şematik gösterimi ve terapötik müdahaleler	20
Şekil 2.8. Sisplatinin kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2.9. Mesane kanseri tipleri.....	24
Şekil 2.10. Papiller KİOMK ve solid KİMK için iki potansiyel patogeneze yolunun gösterimi	25
Şekil 2.11. Gen ifade profiline dayalı KİOMK'un moleküler sınıflandırmasının şematik gösterimi.....	30
Şekil 2.12. Gen ifade profiline dayalı KİMK'in moleküler sınıflandırmasının şematik gösterimi.....	32
Şekil 2.13. Kemirgenlerde mesane kanseri gelişimini tetiklemek için kullanılan hayvan modelleri.	37
Şekil 2.14. Singenik tümör modelinin oluşturulmasının şematik gösterimi	38
Şekil 2.15. Apoptoz Yolakları	40
Şekil 2.16. Otofajinin çoklu sinyal yolakları tarafından düzenlenmesi ve son iletimin Beklin-1 içeren PI3K kompleksinde birleşmesi.....	44
Şekil 2.17. Otofajik sürecin başlangıç aşamaları.....	45
Şekil 2.18. Otofajik sürecin genel şeması	46
Şekil 2.19. KuB'nin kimyasal yapısı ve ilişkili olduğu sinyal yolaklarının grafiksel özeti	48

Şekil	Sayfa
Şekil 3.1. Tümör taşıyan farelere, Sis, KuB ve Sis+KuB kombinasyonlarının sabit zaman çizelgesine göre uygulanması	61
Şekil 3.2. Mesane kanseri fare modeli deney aşamaları	63
Şekil 4.1. MB49 hücrelerinin (5000 hücre/kuyu) sisplatin ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	66
Şekil 4.2. MB49 hücrelerinin (5000 hücre/kuyu) KuB ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	66
Şekil 4.3. MB49 hücrelerinin (5000 hücre/kuyu) KuB ve Sisplatin kombinasyonu ile belirtilen dozlarda 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları	67
Şekil 4.4. KuB ve Sis ile tedavi edilen MB49 tümör hücrelerini taşıyan fare dokularından kesilen tümörlerin temsili görüntüleri.....	68
Şekil 4.5. Tedaviden sonra her gruptaki farelerden alınan tümör dokularının ortalama hacimleri ve ağırlıkları	69
Şekil 4.6. Belirtilen antikolar kullanılarak; KuB, Sis ve KuB + Sis ile muamele edilmiş tümör dokularında meydana gelen protein ifade değişimlerinin gösterilmesi	71
Şekil 4.7. KuB, Sis ve KuB + Sis tedavisinden sonra apoptotik (Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve Cl Kaspaz-3) ve otofaji proteinlerinin (Beklin-1, LC3I, LC3II) göreceli ifade seviyeleri	71
Şekil 4.8. Dört membrandaki fosfo-proteinlerin göreceli ifade değişimleri, numaralandırılmış kare çerçeveler ile gösterimiştir.	74
Şekil 4.9. Dört membrandaki fosfo-proteinlerin göreceli ifade değişimlerinin, çubuklu grafik ile gösterimi	74
Şekil 4.10. Tedaviden sonra çıkarılan tümör dokularının, hematoksilen ve eozin ile boyanmış görselleri	75
Şekil 4.11. Tedaviden sonra çıkarılan organların (akciğer, karaciğer, böbrek, kalp ve mesane), hematoksilen ve eozin ile boyanmış görselleri ..	76

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
M	Molar
mA	Miliamper
μ M	Mikromolar
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
μ g	Mikrogram
mg	Miligram
g	Gram
μ l	Mikrolitre
ml	Mililitre
cm ²	Santimetrekare
°C	Santigrat Derece
CO ₂	Karbondioksit
U	Unite
Dk	Dakika
Sn	Saniye
%	Yüzde
α	Alfa
β	Beta
dk	Dakika
V	Voltaj

Kısaltmalar**AIF****AJCC****AKT****AMPK****ASI****ATG****AUM****Bax****BBN****BCG****BCL-2****BSA****CK****DFCP1****DMSO****DSÖ****EAU****Endo G****EORTC****FADD****FANFT****FDA****GEM****GWAS****HG****IARC****ISUP****Açıklama**

Apoptoz indükleyici faktör

Amerikan Kanser Ortak Komisyonu

Protein Kinaz B

AMP ile aktive olan protein kinaz

Standardize edilmiş insidans

Otofaji ilişkili protein

Asimetrik birim membrane

Bcl-2 ile ilişkili X proteini

N-Butil-N- (4-hidroksibutil) nitrozamin

Bacillus Calmette-Guerin

B hücresi lenfoma geni 2

Sığır serum albumin

Sitokeratin

PI3P bağlayıcı çinko parmak FYVE alanı
içeren protein 1

Dimetilsülfoksit

Dünya Sağlık Örgütü

Avrupa Üroloji Derneği

Endonükleaz G

Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi
Örgütü

Fas-ilşkili ölüm bölgesi

N- [4- (5-nitro-2-furil) -2-tiazolil] formamid

Amerikan gıda ve ilaç dairesi

Genetiği değiştirilmiş fare

Genom boyu ilişki çalışmaları

Yüksek derece

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği

Kısaltmalar**KİMK****KİOMK****KİS****KuB****LG****LUND****MAP1LC3****MDA****Mes****MNU****MVAC****PUNLMP****PE****PHÖ****PI3K****PI3KC3****PRAS 40****Sc/Ne****Sis****TCGA****TNM****TRADD****UNC****ULK****Uro****WIPI****Açıklama**

Kasa invaziv mesane kanseri

Kasa invaziv olmayan mesane kanseri

Karsinoma in situ

Kukurbitasin B

Düşük derece

LUND üniversitesi

Mikrotübül ile ilişkili protein 1 hafif zincir 3

MD Anderson Kanseri Merkezi

Mezenşimal

N-metil -N-nitrosourea

Metotreksat,vinblastin,adriamisin,시스플atin

Düşük malign potansiyelli papiller

ürotelyal neoplasm

Fosfatidiletanolamin

Programlanmış hücre ölümü

Fosfatidilinositol 3-Kinaz

Sınıf III Fosfatidilinositol 3-Kinaz

40 kDa'lık prolin bakımından zengin

Akt substratı

Küçük hücreli/Nöroendokrin

Sisplatin

Kanser Genom Atlası

Tümör-Lenf Nodu- Metastaz

TNF ilişkili ölüm bölgesi

Kuzey Carolina Üniversitesi

Unc-51 benzeri otofajiyi aktive eden kinaz

Ürotelyum

WD tekrar alanlı fosfoinositit etkileşimli protein

1. GİRİŞ

Mesane kanseri, ürogenital sistemin prostat kanserinden sonra ikinci (Mani ve diğerleri, 2015), idrar yolunun ise en yaygın malignitesidir (Hsin ve diğerleri, 2016). 2018 yılında yarım milyondan fazla kişiye mesane kanseri teşhisi konmuştur ve 200.000 kişi bu hastalıktan ölmüştür (Bray ve diğerleri, 2018; Batista ve diğerleri, 2020). Mesane kanseri, tanı anında tümör hücrelerinin kas tabakasına invazyon durumuna göre iki sınıfa ayrılır. Mesane tümörlerinin % 75'i, papiller hiperplaziden kaynaklanan kasa invaziv olmayan mesane tümörleri (KİOMK) iken, kalan % 25'lik tümörler, displazi veya karsinoma in situdan (KİS) gelişen kasa invaziv olan mesane tümörlerdir (KİMK) (Sanli ve diğerleri, 2017). Kasa invaziv olmayan alt tipler iyi prognoz ve yüksek sağ kalım oranları ile ilişkilidir. Bu tümörler çoğunlukla papiller tiptedir ve mesanenin iç yüzeyinden lümene doğru büyüyen parmak benzeri çıkıntılar oluşturur. Tanı konulan mesane kanserlerinin çoğunluğu KİOMK olduğundan, ölüm oranları olumlu prognozu nedeniyle diğer kanserlere kıyasla genellikle daha düşüktür. Ancak mevcut tedavi seçenekleri, hastalığın nüksetmesini ve ilerlemesini önemli ölçüde önleyemez (Ringuette-Goulet ve diğerleri, 2018). Yüksek nüks oranı, sık gözetim stratejileri ve intravezikal ilaç tedavileri nedeniyle mesane kanseri, tedavi edilmesi en pahalı tümörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Li ve diğerleri, 2019). Bu nedenle, nüks ve ilerleme riskini azaltmak için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Lin ve diğerleri, 2017). Mesane kanserinin kalan vakaları, tümörün mesane duvarının daha derin katmanlarına doğru büyüdüğü, kötü prognozla ilişkili KİMK'lerden oluşur (Kobayashi ve diğerleri, 2015). Bu kanserlerin yayılma olasılığı daha yüksektir ve tedavisi daha zordur. KİMK'lerde sisplatin temelli kemoterapi ile birlikte radikal sistektominin yapılması standart tedavi yöntemidir. Ancak tüm mesane kanserleri bu anti-kanser ilaçlarına eşit derece yanıt vermemektedir. İlaç cevabındaki hasta heterojenliği tedavi seçeneklerini sınırlar ve hasta sağ kalımındaki iyileşmeyi azaltmaktadır (Yoshida ve diğerleri, 2019).

Sisplatin ile yapılan kombine tedaviler birçok kanserde olduğu gibi mesane kanserinin de tedavisinin temelini oluşturmaktadır. Sisplatine cevap başlarda yüksek olsa da birçok kanser hastası sisplatine direnç geliştirmektedir (Dasari ve Tchounwou, 2014). Metastatik mesane kanserinin tedavisinde sisplatin bazlı

tedavilere yanıt oranı yaklaşık % 50'dir ve bu tedaviyi alan bireylerin çoğunda hastalık nüks eder (Massari ve diğerleri, 2015). Birinci basamak kemoterapiden sonra hastalığı nükseden hastaların prognozu çok kötüdür (Gallagher ve diğerleri, 2008). Son yirmi yılda, bu hastalar için tedavi seçenekleri büyük ölçüde iyileşmemiştir (Kim ve diğerleri, 2020). Bununla birlikte, sisplatin kemoterapisi, hepatotoksik, nefrotoksik, kardiyotoksik, nörotoksik ve hematotoksik hasarı içeren önemli yan etkilerle de ilişkilidir. Bu nedenle ilaç direncinin üstesinden gelmek ve istenmeyen yan etkileri azaltmak için sisplatinin diğer ilaçlarla kombine edildiği terapiler, insan kanserlerinin tedavisinde yaygın bir uygulamadır (Dasari ve Tchounwou, 2014).

Kukurbitasin B, yaygın olarak Cucurbitaceae (Kabakgiller) bitki ailesinden izole edilen ve yüksek yapısal farklılığı olan tetrasiklik triterpenoidlerin bir grubudur. Anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal, anti-diyabetik ve kanser önleyici özelliklerinden dolayı Çin ve Hindistan gibi ülkelerde yüzyıllardır geleneksel tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır (El-Senduny ve diğerleri, 2016). Moleküler yapılarındaki farklılıklardan dolayı on iki gruba ayrılmışlardır (A'dan T'ye isimlendirilmiştir). Bunlar arasında terpenoid KuB gösterdiği anti-tümör özelliklerden dolayı artan bir ilgi görmektedir (Kausar ve diğerleri, 2013). Çeşitli çalışmalarda, KuB'nin lösemi, lenfoma, çoklu miyelom, melanom, meme, prostat, akciğer, pankreas, serviks, karaciğer ve beyin dahil olmak üzere çok sayıda insan kanser hücre hattının çoğalmasını inhibe ettiği ve tümör ksenograftlarının büyümesini engellediğini gösterilmiştir (Chen ve diğerleri, 2010). KuB'nin anti-tümör mekanizmaları arasında, apoptoz ve otofaji aktivasyonu, hücre döngüsünün durdurulması, hücre iskeletinin bozulması, DNA hasarı ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, AKT gibi kanserle ilişkili sinyal yollarının inhibisyonu yer almaktadır (Shang ve diğerleri, 2014; Luo ve diğerleri, 2018; Liu ve diğerleri, 2019).

Apoptoz ve otofaji, programlanmış hücre ölümünün (PHÖ) iki ana biçimidir ve morfolojik farklılıkları ile kolayca ayırt edilir. Tip I PHÖ olarak tanımlanan apoptoz süreci, esas olarak sistein proteazları tarafından başlatılan bir dizi proteolitik olayı içerir (Ma ve diğerleri, 2020). Kaspazlar, programlanmış hücre ölümünün önemli araçlarıdır. Bunların arasında kaspaz-3, birçok anahtar hücresel proteinin spesifik

yıkımını katalize eden, bir ölüm proteazıdır (Porter ve Jänicke, 1999). Kaspazların aktivasyonu; B hücresi lenfoma geni 2 (Bcl-2) ve Bcl-2 ile ilişkili X proteini (Bax) proteinleri ile sıkı bir şekilde ilişkilidir. Bcl-2 ve Bax, sırasıyla, mitokondriyal işlevi etkileyerek apoptoza aracılık eden temel anti-apoptotik ve pro-apoptotik düzenleyicilerden ikisidir (Li ve diğerleri, 2018). Apoptoz, kemoterapiye verilen ana hücre ölümü tepkisidir ve tümör hücrelerinde sıklıkla düzensizdir ya da işlevsizdir. Dahası, tümör hücrelerinin apoptozdan kurtulmaları, kemo-direncin ayırt edici özelliklerinden biridir. Dolayısıyla, apoptozu hedeflemek, bir kanser terapötik stratejisi haline gelmiştir (Liu ve diğerleri, 2017).

Otofaji; hasarlı, uzun ömürlü sitoplazmik proteinlerin ve organellerin, otofagozomlar olarak adlandırılan çift membranlı otofajik veziküller tarafından yutularak lizozomal degradasyonunun gerçekleştiği, evrimsel olarak korunmuş katabolik bir süreçtir (Li ve diğerleri, 2019). Çeşitli stres koşullarına karşı otofajinin hücre koruyucu özelliği bilinse de bazı ilaçların otofajiyi aşırı uyararak tip II PHÖ olarak bilinen otofajik hücre ölümüne sebep olduğu bilinmektedir (Wang ve diğerleri, 2010; Sun ve diğerleri, 2019). Otofaji son zamanlarda kanser araştırmalarında kanser tedavisi için hücre ölümü yollarının anahtar düzenleyicisi olarak önem kazanmıştır. Otofaji, kanser hücrelerinin anti-kanser ilaçlarına kemosensitivitesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar ve bazı kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunu etkiler (Kalai Selvi ve diğerleri, 2017). Bu durum; otofajinin kanserin tedavisinde hedef alınacak alternatif bir hücre ölüm yolağı yapmaktadır (Sun ve diğerleri, 2019). Bu nedenle, yeni terapötik ajanlar geliştirmek için otofajinin kanser hücrelerindeki rolünü anlaşılması önemlidir (Li ve diğerleri, 2019).

Beklin-1, tanımlanan ilk memeli otofaji proteinlerinden biridir ve otofajide merkezi bir oyuncudur (Hill ve diğerleri, 2019). PI3K (Fosfatidilinositol 3-Kinaz) kompleksinin düzenleyici alt birimi olarak Beklin-1, fosforilasyon ve ubiquitinasyon yoluyla otofajinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Li ve diğerleri, 2019; Shin ve diğerleri, 2019).

MAP1LC3 (mikrotübül ile ilişkili protein 1 hafif zincir 3) genellikle LC3 olarak adlandırılan maya Atg8'in bir otofagozomal ortologudur (Tanida ve diğerleri, 2004;

Johansen ve Lamark, 2020). LC3'ün memelilerde birkaç homologu olmasına rağmen, bunlar arasında LC3B, otofajinin biyo-belirteci olarak en yaygın olarak kullanılanıdır (Mizushima ve Yoshimori, 2007). LC3'ün lipid eklenmiş formu olan LC3II, otofajik membranlarda doğrudan lipid fosfatidiletanolamine (PE) konjuge hale gelir ve tam bir otofaji akışı boyunca otofajik membranlara bağlı kalır. Bu nedenle LC3II otofagozom biyogenezini ve takibini incelemek için en yaygın kullanılan belirteçlerden biri olmuştur (Jacquet ve diğerleri, 2020).

Hem otofaji hem de apoptoz; hücre gelişimi, homeostaz ve çoklu hastalıklarda önemli rol oynayan biyolojik süreçlerdir. Onkolojide otofaji ve apoptoz arasındaki ilişki karmaşıktır (Ji ve diğerleri, 2019). Kemoterapi direncine karşı, apoptoz ve otofaji arasındaki dengeyi düzenleyen yeni tedavisel yaklaşımlar, klinik öncesi çalışmalarda olumlu sonuçlar vermektedir (Li ve diğerleri, 2014).

KuB'nin, kemoterapi ilaçlarının anti-proliferatif etkilerini güçlendirdiğini ve ilaçların oluşturduğu toksisiteyi azalttığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. KuB'nin, mide (Liu ve diğerleri, 2017; Xu ve diğerleri, 2020), akciğer (Marostica ve diğerleri, 2015), glioblastoma (Qin ve diğerleri, 2018), larinks skuamöz hücreli karsinom (Liu ve diğerleri, 2010), küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (Liu ve diğerleri, 2019), yumurtalık (El-Senduny ve diğerleri, 2016) ve kutanöz skuamöz hücreli kanserlerde (Chen ve diğerleri, 2010) sisplatin ile; pankreas ve meme kanserlerinde gemsitabin ile (Iwanski ve diğerleri, 2010; Aribi ve diğerleri, 2013); larinks ve meme kanserlerinde dosetaksel ile (Liu ve diğerleri, 2008; Aribi ve diğerleri, 2013); anaplastik tiroid karsinomunda doksorubisin ile (Kim ve diğerleri, 2017), yumurtalık kanserinde paklitaksel ile (Qu ve diğerleri, 2017) sinerjik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durum, KuB'yi yeni bir kombinasyon terapisinin geliştirilebileceği çekici bir aday yapmaktadır.

Bugüne kadar, mesane kanseri hücrelerinde KuB ve sisplatin arasındaki ilişki henüz gösterilmemiştir. Yukarıda özetlediğimiz veriler ışığında çalışmamızda, KuB ve sisplatinin, mesane kanseri hücreleri üzerindeki anti-tümör aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu iki ajanın hücre çoğalmasına etkisi WST-1 yöntemi ile *in vitro* olarak çalışılmıştır. *In vivo* düzeyde ise mesane kanseri fare hücre hattı olan MB49; C57BL/6 fare soyuna subkutan olarak verilerek mesane kanseri fare

modeli oluşturulmuştur. Oluşturduğumuz bu *in vivo* modelde, kullandığımız ajanların tümör gelişimine etkileri hem tedavi aşamalarında hem de hayvanların sakrifiye edilmesi sonrasında çıkartılan tümörlü dokuların analiz edilmesiyle değerlendirilmiştir. Kullanılan ajanların apoptotik ve otofajik yollarına etkilerini bulmak için; fare tümör dokularında; Bcl-2, Bax, kaspaz 3, bölünmüş kaspaz 3 (Cl-kaspaz 3) LC3I, LC3II, Beklin-1 proteinlerinin ifade seviyeleri, Western Blot yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

KuB ve sisplatin aracılı apoptoz ve otofaji aktivasyonundan sorumlu düzenleyici proteinleri tanımlamak için PI3K/AKT yolağı ilişkili 18 proteindeki (p-Akt, p-AMPK α , p-BAD, p-ERK 1ve p-ERK 2, p-GSK3 α , p-GSK3- β , p-mTOR, p-p27, p-p53, p-P70S6K, p-4E-BP1, p-PDK1, p-PRAS40, p-PTEN, p-Raf-1, p-RPS6, p-RSK1, p-RSK2) fosforilasyon değişimleri incelenmiştir.

Son olarak, uygulanan ilaçların tümör dokularına ve organlara patolojik etkileri ile metastatik alanlar, hematoksilen-eozin boyamaları ile değerlendirilmiştir.

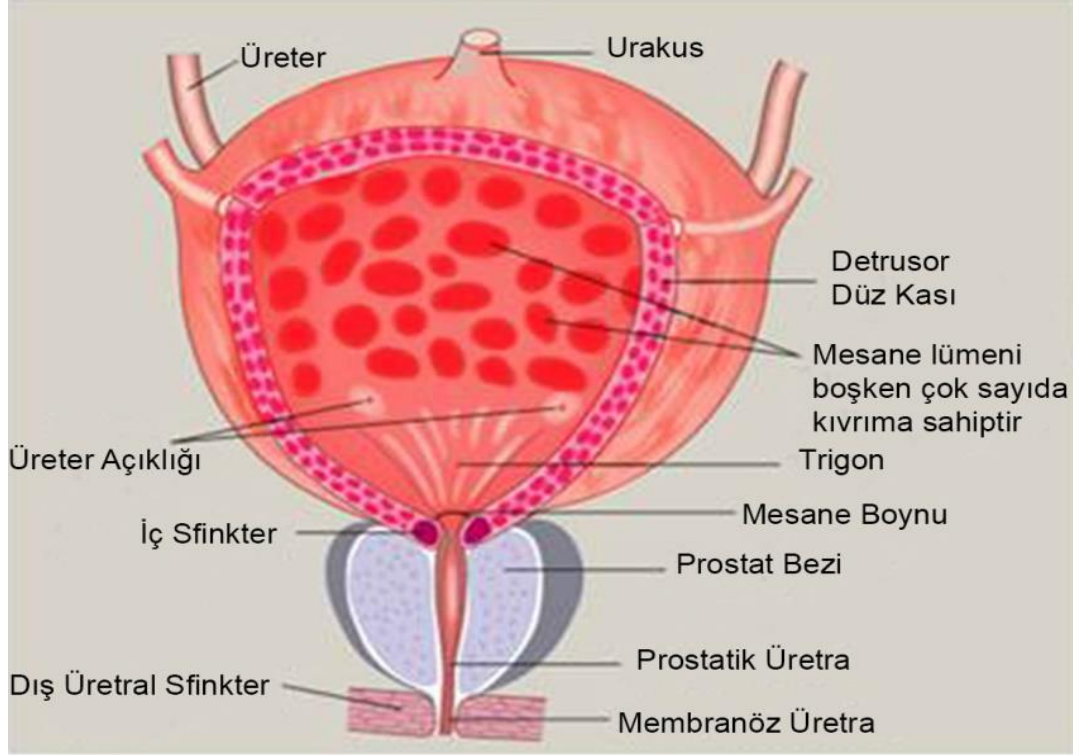


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mesane Anatomisi ve Biyolojisi

Pelviks boşlukta yer alan ve parietel peritonun altında bulunan mesane (idrar kesesi), böbrekten gelen idrarın geçici olarak biriktirildiği kas ve membrenöz yapıdan oluşan içi boş bir organdır. Mesanenin temel işlevleri; büyük miktarlarda idrarı düşük basınçlarda depolamak, kontrollü işemeyi (idrara çıkma) sağlamak ve idrar ile kan arasında uygun bir kimyasal gradiyent sağlamaktır. Böbreklerde oluşturulan idrar, üreter adı verilen iki kanal ile mesaneye iletilir. Mesanede biriken idrar, üretra (idrar yolu) denilen bir kanal ile vücut dışına atılır. Mesanenin büyüklüğü ve şekli içindeki idrar ve çevresindeki organların yaptığı basınca göre farklılık gösterebilmektedir (İnternet: Urinary Bladder, National Institutes of Health, 2020)

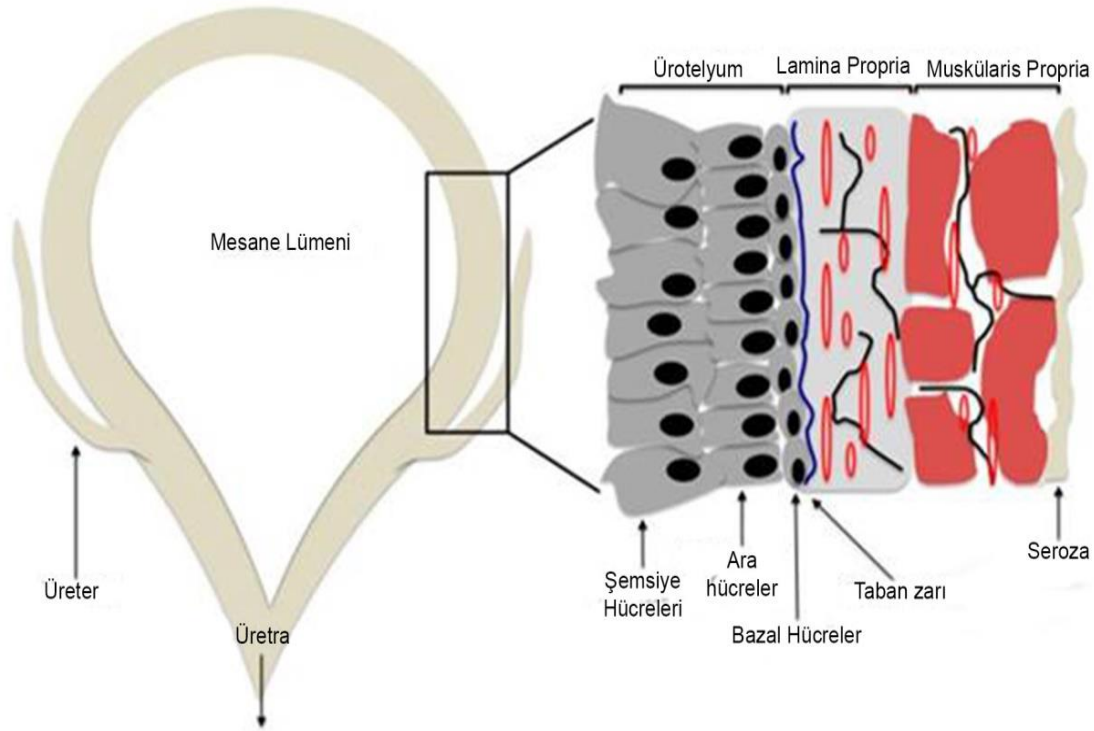
Mesane, ağırlıklı olarak düz kastan oluşur ve urakusu karın ön duvarına bağlayan bir tepe noktasına (apex), üreter açıklıklarının üzerinde uzanan bir gövde, trigon ve mesane boynunu içeren bir tabana sahiptir (Tanabalan ve Ballaro, 2019) (Şekil 2.1). Mesane boşaldığında mukozanın rugae adı verilen çok sayıda kıvrımı vardır. Bu kıvrımlar mesane doldukça genişlemesine izin verir. İdrar kesesi tabanında üç açıklığın oluşturduğu trigon adı verilen üçgen bir alan vardır. Açıklıklardan ikisi üreter kaynaklıdır ve trigonun tabanını oluşturur. Küçük mukozal flepler bu açıklıkları kapatır ve idrarın mesaneye girmesine izin veren ancak mesaneden üreterlere geri gelmesini önleyen valfler olarak işlev görür. Trigonun tepesindeki üçüncü açıklık, üretraya açılan deliktir. Detrusor kasının bir bandı, iç üretral sfinkteri oluşturmak için açıklığı çevreler (İnternet: Urinary Bladder, National Institutes of Health, 2020).



Şekil 2.1. Erkek alt idrar yolunun anatomisi (Tanabalan ve Ballaro, 2019)

Mesane'nin iç kısmı üriner sistemin diğer elemanlarında olduğu gibi ürotelyum denilen özelleşmiş bir epitelyumla kaplıdır. Epitelyumun altında lamina propria denilen bir bağ doku yer almaktadır. Bu bağ doku, mesane duvarını oluşturacak düz kasın (detrusor kası veya muskularis kası) kalın bir tabakası ile çevrelenmiştir. Kas tabakasının dışında, mesane duvarının dış yüzeyini kaplayan bir yağ tabakası olan serozal tabaka yer almaktadır. Ürotelyum üç hücre hattı içerir. Ürotelyum; p63, CK5 (KRT5) ve CK14 (KRT14) gibi yüksek moleküler ağırlıklı sitokeratinleri ifade eden, göreceli küçük kübik hücrelerden oluşan bazal hücreler; basal hücrelerden daha az miktarda yüksek moleküler ağırlıklı sitokeratinleri ifadeleyen ve ayrıca p63 ifade eden ara hücreler; üroplakin proteinlerini, CK18 (KRT18) ve CK20 (KRT20) düşük moleküler ağırlıklı sitokeratinleri ifade eden, şemsiye hücreleri olarak da adlandırılan yüzeysel hücreleri içermektedir (Şekil 2.2). Bunlar arasında yüzeysel hücreler, yüksek derecede özelleşmiş, göreceli olarak büyük ve çok çekirdekli hücrelerdir. Bu hücreler apikal yüzeylerinde, çözünmeyen ve yüksek derecede özelleşmiş yapılar içeren polarize membranlara sahiptir. Bu membranlar asimetric birim membran olarak isimlendirilir (AUM). Bu membranların içerdiği üroplakin proteinleri, idrarın tekrar emilimini engelleyen bir bariyer görevi görür. Bu yüzden bu hücrelere şemsiye hücreler denilmiştir. Mesane ürotelyumu, diğer

dokulara göre en yavaş yenilenme hızına oranına sahiptir. Ancak bakteriyel enfeksiyon veya toksinlere maruz kalma gibi durumlarda zarar gördüğü zaman mesane hızlı bir çoğalmaya gitmekte ve tüm mesane yenilenebilmektedir. Yetişkin bir bireydeki mesanedeki bu değişimler kök hücre veya progenitör hücrelerin rejenerasyon kapasitesi ile gerçekleşir. Bu hücrelerin bazal hücre hattında yer aldığı düşünülmektedir (Kobayash ve diğerleri, 2015).



Şekil 2.2. Mesane katmanlarının şeması. Ürotelyum, mesane lümenini kaplayan ve idrar-vücut bariyerini oluşturan tabakadır. Lamina propria, sinirleri ve damarları içeren bir bağ dokusu tabakasıdır (mavi çizgi = taban zarı, kırmızı çizgiler = kan damarları, siyah çizgiler = sinirler). Muskularis propria, mesaneye yapısal destek sağlayan ve fizyolojik olarak doldurma ve boşaltma işlevlerini kolaylaştıran kas tabakasıdır. Seroza en dıştaki katmandır (Chan ve diğerleri, 2017)

2.2. Mesane Kanseri

2.2.1. Epidemiyoloji

Mesane kanseri dünya çapında, en sık teşhis edilen 11. kanserdir (Babjuk ve diğerleri, 2019). Mesane kanserinin yaşa göre standardize edilmiş insidans (ASI), her 100.000 kişide 9.5 iken; daha az gelişmiş ülkelerde bu oran her 100.000 kişide

3.3'dür. En yüksek yaşa göre standardize edilmiş insidans; Avrupa ülkeleri (İspanya, İtalya, Danimarka ve İsviçre), Kuzey Amerika, bazı kuzey Afrika ülkeleri (örneğin Mısır) ve Batı Asya'da (Türkiye ve İsrail) özellikle erkeklerde görülmektedir. Buna karşılık, en düşük oranlar Orta ve Güney Amerika, Sahra Altı Afrika ve Güneydoğu Asya'da kaydedilmiştir. Ancak Mısır'da görülen mesane kanserlerinin %10-40'ı kan parazitleri kaynaklı enfeksiyonlarla ilişkili skuamöz hücreli kanserlerdir (şistozomiyaz; bilharzia olarak da bilinir). Bununla birlikte, bölgesel ölüm oranlarındaki farklılıklar, en azından kısmen, modern sağlık hizmetleri sistemlerine, hassas teşhis araçları ve en son tedavi protokollerine erişimin farklı olduğunu yansıtmaktadır (Sanli ve diğerleri, 2017).

Dünya sağlık örgütüne göre, mesane kanseri vakalarının ve ölümlerinin yakın gelecekte neredeyse iki katına çıkması beklenmektedir. Bu durum; çoğu mesane kanserinin 65 yaşın üzerinde teşhis edilmesi, yaşam beklentisinin zaman içinde artmasıyla açıklanmaktadır (Sanli ve diğerleri, 2017).

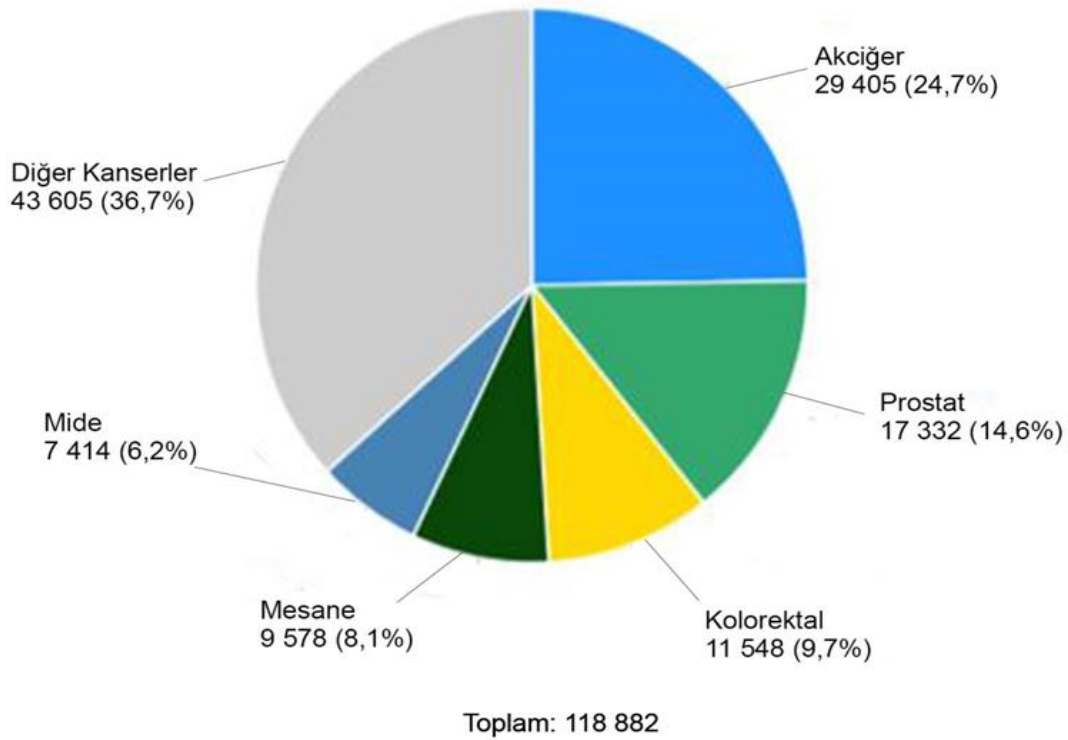
Mesane kanseri vakalarının yaklaşık % 80'i 65 yaş ve üstü yetişkinlerde teşhis edilmektedir. Kalıtsal genetik yatkınlıklar da mesane kanseri vakalarının yaklaşık %7'siyle ilişkilendirilmiştir (Saginala ve diğerleri, 2020).

Mesane kanseri, erkeklerde kadınlara göre daha yaygındır; insidans ve ölüm oranları erkeklerde her 100.000 erkekte sırasıyla 9,6 ve 3,2 olup, dünya genelinde kadınların yaklaşık 4 katıdır. Bu nedenle, hastalık erkekler arasında daha üst sıralarda yer almaktadır. Mesane kanseri, Dünya genelinde erkeklerde görülen en yaygın altıncı kanserdir (Bray ve diğerleri, 2018).

Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN 2018 verilerine göre Türkiye'de tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen dördüncü kanser türüdür (Bray ve diğerleri, 2018) (Şekil 2.3). Yine aynı verilere göre Türkiye'de en sık görülen (her iki cinsiyette) 7.kanser türü ve Türkiye'deki kanser türleri arasında 10. ölüm sebebidir (Bray ve diğerleri, 2018) (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. GLOBOCAN 2018 Türkiye kanser verileri

Kanser	Yeni vakalar				Ölümler			
	Sayı	Sıra	(%)	Kümülatif risk	Sayı	Sıra	(%)	Kümülatif risk
Akciğer	34 703	1	16.5	4.48	33 683	1	28.9	4.43
Meme	22 345	2	10.6	4.80	5 452	5	4.7	1.14
Prostat	17 332	3	8.2	5.16	5 165	6	4.4	0.93
Tiroid	13 033	4	6.2	1.42	742	21	0.64	0.09
Mide	11 934	5	5.7	1.45	10 006	2	8.6	1.19
Kolon	11 286	6	5.4	1.35	7 971	3	6.8	0.89
Mesane	11 235	7	5.3	1.46	4 222	10	3.6	0.46
Rektum	8 403	8	4.0	1.06	2 025	14	1.7	0.24
Pankreas	6 473	9	3.1	0.79	6 416	4	5.5	0.79
Lösemi	6 029	10	2.9	0.62	4 681	8	4.0	0.50

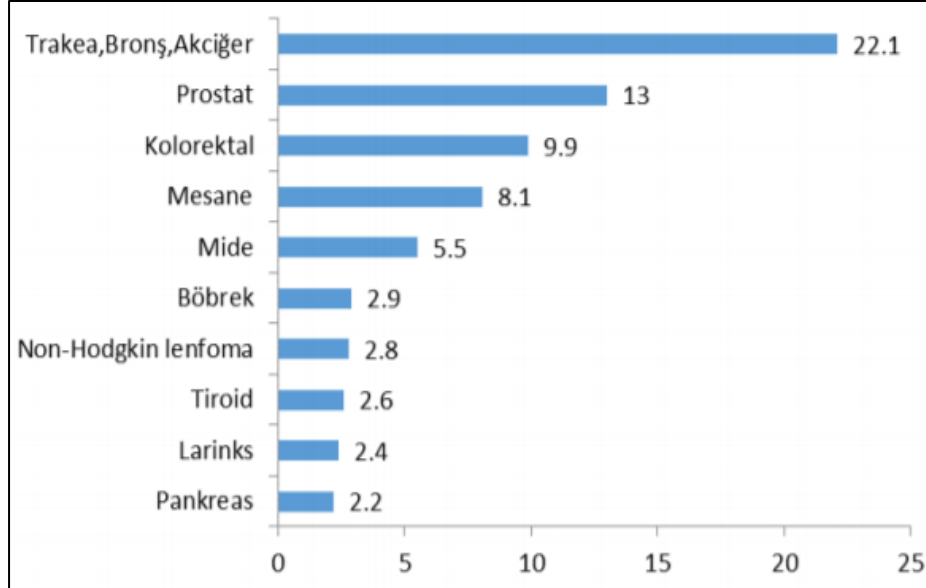


Şekil 2.3. GLOBOCAN 2018 Türkiye kanser verilerine göre tüm yaş gruplarındaki erkeklerdeki yeni vaka sayıları

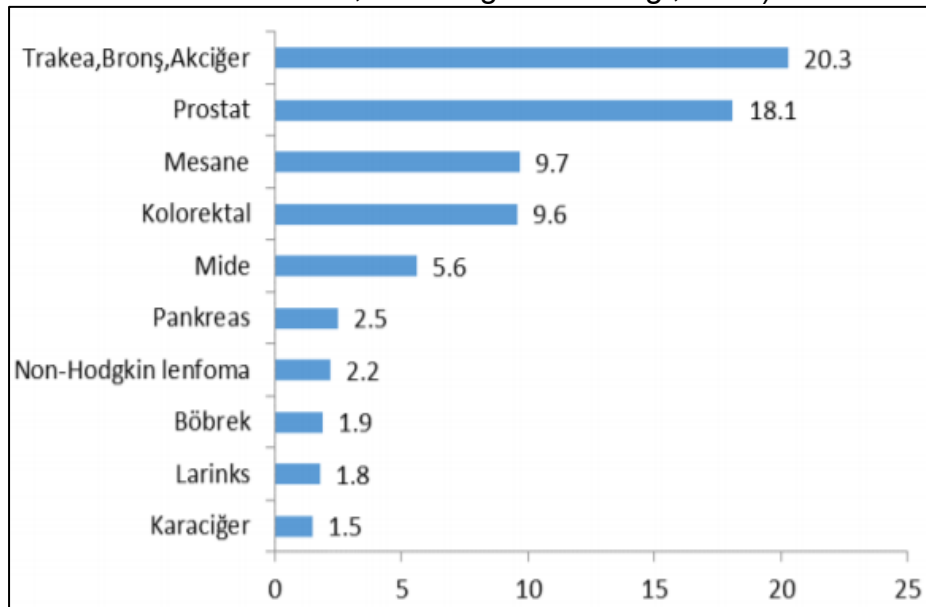
T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Kansere Dairesi Başkanlığı 2016 Türkiye verilerine göre tüm yaş gruplarındaki erkekler arasında en sık görülen 4.kanser türü iken 70 yaş üstü erkek hastalarda en sık görülen 3. kanser

türüdür (İnternet: Türkiye Kanser İstatistikleri, T.C. Sağlık Bakanlığı, 2016) (Çizelge 2.2 ve 2.3).

Çizelge 2.2. Tüm yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (Türkiye Kanser İstatistikleri, T.C. Sağlık Bakanlığı, 2016)



Çizelge 2.3. 70 ve üzeri yaş gruplarındaki erkeklerde en sık görülen bazı kanserlerin bu grup içindeki yüzde dağılımları (Türkiye Kanser İstatistikleri, T.C. Sağlık Bakanlığı, 2016)



2.2.2. Etiyoloji ve Risk Faktörleri

Mesane kanseri gelişimine neden olan risk faktörleri genel olarak kalıtsal (genetik yatkınlık) ve sonradan edinilen (çevresel maruziyet nedeniyle) olmak üzere ikiye ayrılabilir. Tütün kullanımı mesane kanseri için en önemli çevresel risk faktörüdür. Mesane tümörlerinin yaklaşık %50'sinden sorumludur ve sigara içenlerin sigara içmeyenlere göre 2,5 kat daha fazla mesane kanserine yakalanma riski bulunmaktadır. Tütün dumanı, β -naftilamin ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar gibi bilinen ürotelyal kanserojenleri içerir. Bu bileşikler böbrekler yoluyla atılır ve bu nedenle tüm üriner sistem üzerinde doğrudan kanserojen etki gösterir. İdrar akımının yavaşlamasıyla beraber idrarın mesanede kalma süreleri, mesane ürotelyumunun bu kimyasallara maruziyetini artırır, bu da alt üriner sistemde üst sisteme kıyasla artmış bir hastalık insidansı ile sonuçlanır (Mushtaq ve diğerleri, 2019). Mesane kanserinin en yaygın ikinci nedeni mesleki ürotelyal kanserojenlere maruz kalmaktır (Mushtaq ve diğerleri, 2019).

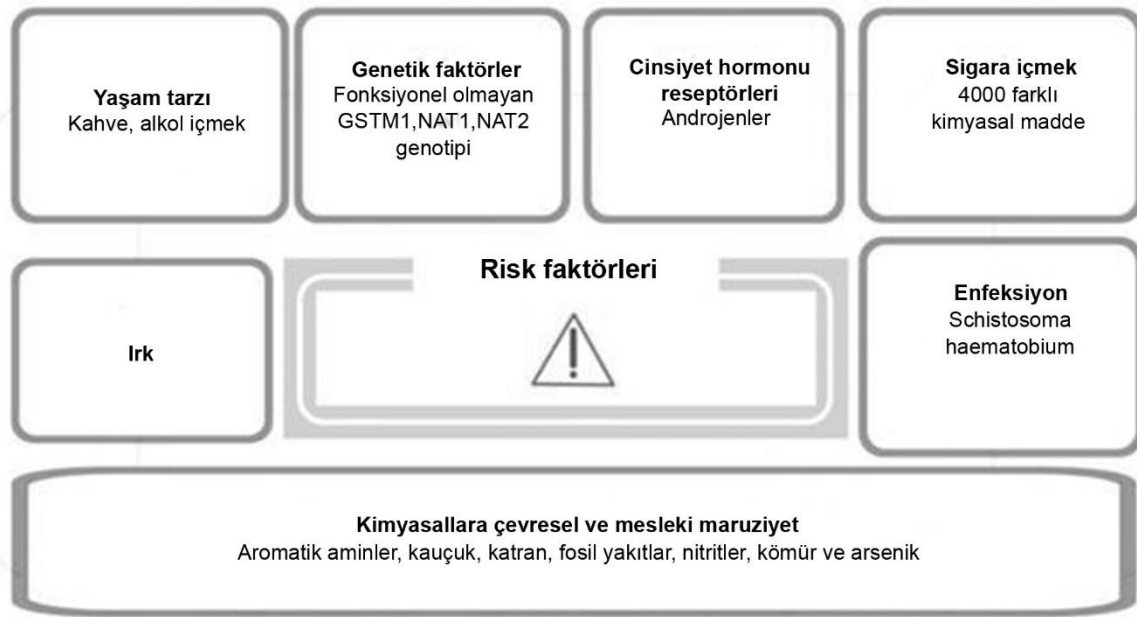
Analizlere göre, mesane kanseri gelişimi için en fazla risk boya, kauçuk, petrol ürünleri ve boyaların işlendiği endüstriyel alanlarda meydana gelirken, mesane kanserine özgü ölüm oranı için en fazla risk, elektrik ve kimyasal proses çalışanlarında meydana gelmektedir. Yaygın kentleşmeyle birlikte, birçok üretim süreci daha gelişmiş ülkelere aktarılmış ve bu durum da yerel işçiler için potansiyel olarak artan mesleki tehlikeler oluşturmuştur. Ek olarak, işsizlik, fiziksel olarak sağlıksız gün sayısı, ozon hava kirliliğine maruz kalınan gün sayısı, kuyulardan su elde eden evlerin oranı, madencilik endüstrisindeki istihdam, kentsel yaşam ve etnik köken, mesane kanseri ölüm oranı ile bağlantılıdır (Sanli ve diğerleri, 2017).

Meyve ve sebzelerce yetersiz beslenme, kentsel yaşam her zaman olmasa da artan mesane kanseri riskiyle bağlantılıdır. Erkeklerde metabolik sendromun mesane kanseri riskini etkilediği bildirilmiştir, ancak risk veya prognozla doğrudan veya dolaylı bir ilişki gösterilememiştir. Bazı bölgelerde artmış mesane kanseri verileri, arsenikle kirlenmiş su veya gıda tüketimiyle ilişkilidir. Örneğin, Arjantin, Şili ve Bangladeş'te arsenik kirliliği mesane kanseri riskiyle ilişkilendirilmiştir. Çevre kirliliğinin, daha az gelişmiş ülkelere mesane kanseri riskini etkilediği de

düşünülmektedir. Doğrudan yanan kimyasallar (çoğunlukla dizel ve benzinli motor egzozlarından, sabit elektrik santrallerinden ve iç mekan hava kirliliğinden) hava kirliliğinin başlıca kaynaklarıdır (Sanli ve diğerleri, 2017).

Bazı tedavi stratejileri, bireyleri mesane kanserine yatkın hale getirebilmektedir. Örnek olarak pelvik maligniteler için uygulanan eksternal ışın radyoterapisi, mesane kanseri riskini artırabilmektedir. Buna ek olarak, hematolojik malignitenin yönetiminde yaygın olarak kullanılan bir sitostatik ajan olan siklofosfamid, mesanenin skuamöz hücreli karsinomlarının gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Kronik inflamasyon, mesane kanserinin, tipik olarak skuamöz hücreli karsinomun bir nedenidir (Mushtaq ve diğerleri, 2019).

Bazı kanıtlar, mesane kanserine genetik yatkınlığı desteklemektedir. N-asetiltransferaz (NAT1, NAT2) ve GSTM1 gibi karsinojenlerin metabolizmasıyla ilişkili olan genlerin fonksiyonel olmayan genotipleri artan mesane kanserinin riski ile ilişkilidir. Özellikle, sigara öyküsü olan ve fonksiyonel olmayan GSTM1 genotipi barındıran kadınlar, sigara içmeyen akranlarına göre mesane kanseri gelişimine daha yatkındır. Genom boyu ilişki çalışmalarında (GWAS), mesane kanseri riskini artırabilecek dizi varyantları bulmuştur. Örneğin SLC14A1 geni tarafından kodlanan üre taşıyıcısındaki değişiklikler, böbrek idrar konsantrasyonu ile ilişkilidir ve kanserojenlerin ürotelyal yüzeylerle temasını etkileyebilmektedir (Sanli ve diğerleri, 2017). Ayrıca, retinoblastoma 1 (RB1) tümör baskılayıcı genin kalıtsal mutasyonlarının mesane kanseri gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mushtaq ve diğerleri, 2019) (Şekil 2.4).



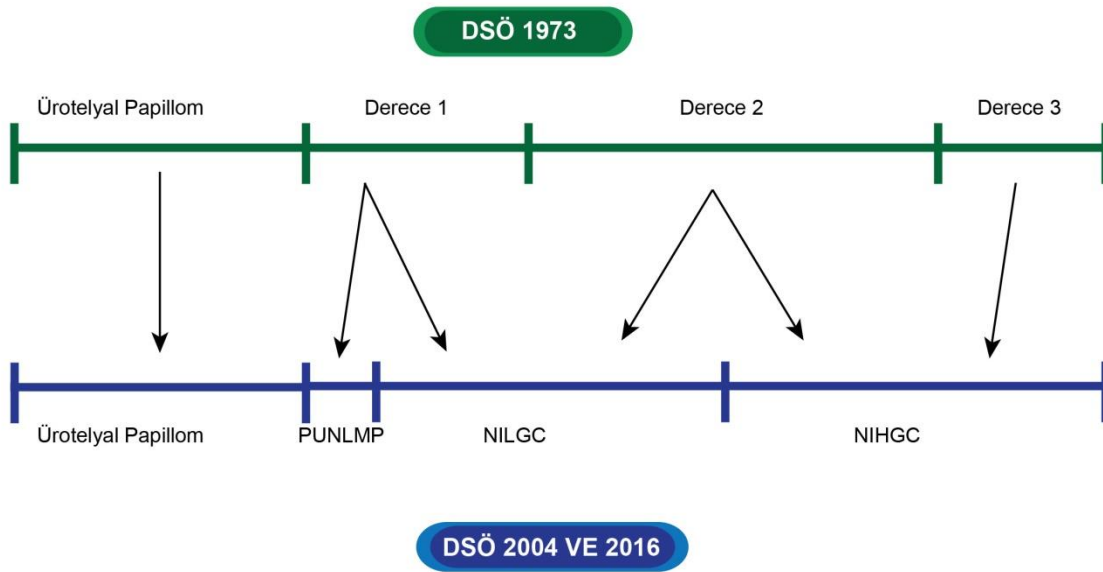
Şekil 2.4. Mesane kanseri gelişimine sebep olan risk faktörleri (Arantes-Rodrigues 2013)

2.2.3. Evreleme ve Derecelendirme

Ürotelyal karsinomun tedavisinde, tümör sınıflandırmasının amacı, tedavi sonuçlarının değerlendirilmesine izin vermek ve hasta yönetimini optimize etmek için tümörleri farklı prognostik gruplara ayırmayı amaçlamaktadır (Compérat ve diğerleri, 2019).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 1973 derecelendirme sistemi, non-invaziv papiller tümörleri farklılaşma derecelerine göre üç sınıfa ayırmıştır (G1, G2 ve G3 sınıfları). Tümörler, hücresel ve mimari atipi derecesine göre derecelendirilmiştir. En düşük derece (G1) neredeyse hiç atipi göstermezken, en yüksek derece (G3) polarite kaybı veya psödostratifikasyon gibi ana mimari bozukluklarla birlikte majör atipi gösterir. DSÖ/Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği (ISUP) 1998 sınıflandırması, papillomayı, düşük malign potansiyelli papiller ürotelyal neoplazm (PUNLMP), düşük dereceli (LG) ve yüksek dereceli (HG) karsinomlarına ayırmıştır. Bu sınıflandırma sistemi, PUNLMP kategorisini tanıtan ilk sistemdir. PUNLMP daha sonra DSÖ 2004 sınıflandırmasına dahil edilmiş ve DSÖ 2016 sınıflandırmasında yer almıştır. 2016 daki versiyonda non-invaziv terimini tanıtarak, 1973 derecelendirme sistemini; PUNLMP, non-invaziv papiller ürotelyal karsinom düşük

dereceli (NIHGC) ve non-invaziv papiller ürotelyal karsinom yüksek dereceli (NIHGC) tümörlere sınıflandırılmıştır. Mevcut sistemde bazı G2 tümörleri yüksek dereceli ve bazıları düşük dereceli olarak ayrılmıştır. Çoğu T1 tümör yüksek derecelidir ve daha önce G3 olarak sınıflandırılmıştır. Papilloma sınıflandırması değişmeden kalırken, bazı G1 tümörleri artık PUNLMP olarak sınıflandırılmaktadır (Jordan ve Meeks, 2019) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Ürotelyal karsinomun derece sınıflandırması (Compérat ve diğerleri, 2018)

DSÖ 2016 sistemine göre, pTa ve pT1 tümörleri hücresel özelliklerine göre LG ve HG olarak derecelendirilmiştir ve tüm detrusör kasa invaziv ürotelyal karsinomlar HG tümörleri olarak kabul edilir. pTa tümörleri lamina propriaya invaze olmazlar, buna karşın pT1 tümörleri bazal membranın altındaki lamina propriaya doğru büyür ve bu vakalarda lenfovasküler invazyon ve metastaz görülebilir (Compérat ve diğerleri, 2019). Karsinoma in situ (KİS), sıklıkla fokal veya multifokal düz lezyon olarak görülen, kasa invaziv olmayan yüksek dereceli bir tümördür (Batista ve diğerleri, 2020). Non-invaziv terimi, invaziv olmayan LG ve HG papiller karsinomları invaziv ürotelyal karsinomlardan ayırt etmek için DSÖ 2016 sınıflandırılmasında kullanılmıştır. Avrupa Üroloji Derneği (EAU) Kasa invaziv Olmayan Mesane Kılavuzları Paneli ve Dünya Sağlık Örgütü hem 1973 hem DSÖ

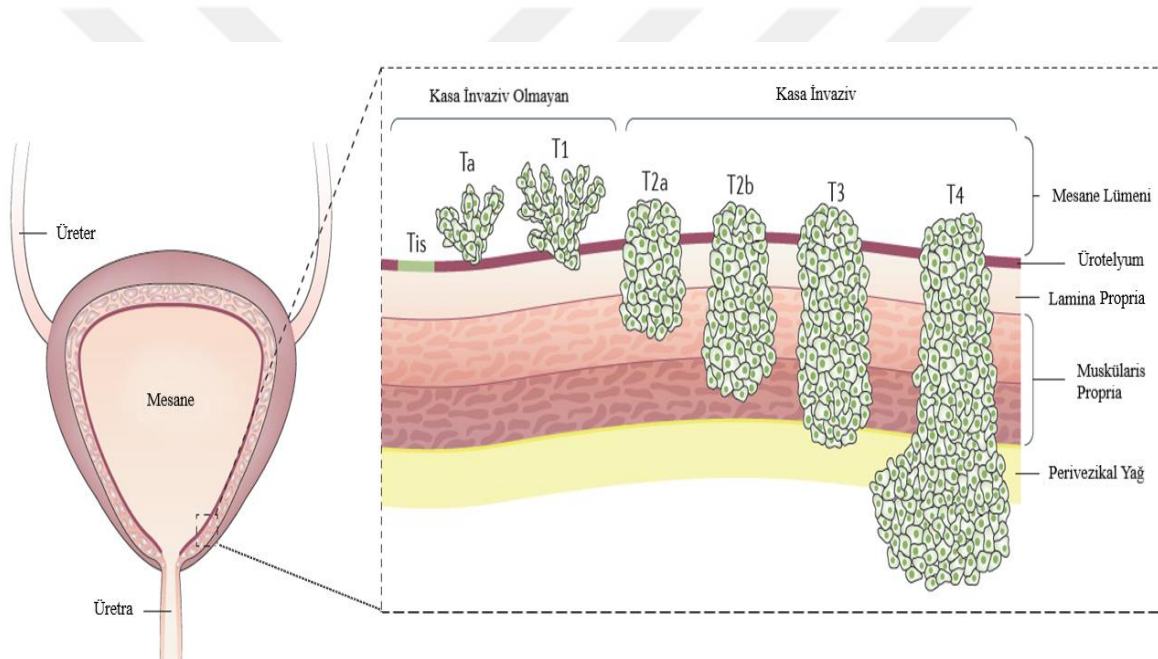
2004/2016 sınıflandırmalarının kullanılmasını önermektedir (Babjuk ve diğerleri, 2019; Compérat ve diğerleri, 2019).

Evreleme, genel olarak iki ana kategoriye ayrılır (KİOMK ve KİMK). Bu ayırım, bir başlangıç tedavisi seçerken belki de en önemli belirleyici faktördür (Matulay ve Kamat, 2018). TNM (tümör, düğüm, metastaz) sınıflandırması, tümör derinliğine, nod veya metastatik yayılmaya dayalı olarak, mesane kanserini evrelemek ve tedaviye rehberlik etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Mushtaq ve diğerleri, 2019). Bu evreleme sistemi; Amerikan Kanser Ortak Komisyonu (AJCC) ve Uluslararası Kanser Kontrolü Örgütü (UICC) işbirliğiyle geliştirilmiştir ve şu anda kullanılan sınıflandırma Ocak 2018'de yürürlüğe giren 8. düzenlemedir (Matulay ve Kamat, 2018) (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. 2017 Mesane kanseri TNM sınıflandırması (Babjuk ve diğerleri, 2019)

T-Primer Tümör	
TX	Primer tümör değerlendirilemiyor
T0	Primer tümör kanıtı yok
Ta	Noninvaziv papiller karsinom
Tis	Karsinoma İn Situ: 'düz tümör'
T1	Tümör subepitelyal bağ dokusuna invaze etmiş
T2	Tümör kasa invaze etmiş
T2a	Tümör yüzeysel kasi işgal etmiş (iç yarısı)
T2b	Tümör derin kasi işgal etmiş (dış yarısı)
T3	Tümör perivezikal dokuya invaze etmiş
T3a	Mikroskopik olarak
T3b	Makroskopik olarak (ekstravezikal kitle)
T4	Tümör aşağıdakilerden herhangi birini işgal etmiş: prostat stroması, uterus, vajina, pelvik duvar, karın duvarı
T4a	Tümör prostat stromasını, seminal vezikülleri, uterusu veya vajinayı işgal etmiş
T4b	Tümör pelvik duvarı veya karın duvarını işgal etmiş
N- Bölgesel Lenf Düğümleri	
NX	Bölgesel lenf düğümleri tespit edilemiyor
N0	Bölgesel lenf düğümleri metastazı yok
N1	Gerçek pelviste tek bir lenf düğümünde metastaz (hipogastrik, obturator, eksternal iliyak veya presakral)
N2	Gerçek pelviste birden fazla bölgesel lenf düğümünde metastaz
N3	Yaygın iliak lenf düğümlerinde metastaz
M - Uzak metastaz	
M0	Uzak metastaz yok
M1a	Bölgesel olmayan lenf düğümleri
M1b	Diğer uzak metastazlar

Evre sınıflandırmasında, invazyon durumuna göre mesane tümörleri, kasa invaziv olmayan (Tis, Ta ve T1) ve kasa invaziv tümörler (T2, T3 ve T4) olarak ayrılır. Mesane kanserinin yaklaşık % 70-80'i kasa invaziv olmayan olarak teşhis edilir ve Ta (% 70), T1 (% 20) ve birincil Tis (% 10) evrelerinden oluşur. Tedavi edilen KİOMK'un klinik seyri, yüksek intravezikal nüks oranına sahip olmakla beraber uygun sağkalım prognozu ile karakterizedir (Miyake ve diğerleri, 2018). Ta tümörleri ürotelyum ile sınırlıdır; T1 tümörleri lamina propriayı istila eder. T2, T3 ve T4 tümörleri ise sırasıyla yüzeysel kas, perivesikal yağ ve çevresel organlara yayılır. Mukoza ile sınırlı düz, yüksek dereceli tümörler KİS (Tis) olarak sınıflandırılır (Sjödahl ve diğerleri, 2012) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Tümör, Düğüm, Metastaz (TNM) sistemine göre mesane kanserinin evrelendirilmesi (Sanli ve diğerleri, 2017)

2.2.4. Teşhis

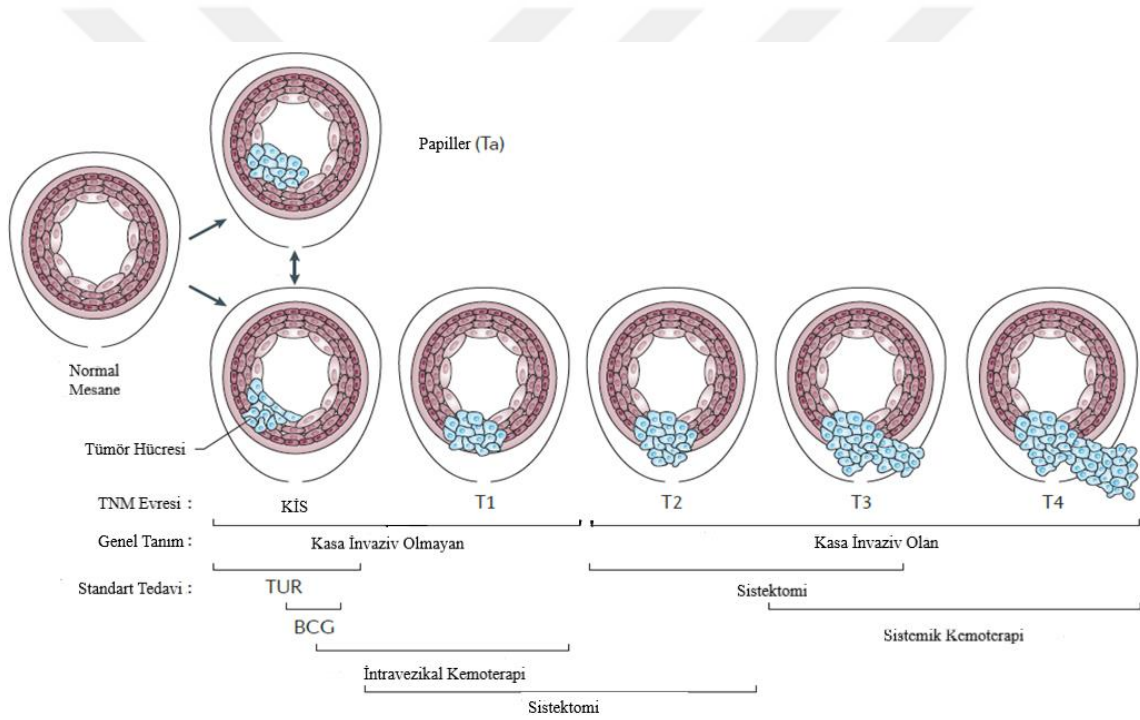
Mesane kanseri, çeşitli moleküler ve patolojik yollarla olan, dolayısıyla tümörün klinik evrelemesine ve moleküler tipine bağlı olarak farklı davranışları yansıtan karmaşık bir hastalıktır. Mesane kanserinin teşhisi ve izlenmesi esas olarak invaziv testlerle, yani periyodik sistoskopilerle gerçekleştirilir; ancak bu prosedür güvenilir bir yöntem olmasına rağmen hasta için oldukça rahatsız edicidir (Batista ve diğerleri, 2020). KİOMK'un tedavisinin başarılı olması büyük ölçüde, tipik olarak hematüri varlığında hastalığı doğru bir şekilde tespit etme ve ayrıca KİOMK

geçmiş olan hastalarda erken nükseden tümörleri tespit etme yeteneğine bağlıdır. Sistoskopi altın standart yöntem olmasına rağmen yine de tümörlerin % 10'unu gözden kaçırabilmektedir. Bu nedenle, doktorlar sıklıkla idrar sitolojisi gibi mesane kanseri teşhisine yardımcı olmak için ek araçlar kullanır. Sistoskopinin hassasiyet aralığı % 85-90'dır ve papiller tümörlerin % 10'unu gözden kaçırabilmektedir (Faiena ve diğerleri, 2019). Bu nedenle doktorlar, mesane kanserinin teşhisine yardımcı olması için sıklıkla yardımcı testler kullanırlar. Bir örnek, yüksek dereceli hastalıklar için iyi bir seçenek olan idrar sitolojisi (Faiena ve diğerleri, 2019). İdrar sitolojisinde, dökülen hücreler anormallik veya malignite için incelenmektedir. Bu test, ileri dereceli tümörler için yüksek hassasiyete sahiptir, ancak düşük dereceli tümörler için hassasiyeti düşüktür. Pozitif sitoloji, idrar yolunun herhangi bir yerinde bir ürotelyal tümör olduğunu gösterir. Bununla birlikte, negatif sitoloji, bir tümörün yokluğunu göstermez (Oeyen ve diğerleri, 2019). Ayrıca, tümör gözetimi yapılan hastalar tekrar edilen sistoskopiler tümörü gözden kaçırabilmektedir. Bu endişeler, idrar ve kan bazlı biyo-belirteçlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu testler geniş kapsamlıdır ve idrarda çözünür proteinlerin ölçümünün gerçekleştirildiği BTA, ImmunoCyt ve UroVysion testlerini veya DNA veya RNA anormalliklerini tespit eden genetik tabanlı idrar ve kan testlerini içerir (Faiena ve diğerleri, 2019).

2.2.5.Tedavi

Mesane kanseri için uygulanacak tedavinin etkinliği klinik evre ve risk faktörlerine göre değişkenlik göstermektedir. İnvaziv olmayan mesane kanserinde birincil tedavi mesane tümörlerinin transüretral rezeksiyonudur. Bu tedaviyi mitomisin C veya Bacillus Calmette-Guerin (BCG) aşısının mesaneye intravezikal verildiği tedaviler takip eder. Bu tedaviler düşük evreli hastalarda hastalıksız sağkalım süresini arttırmaktadır ancak ileri evreli hastalarda kanserin nüksetmesi yaygındır ve ileri düzeyde kasa invaziv mesane kanseri gelişmekte ve metastatik forma ilerleme görülmektedir (John ve Said, 2017). İleri evre veya transüretral rezeksiyon sonrası tümörün nüksettiği hastalar kanser hücrelerine karşı immün yanıtı arttırmak için birkaç döngü BCG ile tedavi edilir.

KİOMK'lu hastalar endoskopik rezeksiyon ile tedavi edilebilirken en çok ölüm; kasa invaziv tümörleri, bölgesel veya uzak metastazı olan hastalarda görülmektedir. Tek başına rezeksiyonla tedavi edilen tümörlerde yüksek nüks oranları görülmektedir. Bu nedenle, kemoterapötik ajanlarla adjuvan tedavinin kullanımına odaklanılmıştır. (Yuan ve diğerleri, 2014). Kasa inaziv mesane tümörleri için birincil tedavi, neoadjuvan veya adjuvan kemoterapiler ile radyasyon terapilerinin birlikte uygulandığı sistektomidir (mesanenin çıkartılması). Metastatik mesane kanseri tedavisinde genellikle; metotreksat, vinblastin, adriamisin ve sisplatini (MVAC) içeren çoklu ilaç rejimi veya alternatif olarak gemitabin ilave sisplatin uygulanmaktadır (John ve Said, 2017) (Şekil 2.7).



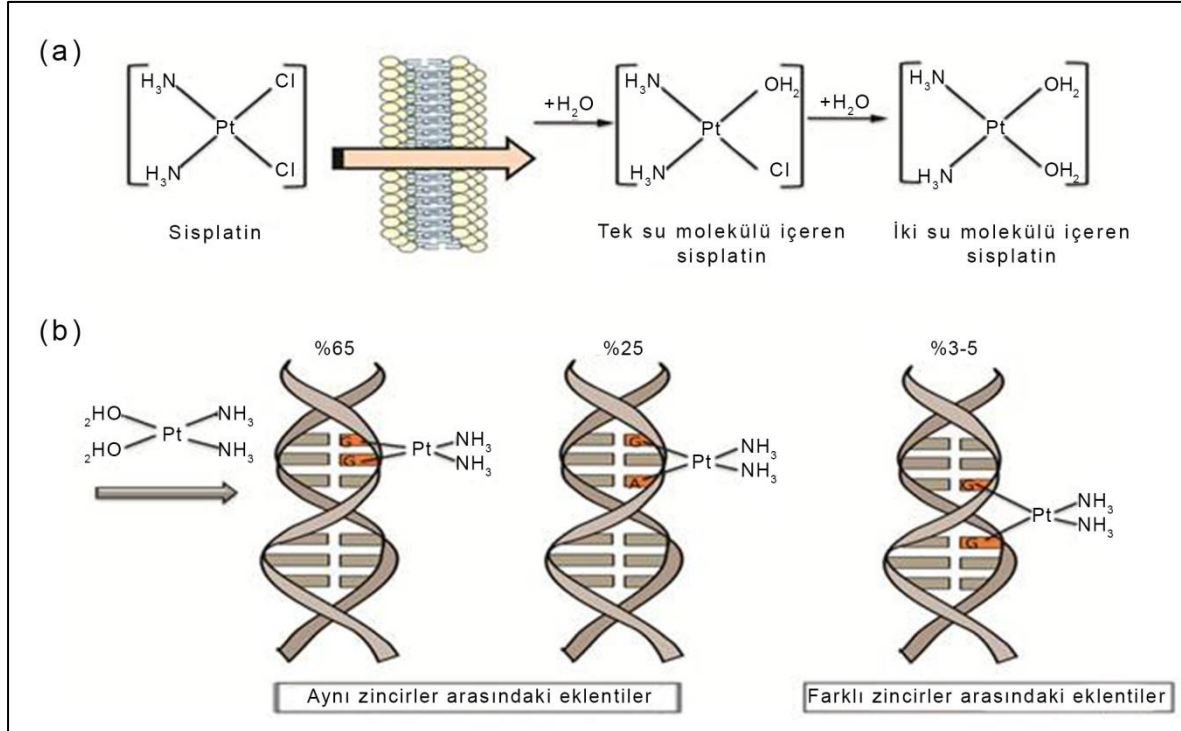
Şekil 2.7. Mesane kanserinin patolojik evrelerinin şematik gösterimi ve terapötik müdahaleler (Kobayashi ve diğerleri, 2015)

Sistektomi sonrası genellikle kemoterapi ve radyoterapi gibi adjuvan tedaviler uygulanır. Radyoterapi haricinde uygulanan kemoterapi tedaviler; sisplatinin tek başına veya 5- floroürasil ile uygulandığı, mitomisin C' nin 5- floroürasil ile birlikte uygulanması gibi seçenekleri içerir. Radyoterapinin beraber uygulandığı kemoterapi uygulamaları; gemitabin-sisplatin, metotreksat, vinblastin, doksorubisin ve sispatini içeren MVAC protokolü, karboplatinin paklitaksel veya dosetaksel ile kombinasyonlarını içermektedir. Sisplatin-bazlı MVAC uygulamasının nod positif mesane kanserli hastalarda median sağ kalım süresini

arttırdığı ancak bu hastaların sisplatin temelli tedaviye düşük tolerans gösterdikleri ve yan etki görülen hastalarda uygulanan dozun düşürülmesi gerektiği rapor edilmiştir. Bazı hastalarca kemoterapi uygulamalarının tolere edilememesinden dolayı daha az yan etki oluşturan tedavilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır (Smolensky ve diğerleri, 2016).

2.2.6. Sisplatin

Elektrik alanlarının *Escherichia coli* (E.coli) büyümesi üzerindeki etkisini inceleyen araştırmacılar tarafından keşfinden bu yana sisplatin, cisplatinum veya cis-diamminedichloroplatinum (II), birçok metastatik tümör tipine karşı kemoterapötik bir ajan olarak kullanılmıştır (Drayton ve Catto, 2012). Sisplatin ilk kez 1978'de Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından testis kanserinin tedavisi için onaylanmış ve bu popülasyonda hayatta kalma sonuçlarını önemli ölçüde iyileştirmiştir. İyileştirilmiş yanıt oranlarına ve hayatta kalma sonuçlarına rağmen, sisplatinin toksisite profili klinik uygulamada sınırlıdır ve birçoğunda çoğunlukla renal, gastrointestinal veya nörolojik komplikasyonlar şeklinde bildirilen ciddi yan etkiler ile ilişkilidir. Sisplatin, cis konumunda iki klorür atomu ve iki amin molekülü çevrili bir platin iyonu tarafından oluşturulan bir moleküldür. Sisplatinin etki mekanizması esas olarak DNA hasarına dayanmaktadır. Hücrenin içine girdikten sonra sisplatin, akuasyon olarak adlandırılan bir süreç ile bir veya iki klor atomunun su aracılığıyla yer değişimiyle aktive olur. Bu işlem sayesinde ilaç, pozitif yüklü hale gelir ve DNA molekülü ile etkileşime girerek DNA eklentilerinin oluşumunu başlatır. Aktive edilen sisplatin, tercihi olarak pürin bazlarındaki nükleofilik N7 bölgelerine bağlanır, burada eklentilerin çoğu, aynı zincirdeki iki guanin arasında meydana gelmektedir. Buna karşın, sisplatin eklentilerinin yaklaşık % 3–5'i zıt zincirlerdeki purinlerle reaksiyona girerek zincirler arası çapraz bağlar oluşturur (Kishimoto ve diğerleri, 2020) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Sisplatinin kimyasal yapısı. a) Sisplatin aktivasyon süreci, klorürünün bir veya ikisinin su molekülleri ile değiştirilmesiyle meydana gelir. b) Temel DNA lezyonları, aynı ve farklı DNA zincirleri arasındaki sisplatin eklentileri (Kishimoto ve diğerleri, 2020)

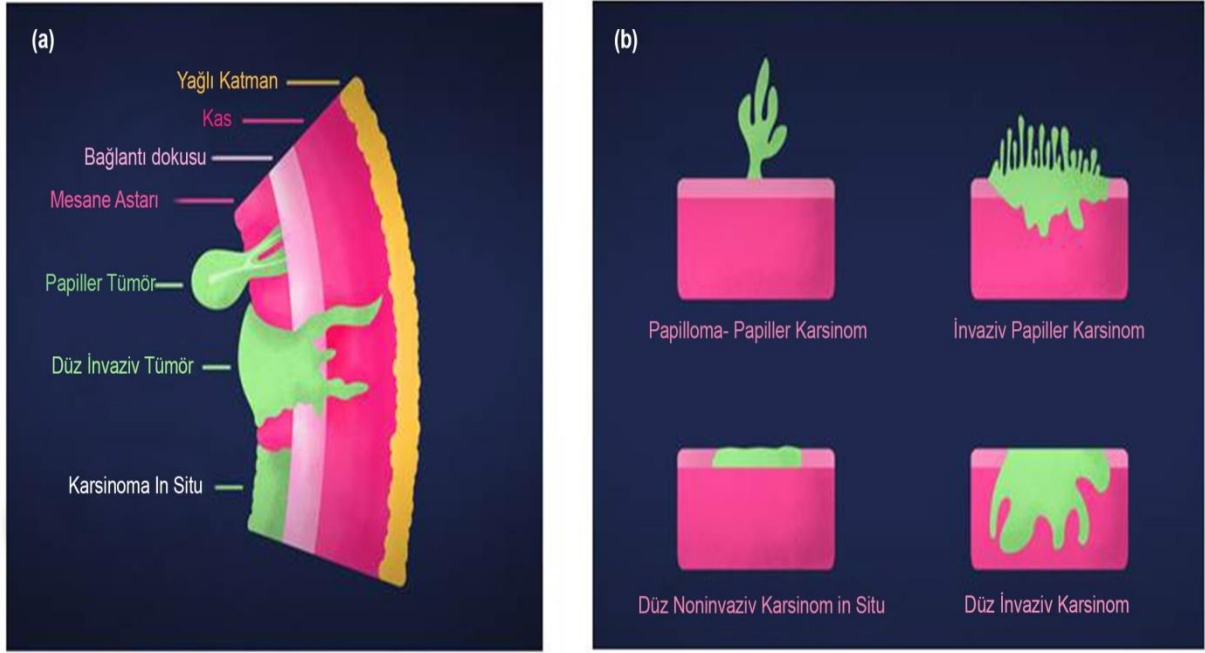
DNA lezyonları sırayla bir dizi sinyal iletim yolunu tetikleyerek apoptoza neden olmaktadır (Rocha ve diğerleri, 2014). Sisplatinin diğer etki mekanizmaları arasında; reaktif oksijen türleri üretimi ve lipid peroksidasyonu ile karakterize edilen oksidatif stresin indüksiyonu, p53 sinyalinin indüksiyonu ve hücre döngüsü durması, proto-onkogenlerin ifadelerinin azalması gibi çeşitli moleküler etki mekanizmaları yer almaktadır (Dasari ve Tchounwou, 2014). Sisplatinin hücre içine alımında azalma, biyotransformasyon ve detoksifikasyonun artması, artan DNA tamir mekanizması, anti-apoptotik mekanizmaların artması, sisplatine direncinin gelişiminde görülen mekanizmalardan bazılarıdır (Dasari ve Tchounwou, 2014). Sisplatin, mesane kanseri de dahil olmak üzere birçok genitoüriner tümör için tedavinin temel taşı olmaya devam etmektedir (Desilets ve diğerleri, 2020).

2.2.7. Mesane Kanseri Patolojisi ve Farklı Tipleri

"Mesane kanseri" terimi, bir dizi patolojiye ve beklenen prognoza sahip heterojen bir hastalıklar kümesini ifade eder. Bu kanserlerin çoğu ürotelyum adı verilen bir hücre tabakasında geliştiği için (yaklaşık %90) ürotelyal karsinom olarak

adlandırılır. Bu tip mesane kanseri için başka bir isim de değişici epitel hücreli karsinomdur. Geri kalan türleri (ürotelyal kökenli olmayan, yaklaşık %10), primer skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom, küçük hücreli karsinom ve sarkomatoid karsinomu içerir (Kobayashi ve diğerleri, 2015). Çoğu mesane kanseri, ürotelyum veya değişici epitel adı verilen mesanenin en iç yüzeyinde başlar. Kanser, mesane duvarındaki diğer katmanların içine ilerledikçe, derecesi artar ve tedavisi daha zorlaşır. Zamanla kanser, mesanenin dışında ve yakındaki yapılara doğru büyüyerek, yakındaki lenf düğümlerine veya vücudun diğer bölgelerine yayılabilir. Mesane kanserleri, genellikle mesane duvarına yayılma derecesine göre tanımlanır (İnternet: About Bladder Cancer, American Cancer Society,2020).

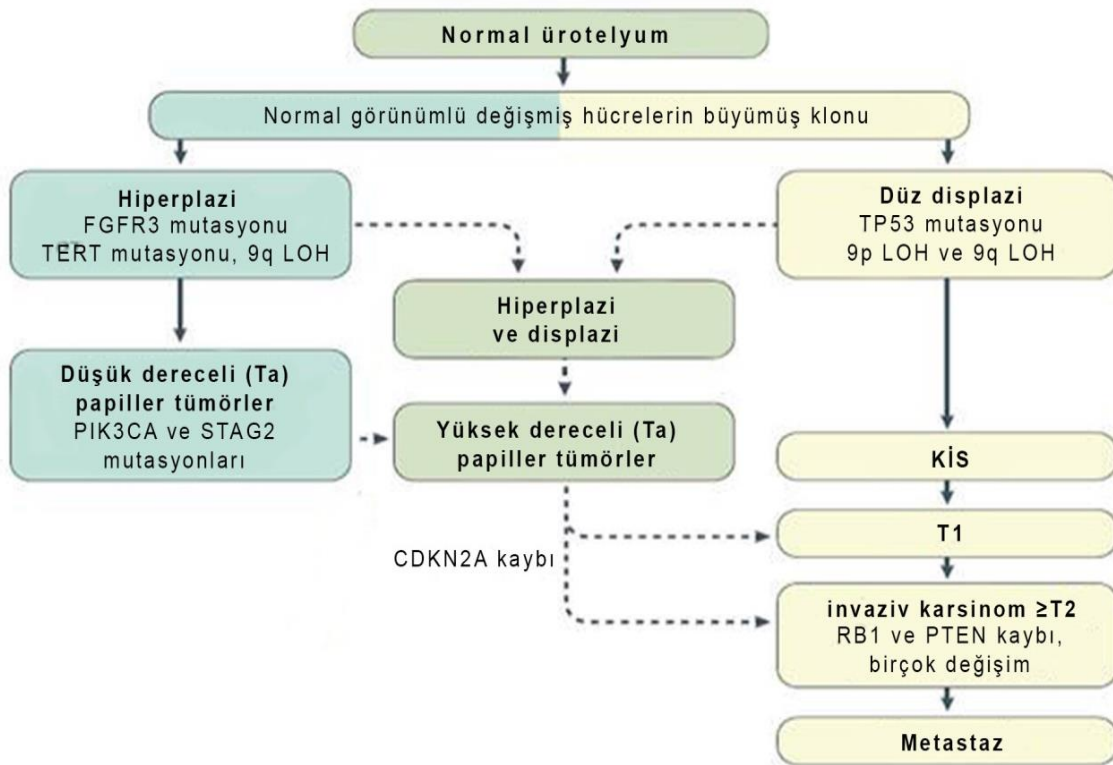
Mesane kanseri, invaziv veya non-invaziv olabilir. İnvaziv değilse, tüm kanser hücreleri hala mesane duvarının (ürotelyum) kaplamasındaki ince hücre katmanında bulunur ve mesanenin derinliklerine doğru büyümemiştir. İnvaziv ise, kanser hücreleri mesane duvarının derinliklerine doğru büyümüştür. İnvaziv olan mesane kanserinin mesane kasına ve vücudun diğer bölgelerine yayılma olasılığı daha yüksektir. Mesane tümörünün şekli papiller veya düz olabilir. Hem papiller hem de düz tümörler, kanser hücrelerinin nasıl büyüdüğüne bağlı olarak invaziv veya non-invaziv olabilir. Papiller tümörler, parmak şeklindeki ince oluşumlarla, iç astardan mesanenin boş merkezine doğru büyür. Bunlar genellikle non-invazivdir, çünkü mesane duvarlarının içine doğru daha derin değil, mesane astarından dışarı doğru büyürler. Yavaş büyüyen, invaziv olmayan papiller mesane kanserinin bir türü, PUNLMP olarak adlandırılır. Düz karsinomlar, mesanenin içi boş kısmına doğru hiç büyümmez. Düz bir tümör sadece mesane hücrelerinin iç tabakasındaysa, invaziv olmayan düz karsinom veya KİS olarak bilinir, ancak mesane duvarının derinliklerine doğru büyüyorsa, buna invaziv olan olan düz karsinom denir (İnternet: Types of Bladder Cancer,BladderCancer.net, 2020) (şekil 2.9).



Şekil 2.9. Mesane kanseri tipleri. a) Mesane duvarının katmanları. b) İnvazyon durumuna göre farklı mesane tümörleri. Her bir tümör tipi, mesanenin bir veya daha fazla bölgesinde mevcut olabilir ve aynı anda birden fazla tip mevcut olabilir. (İnternet: Types of Bladder Cancer, BladderCancer.net, 2020)

2.2.8. Mesane Kanserinin Gelişiminde Rol Oynayan Mekanizmalar

Fare modellerinden ve insan örneklerinden alınan patolojik ve klinik bilgiler, ürotelyal karsinomun iki farklı yolla geliştiğini ve papiller KİOMK ve papiller olmayan KİMK'lere yol açtığını göstermektedir (Sanli ve diğerleri; Bertz ve diğerleri, 2017). Bu iki yollu gelişim modelinde kromozom 9 daki heterozigozite kaybı hem KİOMK hem de KİMK'de (>% 50) ortak bir olaydır (Inamura, 2018). Haritalama çalışmaları ile 9. kromozomda birkaç tümör baskılayıcı gen tanımlanmıştır: CDKN2A (9p21), hücre döngüsünün negatif düzenlenmesinde rol oynar; TSC1 (9q34), mTOR yolağının negatif düzenleyicisidir ve PTCH1 (9q22) başlangıçta bazal hücre karsinomada tanımlanmıştır (Audenet ve diğerleri, 2018). Ek olarak, bu kromozomal değişiklik, mesane kanserinin başlamasında çok erken bir adımı gösteren pre-neoplastik öncüllerin yanı sıra hastaların "normal" ürotelyumlarında da bulunmuştur. Bu bulgular, histolojik olarak göze çarpmayan ancak genetik olarak değiştirilmiş ürotelyumdan mesane kanserinin çok odaklı gelişimi hipotezini desteklemektedir (Obermann ve diğerleri, 2004) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Papiller KİOMK ve solid KİMK için iki potansiyel patogenezi yolunun gösterimi (Sanli ve diğerleri, 2017)

Mesane kanserleri, yüksek bir mutasyon yüküne ve ölçülmesi zor kalan genomik, transkripsiyonel ve hücresel seviyelerde önemli intra-tümöral ve inter-tümöral heterojenliğe sahiptir. Mesane kanseri akciğer kanseri ve melanom kanserlerinden sonra üçüncü en yüksek mutasyon sıklığına sahip kanserdir (Ju ve diğerleri, 2017). Bu mutasyon yükünün önemli bir kısmının APOBEC ("apolipoprotein B mRNA düzenleme enzimi, katalitik polipeptit benzeri") sitidin deaminaz enzim ailesi tarafından kaynaklandığı bulunmuştur. Kanser Genom Atlası (TCGA) kasa invaziv ürotelyal karsinom hasta kohortundan alınan mutasyonel imzaların analizi, hem APOBEC3A hem de APOBEC3B imzalarının tek nükleotid varyasyonlarının % 67'sinden sorumlu olduğunu göstermiştir (Robertson, ve diğerleri, 2018; Meeks ve diğerleri, 2020). Benzer mutasyon özelliklerine rağmen, iki gruptaki mutasyon yükü ve genomik yapıdaki tüm değişiklikler birbirinden farklıdır. Ekzom sekanslama ile KİMK'de her bir örnekte ortalama 302 mutasyon belirlenmişken, bu oran KİOMK'da örnek başına ortalama 169-195 mutasyondur. KİOMK'lar çoğunlukla diploid veya diploide yakın karyotipler ve az sayıda kopya sayısı değişiklikleri içermektedir. Buna karşılık KİMK'ler çoğunlukla anöploiddir ve çok sayıda sayısal kromozomal değişiklikler, kromozom yeniden düzenlemeleri ve

kopya sayısı değişiklikleri içerirler. Bu mutasyonel profile, her iki gruptaki mutant gen kalıplarındaki büyük farklılıklar da eşlik eder (Sanli ve diğerleri, 2017). Telomeraz Ters Transkriptaz (TERT) promotör mutasyonları, tüm aşamalarda ve derecelerde meydana gelen, mesane kanserinde bugüne kadar tanımlanan en yaygın genomik değişikliktir (% 60-80). Bu mutasyonlar, hastalık tespiti ve gözetimi için potansiyel biyobelirteçleri temsil eder. Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3 (FGFR3) genindeki aktive edici mutasyonlar ise mesane kanserinde en sık görülen ikinci gen değişikliği grubunu temsil eder. Bu değişiklikler esas olarak düşük dereceli KİOMK'larda, görülür. FGFR3 mutasyonları mesane tümör oluşumunda en erken meydana gelen değişimlerden ve prognostik önemi vardır (Bertz ve diğerleri, 2017). Hem KİOMK hem de KİMK; KDM6A, KMT2A, KMT2C, KMT2D, ASH1L, CREBBP, EP300, ARID1A ve ARID4A dahil olmak üzere kromatin modifikasyonunda yer alan genlerin sık mutasyonlarını barındırır (Hurst ve diğerleri, 2018).

Kasa İnvaziv Olmayan Mesane Kanseri

Kasa invaziv olmayan düşük dereceli papiller tümörler sitogenetik olarak kromozom 9 heterozigositesinin kaybı ve moleküler seviyede ise FGFR3, PIK3CA ve STAG2 mutasyonları ile karakterize edilmiştir (Audenet ve diğerleri, 2018). Özellikle FGFR3 genindeki aktive edici mutasyonların, düşük derece KİOMK'un gelişiminde anahtar mutasyonel itici güç olduğu düşünülmektedir (Chandrasekar ve diğerleri, 2018). FGFR3'teki aktive edici mutasyonlar, düşük dereceli Ta tümörlerin %70'ine kadarında meydana gelir, ancak T1 ve kasa invaziv tümörlerde daha az yaygındır (Hurst ve diğerleri, 2018). FGFR3'ün mutasyonel aktivasyonu, kasa invaziv olmayan tümörlerin olumlu seyri ile ilişkilidir. İyi bilinen bir proliferasyon belirteci olan Ki-67 ile FGFR3 mutasyonları, Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Örgütü (EORTC) tarafında moleküler derecelendirme sistemini tanımlamak için kullanılmıştır (Bertz ve diğerleri, 2017). Bu nokta mutasyonlarından başka tüm tümörlerin yaklaşık %5'inde FGFR3'ün TACC3 veya BAIAP2L1 genleri ile yaptığı translokasyonlar mevcuttur. Bu translokasyonlar sonrası FGFR3-TACC3 ve daha az sıklıkla FGFR3-BAIAP2L1 füzyonları oluşmaktadır. Bu füzyon proteinleri potansiyel dönüştürücü onkogenlerdir (Sanli ve diğerleri, 2017). FGFR3 aktivasyonu ile aşağı yöndeki kinaz yolları aktive olur.

Özellikle hücre döngüsünü düzenleyicisi olan RTK/RAS/RAF yolağı mitotik sinyaller tarafından uyarılır ve epitel hücrelerinin kendilerini yenilemesinde ve çoğalmasında merkezi bir rol oynar. RAS gen ailesindeki aktive edici mutasyonlar, bazı KİOMK'larda görülmektedir. Genel olarak, RTK/RAS/RAF yolağının aktivasyonunun, düşük dereceli non-invaziv tümörlerin % 80'inden fazlasının gelişimine neden olduğu düşünülmektedir. PI3K/AKT/mTOR yolağı hücre içi sinyalizasyonda çok önemli bir rol oynar ve PIK3CA'daki aktive edici mutasyonlar, FGFR3 ile sıklıkla ilişkilidir (Audenet ve diğerleri, 2018). TSC1'i de içeren tümör baskılayıcı genlerdeki inaktive edici mutasyonlar vakaların %15'inde görülmektedir. Birkaç mutasyon da TSC2 geninde görülmüştür. TSC1–TSC2 kompleksi, mTOR yolağını düzenlemektedir. Dolayısıyla TSC1 genindeki bir kopya kaybı veya mutasyon, KİOMK'da yaygın bir durum olan mTOR sinyalinin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca kohesin kompleksi tümör baskılayıcı geni olan STAG2'deki inaktive edici mutasyonlar, KİOMK için karakteristiktir ve yüksek sıklıkta tanımlanmıştır (Sanli ve diğerleri, 2017). PIK3CA'daki aktive edici mutasyonlar da Ta tümörlerinde yaygındır. PIK3CA ve STAG2 genlerindeki mutasyonlar düşük ilerleme riski ile ilişkiliyken, CDKN2A tümör baskılayıcı genindeki homozigot delesyonları yüksek ilerleme riski ile ilişkilidir (Audenet ve diğerleri, 2018). Tüm ekzon sekanslama çalışmalarında KDM6A, CREBBP, EP300 ve ARID1A gibi kromotin modifiye edici proteinleri kodlayan genlerdeki inaktive edici mutasyonlar tanımlanmışlardır. Bu inaktive edici mutasyonlar, KİMK'leri de içinde bulunduran diğer kanser tipleri arasında KİOMK da önemli ölçülerde yüksek frekanslarda bulunmaktadır. Bu veriler, epigenetik değişikliklerin bu tümörlerin fenotiplerini şekillendirmede önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Sanli ve diğerleri, 2017).

Kasa İnvaziv Mesane Kanseri

KİMK'ler genetik kararsızlıkla karakterize edilir. Birçok değişiklik ve kromotripsis ile görülen anöploidi ve ayrıca 8p, 2q ve 5q kromozomlarının delesyonları, KİMK'in özelliklerini temsil eder ve agresif hastalığın gelişmesine yol açar (Audenet ve diğerleri, 2018). Hücre döngüsünün G1 kontrol noktasındaki değişim, invaziv mesane kanserinin başlamasında kritik basamaklardır. Dolayısıyla neredeyse her KİMK'de TP53, RB1 ve CDKN2A mutasyonları veya MDM2 ve E2F3

amplifikasyonları görülmektedir. RB1 yolağı da KİMK'lerde yaygın olarak değişmiştir. RB1 hücre döngüsünün negatif düzenleyicisidir ve inaktivasyonu genetik kararsızlık ve anti-apoptotik fenotip ile ilişkilidir. Ayrıca, hem p53 hem de Rb1 genleri mutant olan ürotelyal tümörler, tek bir genin de mutant olduğu tümörlerden daha yüksek nüks, progresyon ve daha kötü sağkalım oranına sahiptir. Bu sonuç, p53 ve RB1'in sinerjistik bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. PTEN heterozigositesinin kaybına bağlı olarak PI3K/AKT/mTOR yolağının aktivasyonu, KİMK gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır. Aynı zamanda PTEN gen ifadesindeki azalmanın TP53 mutasyonları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Audenet ve diğerleri, 2018).

TP53/RB1 yolağı, tümörlerin KİS yoluyla displaziden invaziv tümörlere ilerlemesine neden olur. TP53 mutasyonu sıklıkla ürotelyal displazinin gelişimi sırasında ortaya çıkmaktadır. RB1 kaybı ise, ürotelyal hiperplaziden KİS'e dönüşümünde rol oynamaktadır. Hiperplazi ve displazili lezyon (sitolojik atipi ile hiperplastik lezyon) her iki yol arasındaki etkileşimlerde rol oynayabilmektedir (Inamura, 2018).

2014 yılında, TCGA grubu 131 yüksek dereceli KİMK vakasında önemli ölçüde mutasyona uğramış 32 gen belirlemiştir. Sonraki genişletilmiş TCGA çalışmasında 412 KİMK vakasını analiz edilmiştir. TP53 (% 48), KMT2D (% 28), KDM6A (% 26), ARID1A (% 25), PI3K3CA (% 22), KMT2C (% 18), RB1 (% 17) EP300 (% 15), FGFR3 (% 14), STAG2 (% 14) genleri dahil olmak üzere önemli ölçüde mutasyona uğramış 58 gen tespit edilmiştir. TCGA verilerine göre, KİMK'lerin % 89'unda TP53 hücre döngüsü yolağı inaktiftir. Vakaların % 48'inde TP53 mutasyonları, % 6'sında MDM2 amplifikasyonu ve %19'unda MDM2 aşırı ifadesi tespit edilmiştir (Robertson ve diğerleri, 2017; Inamura, 2018). RTK/RAS/PI3K yolağının, KİMK'lerde (%71) hücre büyümesini ve proliferasyonunu etkilediği sıklıkla gözlenmiştir. ERBB2, ERBB3, FGFR1 ve FGFR3 gibi RTK'lar mesane kanserinde genellikle aktive olmaktadır ve bu RTK'lar ayrıca RAS sinyal yolağını aktive ederler. RAS-RAF sinyal kaskadı ayrıca proliferasyon ve hayatta kalma gibi çoklu hücresel etkilerden sorumlu olan birkaç aşağı akış substratının fosforilasyonuna yol açar. AKT1, ağırlıklı olarak mesane karsinomunda eksprese edilir ve bunu AKT2 ve AKT3 izler. AKT1, tümörjenez ve mesane karsinom hücrelerinin invazyonunda güçlü bir şekilde rol oynar ve AKT1 inhibisyonunun mesane

karsinomu olan hastalarda baskılayıcı etkilere yol açabileceği bilinmektedir (Sharma ve diğerleri, 2018).

2.2.9. Mesane Kanseri Alt Tipleri

Ürotelyal karsinomun en önemli özelliklerinden biri, son derece heterojen genetik bir profile sahip olmasıdır (Comp  rat ve diğerleri, 2018). Ürotelyal karsinomun histolojik ve moleküler analizleri genellikle genomik, transkripsiyonel ve hücresel düzeylerde tümör içi ve tümörler arası heterojenliği ortaya çıkarır. Tümörün klonal başlangıcına rağmen, progresyon ve metastaz genellikle doğal olarak veya tedavi sırasında gelişebilen alt klonlardan kaynaklanır ve bu da heterojen bir dağılımla moleküler değişikliklerle sonuçlanır. Heterojenliğin kapsamının belirlenmesi, farklı genetik olayları hedef alan monoterapi veya ek kombinasyon tedavilerinin seçimini şekillendirebilir.   l  mc  l tümör hücre klonlarının tanımlanması, ürotelyal karsinomalı hastaların hayatta kalmasını iyileştirmek için gereklidir. Ürotelyal karsinomdan farklı farklı morfolojik özellikler geliştirmiş olan tümör dokularındaki varyant histolojiler, tümör heterojenliğinin en u   örnekleridir. Sonuçta, heterojenlik ilaç direncine ve tedaviden sonra hastalığın nüks etmesine neden olmaktadır (Meeks ve diğerleri, 2020). Çeşitli araştırmacılar büyük ölçekli ifade ve dizileme veri setlerini kullanarak mesane kanserlerini, paylaşılan RNA ifade dağılımları veya spesifik genomik değişimler temelinde alt tiplere ayırmıştır. Hasta-kohort özelliklerinin yoğun analizi, analiz edilen tümör   rne  i sayısındaki artış, biyoinformatik kümeleme yaklaşımları gibi analizlerle transkripsiyonel profillemeye metodlarının daha ileri derecede değerlendirilmesi sonucu olarak ürotelyal tümörlerin yaygın temel özelliklerini içeren bazal ve luminal alt tipleri ortaya koymuştur. Bu sınıflandırma, ilk olarak meme kanserinde tarif edilen moleküler alt tiplere benzerdir. Bu bulgular, mesane kanseri alt tiplerinin değişen derecelerdeki farklılaşma derecelerini yansıtmaktadır. Bazal tümörler, bazal meme tümörlerindeki gibi benzer genleri ifade etmektedir (KRT5, KRT14). Luminal tümörlerdeki gen ifadeleri ise, luminal tipe farklılaşmış meme kanseri hücrelerindeki gen ifade profiline (FOXA1, GATA3, PPAR) uygundur. Histolojik olarak da bazal tümörler skuamöz benzeri özellikler gösterirken, luminal tümörler papiller benzeri morfoloji gösterir. Bazal tümörler çoğunlukla daha agresiftir ve invaziv olma eğilimindedir buna kar  şın birçok luminal tümörler süperfisyal

(yüzeysel) büyüme eğilimindedir. Bununla birlikte bazı luminal ifade örüntüsü kasa invaziv tümörlerde görülebilir. Bu karakterizasyon yöntemi, meme kanserli hastalarda ilaç duyarlılığını tahmin etmede ve tedavi seçimine rehberlik etmede yararlı olmuştur ve mesane kanseri olan hastalarda eşit derecede değerli olabileceği düşünülmektedir (Felsenstein ve Theodorescu, 2018).

Kasa İnvaze Olmayan Mesane Kanseri Alt Tiplerinin Sınıflandırılması

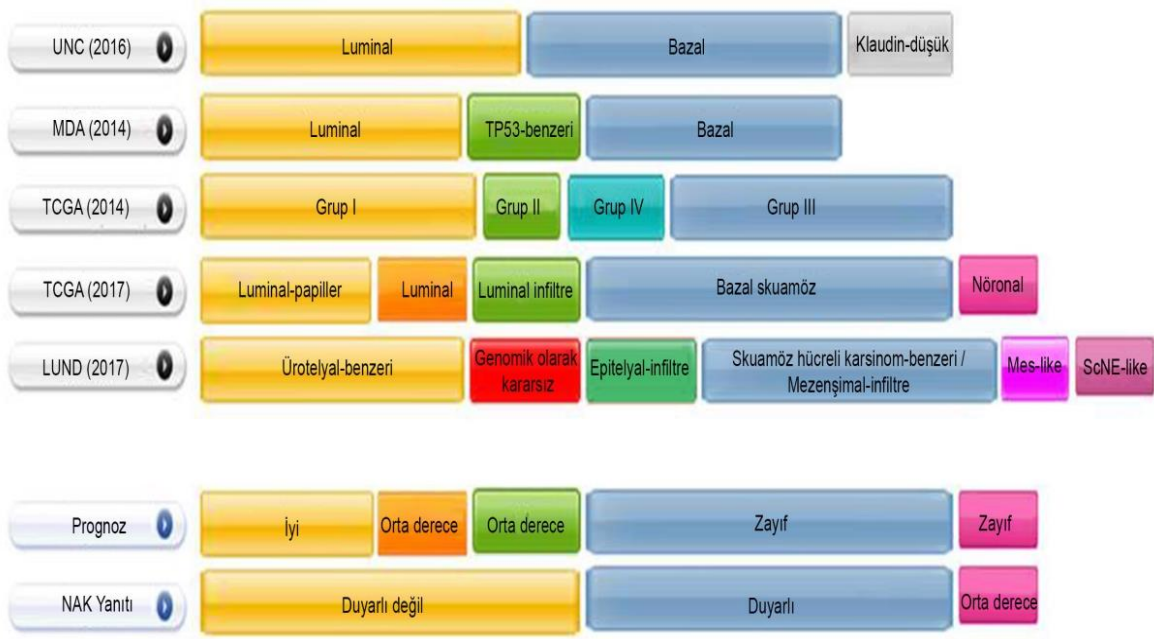
Bugüne kadarki en büyük KİOMK transkriptomik çalışması olan UROMOL çalışması, KiS dahil tüm aşamalardan ve derecelerden 460 KİOMK'u analiz etmiş ve farklı klinik sonuçlar ve farklı moleküler profillere sahip üç alt tip (sınıf 1, sınıf 2 ve sınıf 3) tanımlamıştır (Hedegaard ve diğerleri, 2016). Hurst ve arkadaşları (2017), 140 hasta örneğini analiz ederek, Ta evresinde invaziv olmayan mesane kanserinin iki genomik alt tipini (GS1 ve GS2) tanımlamışlardır. Genomik olarak daha kararsız alt tip (GS2), kromozom 9q sekanslarının kaybı, artan mTORC1 sinyali ve değişmiş metabolik profil ile ayırt edilmiştir. Ayrıca kadınların erkeklere göre daha yüksek KDM6A mutasyon sıklığına sahip olduğunu bulmuşlardır (Hurst ve diğerleri, 2017) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Gen ifade profiline dayalı KİOMK'un moleküler sınıflandırmasının şematik gösterimi (Kang ve diğerleri, 2020)

Kasa İnvaze Olan Mesane Kanseri Alt Tiplerinin Sınıflandırılması

Tarihsel olarak birbirlerinden bağımsız dört temel sınıflama sistemi geliştirilmiştir. Bunlar; LUND üniversitesi (Lund), TCGA, Kuzey Karolayna Üniversitesi (UNC) ve MD Anderson Kanseri Merkezi (MDACC) sınıflandırmalarıdır. En düşükten en yüksek karmaşıklığa doğru, UNC sistemi ikili sınıflama yapmıştır (bazal benzeri ve luminal benzeri) (Damrauer ve diğerleri, 2014). Daha sonra bu sınıflandırma, klauidin-düşük alt tipinin tanımlanmasıyla üç sınıfa genişletilmiştir (Kardos ve diğerleri, 2016). MDACC önce üçlü sınıflama yapmıştır (bazal, luminal ve p53-benzeri) (Choi ve diğerleri, 2014) daha sonra bu sınıflandırmayı 5 sınıfa yükseltmiştir (luminal, luminal-p53, bazal, bazal-p53 ve ikili negatif) (Dadhanian ve diğerleri, 2016). 131 TCGA tümörünün geçici kohortundan elde edilen verilere dayanan bir TCGA çalışmasında, dört grup (I ve II: luminal; III ve IV: bazal) belirlenmiştir (TCGA, 2014). 2017 yılındaki TCGA çalışması; 412 TCGA kohortu kullanılarak mesane tümörlerini beş sınıfa ((Luminal-papiller alt tip (% 35), Luminal infiltrate alt tip (% 19), Luminal (% 6), Bazal-skuamöz alt tip (% 35), nöronal alt tip (% 5)) ayırmıştır (Robertson ve diğerleri, 2017). Lund sınıflandırması ise KİMK'i beş alt sınıfa ayırmıştır (ÜroA, genomik olarak kararsız, infiltrate, skuamöz hücre karsinoma, ve UroB) (Sjödahl ve diğerleri, 2012) ve daha sonra 6 alt tipe genişletmiştir (ürotelyal benzeri, genomik olarak stabil olmayan, epitelyal infiltrate, SCC benzeri/Mes benzeri, SCC benzeri /UroB ve Sc/NE benzeri) (Sjödahl ve diğerleri, 2017) (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Gen ifade profiline dayalı KİMK'in moleküler sınıflandırmasının şematik gösterimi, Mes-like: Mezenşimal-benzeri, ScNE-like: Küçük hücreli/nöroendokrin-benzeri (Kang ve diğerleri, 2020)

Mesane kanseri Moleküler Taksonomi Grubu, 1750 KİMK transkriptomu ve ağ tabanlı analizler kullanarak altı bağımsız gruptan oluşan bir sınıflama sistemi kullanmıştır. Bunlar; LumP alt tipi (% 24), LumNS (eski adıyla "luminal infiltrasyonlu" olarak bilinen) alt tipi (% 8), LumU alt tipi (% 15), stroma bakımından zengin alt tip (% 15), kadınlarda daha sık görülen Baz/Sq alt tipi (% 35), NE benzeri alt tipleridir (% 3). Her alt tipin kendine özgü moleküler özellikleri, ilerleme riski ve spesifik sistemik ilaçlara yanıt verme özelliği vardır (Kamoun ve diğerleri, 2020). Taksonomi gruplarının farklı isimlendirmelerine rağmen, hepsi transkripsiyon faktörlerinin ve hedeflenebilir genlerin benzer kümelerini tanımlamaktadır. Hem KİOMK hem de KİMK dahil olmak üzere 2,411 mesane kanseri vakasından yayınlanmış verilerin yakın tarihli bir meta-analizi, ile altı alt tip belirlenmiştir. Bunlar; lüminal-benzeri, HER2-benzeri, papiller benzeri, nöral benzeri, mezenkimal benzeri ve yassı hücreli karsinom benzeri tümörlerdir. Her bir grup genel sağkalım ve moleküler özellikler açısından farklılıklar göstermektedir. (Tan ve diğerleri, 2019).

2.2.10. Mesane Kanseri Fare Modelleri

Tüm mesane kanseri modelleri arasında kanserin anlaşılmasında ve yeni tedavilerin geliştirilmesinde hayvan modelleri önemli bir yer tutmaktadır. Hayvan modelleri, geleneksel iki boyutlu hücre kültürü veya klinik koşullarda incelenemeyen kanserin biyolojik ve patolojik özelliklerinin canlı organizmada araştırılmasına olanak sağlayarak, hücre bazlı deneyler ile klinik araştırmalar arasında temel bir bağlantı oluşturur. Hücre kültürü genellikle tek tip hücre içermektedir ancak gerçek tümör oluşumunda, stromal, immün hücreler ve diğer hücre tipleri tümör gelişimini desteklemektedir. Hücre kültüründeki; kimyasal bileşenler, biyolojik özellikler ve hücre-hücre etkileşimlerine ilişkin mikroçevre, *in vivo* koşullardan oldukça uzaktır (Ding ve diğerleri, 2014). Hayvan modelleri mesane kanseri çalışmalarında önemlidir ve karsinogenez, progresyon ve metastaz gibi aşamaların incelenmesi için gereklidir. Bu modeller klinikte karşılaşılmamış kanser öncesi evrelerin araştırılmasına olanak sağlar. Hastalık progresyonu için tanısal ve prognostik biyolojik belirteçlerin tanımlanması ve klinik öncesi terapötik hedeflerin belirlenmesi ve doğrulanması, moleküler araştırmaların kliniğe uyarlanması açısından fayda sağlamaktadır (John ve Said, 2017).

Günümüzde mesane kanseri için en çok kullanılan hayvanlar sıçan ve fareleri içeren kemirgenlerdir. Kemirgenlerdeki mesane büyüklüğü insana kıyasla küçük olmasına rağmen mesanelerindeki neoplazmalar morfolojik olarak insana benzedir. Fare genlerinin %80'i insan genleriyle eşleşmektedir. Bu oran sıçanlarda %90'dır. Ayrıca bu hayvanların gelişimleri hızlı, üretilmeleri kolay ve ucuzdur (Ding ve diğerleri, 2014).

C57BL/6, BALB/c ve ICR gibi fare suşları ve Wistar, Sprague-Dawley ve Fisher gibi sıçan suşları, mesane kanseri araştırmaları için en yaygın kullanılan modellerdir. Mesane kanserinin hayvan modelleri otokton (spontan, kendiliğinden oluşan) ve otokton olmayan (transplante edilebilir, aktarılabılır) olarak kategorize edilebilir. İlk grup kimyasal olarak indüklenmiş modeller ya da genetik olarak tasarlanmış modelleri içermektedir. Transplante edilebilir modeller ayrıca singeneik (immünokompetan veya transgenik farelere implante edilmiş fare mesane kanseri hücreleri) ve ksenograftlar (immün yetmezliği olan farelere

implante edilen insan mesane kanseri hücreleri) olarak sınıflandırılabilir (John ve Said, 2017).

Bu modeller, ortotopik (mesane içinde tümör büyümesinin meydana geldiği) ve heterotopik (mesane dışında tümör büyümesinin meydana geldiği) olmak üzere enjeksiyon bölgesine göre de ayrılabilir. Köpekler, tavşanlar, kobaylar ve hamsterlar gibi daha büyük hayvanların tümü geçmişte mesane kanseri modelleri olarak kullanılmıştır. Ancak, mali ve etik kısıtlamalar nedeniyle kullanımları sınırlıdır (John ve Said, 2017).

Otokton (Kendiliğinden Olan) Modeller

Kanserojenle İndüklenen Modeller

Mesane kanserine; tütün, aromatik aminler ve klorlu hidrokarbonlar gibi kimyasal kanserojenlere sürekli maruz kalma neden olmaktadır. Bu nedenle, kimyasal karsinogenez ile mesanenin ürotelyal karsinomunun gelişimi arasındaki ilişkiyi incelemek önemlidir. Ürotelyal karsinom, çeşitli kimyasal kanserojenlerin kullanımıyla ağırlıklı olarak kemirgenlerde indüklenebilir. Ürotelyal karsinom, çeşitli kimyasal kanserojenlerin kullanımıyla ağırlıklı olarak kemirgenlerde oluşturulmuştur. Başlıca kimyasal ürotelyal kanserojen maddeleri; N-Butil-N- (4-hidroksibutil) nitrozamin (BBN), N- [4- (5-nitro-2-furil) -2-tiazolil] formamid (FANFT) ve N-metil -N-nitrosourea (MNU)'dır. Bu kanserojen ajanların çoğu aromatik amin bileşenlerine sahiptir. Kanserojen modeller, uzun süreli insan maruziyetini özetleyen uzun bir süre boyunca gelişir (John ve Said, 2017).

Genetik Olarak Tasarlanmış Modeller

Transgenik fare ve/veya genetiği değiştirilmiş fare (GEM) modelleri, klonlanmış onkogenleri taşıyan ve/veya tümör baskılayıcı genlerden yoksun olan insan hastalıkları ile ilişkili genetik anormalliklerin *in vivo* araştırılmasında kullanılırlar (John ve Said, 2017). Hem morfolojik hem de gen ifade profili açısından insan mesane kanserini taklit edebilen modifiye edilmiş fareler mevcuttur. Spesifik kanserlerin incelenmesi için transgenik farelerin geliştirilmesindeki en zorlu

problemlerden biri, hedef dokuda transgen ifadesinin gerçekleştirilmesi için hücreleri koşullu olarak düzenleyen dokuya özgü promotörlere ihtiyaç duyulmasıdır. İfadeleri ürotelyal hücreler ile sınırlı olan üroplakinlerin (UP) ve Cre/loxP sistemlerinin kullanımı, dokuya özgü mesane kanseri oluşturmak için kullanılan stratejiler arasındadır (Ringuette-Goulet ve diğerleri, 2018). Bununla birlikte, GEM modellerinin belirli sınırlamaları vardır. Mekanizmadan kaynaklı kusurların bir sonucu olarak, hayvanların sadece bir kısmı istenen genotipik özellikleri sergiler ve bazen özelliğin gerektiği gibi olup olmadığı kesin olarak bilinemez (Ding ve diğerleri, 2014).

Otokton olmayan (Transplante Edilebilir, Aktarılabılır) Modeller

Ksenograft modelleri, insan ürotelyal kanser hücre hatlarının veya birincil kanser doku parçalarının immün yetmezliği olan farelere nakledilmesiyle oluşturulur. Timusu olmayan nude fareler olgun T lenfositleri üretemez ve bağışıklık yanıtı oluşturamaz, aksi takdirde, immünokompetan farelerde oluşan güçlü ret yanıtı, farelerin ölümüne veya aktarılan kanser hücrelerinin ölümüne yol açar. Hücre hatlarının, özellikle ksenograft modellerde oluşturulan modellerin, kaynak tümörlerin özelliklerini koruduğu gösterilmiştir. İmplantasyondan sonraki bir ila iki hafta içinde, ürotelyal neoplazm, tedavi değerlendirmesi için yeterli bir boyuta ulaşmaktadır. Bu modeller; kanserojenle indüklenen veya transgenik fare modellerine kıyasla zaman ve maliyet açısından avantaj sağlamaktadır (Ding ve diğerleri, 2014). immün yetmezliği nedeniyle nude fareler, konakçı bağışıklık sistemi ile tümör arasındaki etkileşimleri araştırmak için uygun değildir, bu nedenle Bacillus Calmette Guerin (BCG) ile ilişkili deneyler için bu tür modeller kullanılmaz. Aksine, implantasyona uygun singeneik hayvan modelleri BCG ilişkili çalışmalar için daha uygundur (Ding ve diğerleri, 2014).

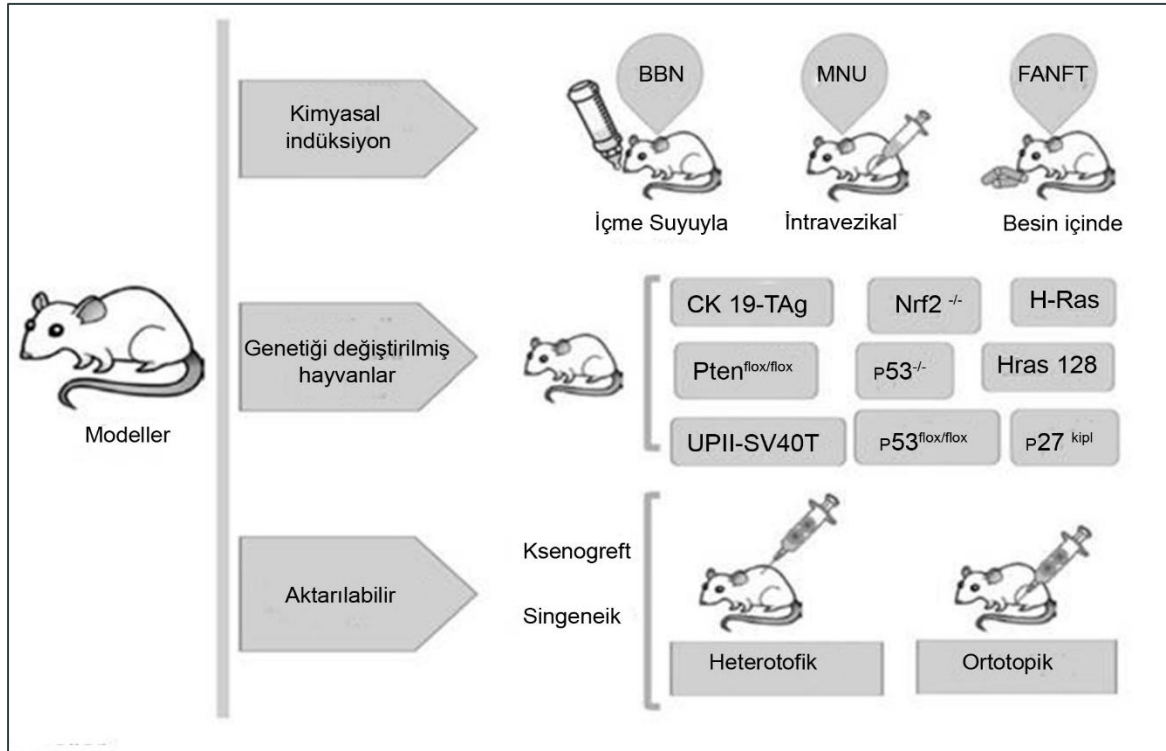
Ksenogenik modellere göre singeneik modeller, mesane kanseri oluşturulmuş kemirgenden alınan kanser hücrelerinin, genetik olarak özdeş immün yeterli kemirgenlere enjeksiyonuyla oluşturulur. Singeneik modellerde en çok kullanılan mesane kanseri hücre hatları; AY-27, MBT-2 ve MB49'dur. MB49, C57BL/6 fare soyuna, 7,12 dimetilbenzantrazen uygulanması ile elde edilir (John ve Said, 2017).

Ortotopik Modeller

Ortotopik modeller, organa özgü bir mikro-ortamda tümör davranışının değerlendirilmesine izin verir. Bu modeller, ürotelyal kanser hücrelerinin alıcı konakçıların mesane lümenine enjekte edilmesiyle oluşturulabilir. Tümör hücrelerinin yapışmasını kolaylaştırmak için mesane yüzeyini kaplayan doğal koruyucu epitel hasar görmelidir. Bu hasar; mekanik olarak, elektriksel koterizasyon ve epitel aşınmasının yanı sıra HCl, N-metil-N-nitrosüre, gümüş nitrat ile kimyasal soyma gibi yöntemlerle oluşturulur (John ve Said, 2017). Aşılana hücreler, tümörlerin kolay *in vivo* görüntülenmesine ve metastaz takibine imkan veren floresan veya lüminesan raportör genleri içerecek şekilde manipüle edilebilir (Ringuette-Goulet ve diğerleri, 2018). Subkutan modellerle karşılaştırıldığında ortotopik tümörler, tümör mikroçevresi doğal duruma daha yakın olduğu için insan mesane kanseri davranışını daha yakından taklit eder. Bu nedenle, ortotopik model tarafından üretilen deneysel sonuçların daha yüksek bir alaka düzeyine sahip olması beklenmektedir (Ding ve diğerleri, 2014).

Heterotopik Modeller

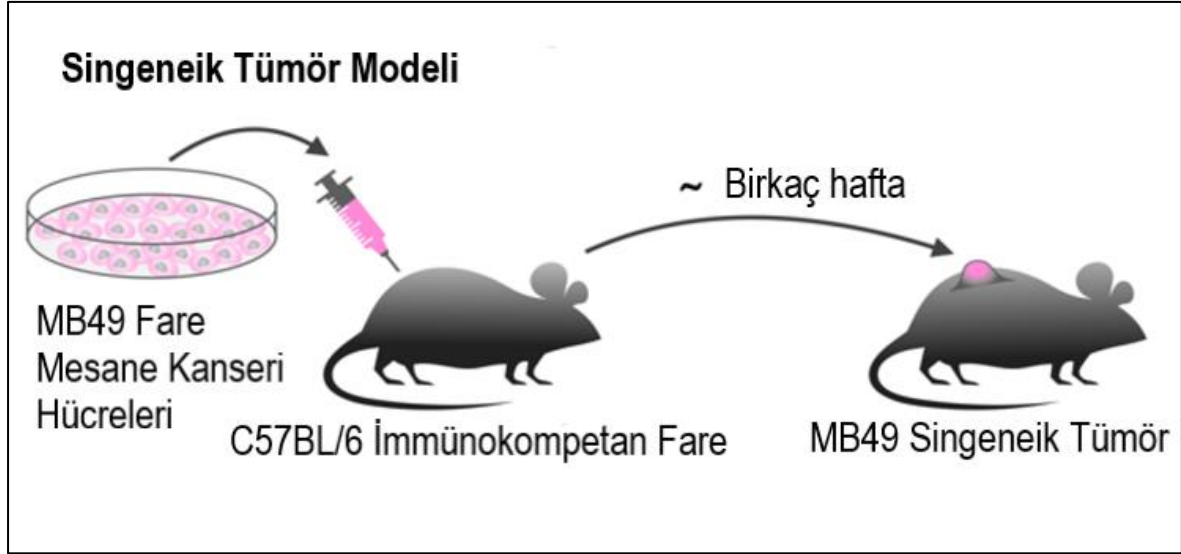
Heterotopik, greftin orijinal bölgeye nakledilmediğini, ancak genellikle hayvanın yan veya arka ayağında deri altından nakledildiğini gösterir. Bu modelde tümör, kolayca ve invaziv olmayan bir şekilde tespit edilebilir (Ding ve diğerleri, 2014). Deri altı heterotopik modeller, kullanım kolaylığı ve tümöre kolay erişilebilirlik nedeniyle araştırma grupları tarafından yaygın olarak benimsenmiştir. Gerçekte, tümör büyümesi, derinin palpasyonu yoluyla invaziv olmayan bir şekilde izlenebilir ve bir kumpas yardımıyla tümör boyutları ölçülebilmektedir. Subkutan tümör modelleri, deneysel anti-kanser ilaçlarına *in vivo* cevabı belirlemek için sıklıkla kullanılmaktadır (Ringuette-Goulet ve diğerleri, 2018) (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Kemirgenlerde mesane kanseri gelişimini tetiklemek için kullanılan hayvan modelleri (Arantes-Rodrigues ve diğerleri, 2013)

2.2.11. MB49 Syngeneik Mesane Kanseri Fare Modeli

MB49 mesane karsinomu hücre hattı, orijinal olarak kanserojenle indüklenmiş C57BL/6 faresindeki mesane tümöründen izole edilmiştir. MB49 tümörleri, lamina propria'nın ötesine yayılan, infiltratif ürotelyal karsinomun büyümesini taklit etmektedir (Mossberg ve diğerleri, 2010). Fare ürotelyal karsinom hücre hattı olan MB49, mesane kanseri biyolojisini ve terapötik stratejileri incelemek için en yaygın olarak kullanılan *in vitro* ve *in vivo* modellerden biridir (Fabris ve diğerleri, 2012) (Şekil 2.14). MB49 hücre hattından türetilen fare mesane tümör modelinin histopatolojisi ve immünohistokimyasal analizine göre, bu mesane kanser modeli infiltratif ürotelyal karsinomaya benzerlik göstermektedir ve mesane kanserini davranışı ve tedavi rejimlerinin cevabını araştırmaya izin vermektedir (Chade ve diğerleri, 2008). MB49 hücreleri, PD-L1 ifade etmekte ve klinik vakaların yaklaşık % 4'ünde bulunan Kras mutasyonu taşımaktadır. Transgenik veya BBN-verilerek oluşturulan hayvan modelleri ile kıyaslandığında, MB49'un daha mezenşimal karakterde olduğu gösterilmiştir (Ruan ve diğerleri, 2019).



Şekil 2.14. Singenik tümör modelinin oluşturulmasının şematik gösterimi (Chulpanova ve diğerleri, 2020)

2.3. Hücre Ölüm Yolakları

2.3.1. Apoptoz

Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz, hücrenin doğal bir mekanizmasıdır. Özellikle uzun yaşayan memelilerde homeostazın yanı sıra gelişimde de kritik bir role sahiptir. Gereksiz veya istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlayan, yüksek derecede düzenlenmiş bir süreçtir (Pfeffer ve Singh, 2018).

DNA hasarı veya kontrolsüz hücre çoğalması gibi apoptotik yolağı aktive edecek çok çeşitli koşullar vardır. Apoptotik sinyal kaskadı, sırasıyla plazma-membran reseptörlerine bağlanan çözünür moleküllerin veya çeşitli mitokondriyal uyarıcılar tarafından tetiklenen iki ana yolağa bölünmüştür. Bu yollar sırasıyla içsel (mitokondriyal) yolak ve dışsal (ölüm reseptörü) yollar olarak adlandırılmaktadır. Hücre içi sinyaller; DNA hasarı, büyüme faktörü eksikliği ve sitokin yokluğu gibi faktörleri içerirken, en yaygın hücre dışı sinyali hasarlı veya enfekte olmuş hücrelere cevaben immün sistem sitotoksik T hücreleri tarafından üretilen hücre ölümünü uyaran sinyallerdir. Bu yollar efektör kaspazlarda birleşirler. Apoptoz aktive edildikten sonra, hücrede değişimler başlamaktadır. Bu değişimler; hücre iskeleti ve çekirdek proteinleri gibi hücre bileşenlerini parçalayacak olan kaspazların aktivasyonunu içermektedir. Kaspaz aktivasyonu sonucu apoptotik

hücreler küçülmeye başlar ve makrofaj cevabını uyaracak membran değişiklikleri meydana gelir. Hücredeki yüzlerce farklı proteinin kaspaz aktivitesi ile yıkımı, apoptozun başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için zorunludur. Son olarak efektör kaspazların hedef proteinleri kesmesiyle hücre ölümü gerçekleşir (Pfeffer ve Singh, 2018).

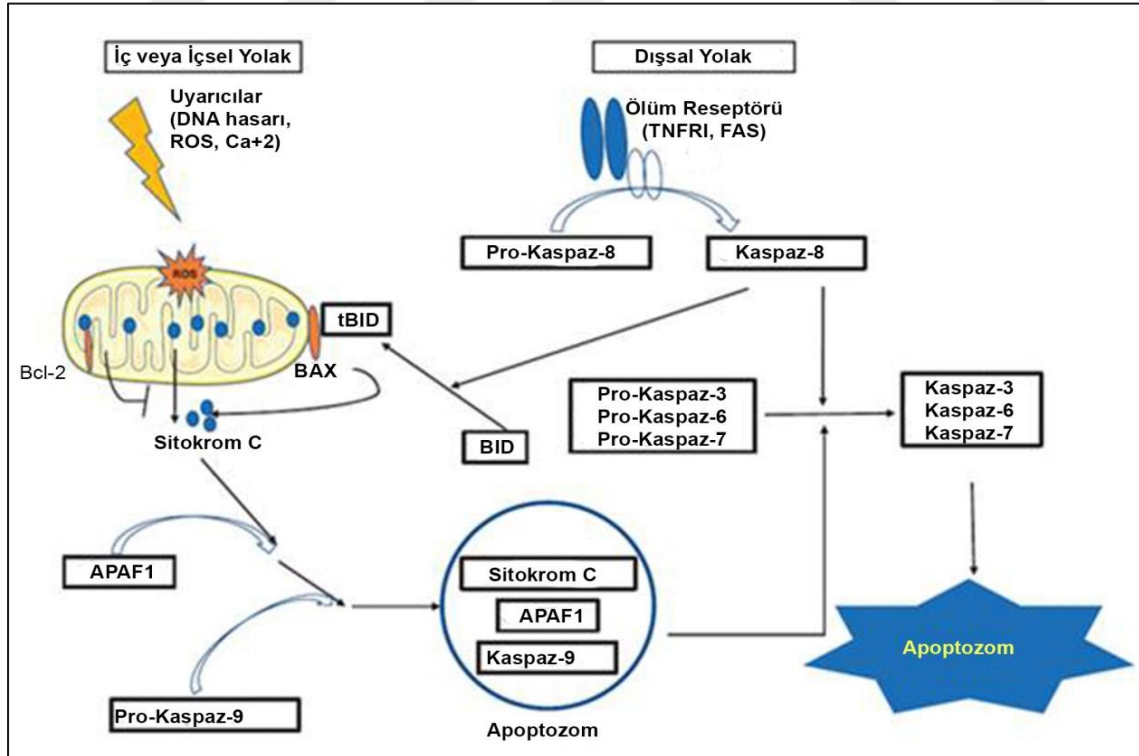
Bcl-2 ailesi, apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan genlerden en önemlisidir (Li ve diğerleri, 2018). Tüm Bcl-2 familyası proteinleri, Bcl-2 homoloji (BH) alanları (BH1-BH4) olarak bilinen dört korunmuş α -sarmal motifinden en az birini içerir. Aile üyeleri ayrıca üç gruba ayrılır. Bir grup, apoptozu inhibe eder ve dört BH alanının tamamına (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, Bcl-B ve A1) sahiptir. Pro-apoptotik proteinler apoptozu teşvik etmek için anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine bağlanabilen korunmuş bir BH3 alanına sahiptir. Sahip oldukları BH3 sayısına göre pro-apoptotik proteinler; üç BH alanı (Bax, Bak ve Bok) içeren çok alanlı proteinler ve sadece BH3 proteinleri (Bad, Bid, Bim, Bmf, Bik, Hrk, Noxa ve Puma) olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Jain ve diğerleri, 2013).

İçsel Yolak

Apoptozun içsel yolağı, mitokondri ve mitokondrial proteinleri kullanır. İçsel yolak tümüyle Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından düzenlenir. Çeşitli apoptotik uyarılar sadece BH-3 içeren pro-apoptotik proteinleri aktive etmektedir. Bu proteinler daha sonra BAX ve BAK'ı aktive eder. BAX ve BAK aktive olunca mitokondri dış membranında geçirgenliğini arttıracak şekilde oligomerize olurlar. Bu geçirgenlik, sitokrom c, Smac/Diablo, Omi/HtrA2 proteinlerinin sitoplazmaya salınımına yol açar. Sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasıyla; sitokrom c; Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör), dATP ve pro-kaspaz 9'dan oluşan apoptozom kompleksi oluşur. Apoptozom içinde pro-kaspaz 9, efektör kaspaz 3 ve 7'yi aktive edecek aktif kaspaz 9'a dönüştürülür. Efektör kaspazlar hızlıca hücre proteinleri yıkarak hücre ölümüne sebep olurlar. İçsel yolakta hücre ölümüne neden ilave bazı basamaklar mevcuttur. Omi, kaspaz inhibitörü olan X-bağılı apoptoz proteini inhibitörünü (XIAP) inhibe eder. Apoptoz sırasında mitokondriden salınan SMAC, apoptoz protein inhibitörünü (IAP) inhibe ederek apoptoz başladıktan sonra sürecin ilerlemesini sağlar (Pfeffer ve Singh, 2018).

Dışsal Yolak

Dışsal yolak, apoptozu uyarmak için hücre dışı sinyalleri kullanır. Hücre ölüm sinyalleri ayrıca ölüm ligandları olarak da bilinir. Bu ligandlar tümör nekroz faktör (TNF) ailesi ölüm reseptörlerine bağlanır. Fas ligandı (Fas-L), TNF-ilişkili apoptoz uyarıcı ligand (TRAIL) ve tümör nekroz faktörü (TNF) gibi ölüm ligandları mevcuttur. Fas-ilişkili ölüm bölgesi (FADD) ve TNF ilişkili ölüm bölgesi (TRADD) gibi adaptör proteinler ölüm reseptörüne toplanırlar. Başlatıcı pro-kaspaz 8 ve 10 adaptör proteine bağlanır ölüm uyarıcı sinyal kompleksini (DISC) oluşturur. Pro-kaspazlar ölüm efektör bölgesine (DED) sahiptir ve bu bölgeleriyle adaptör proteine bağlanırlar. Pro-kaspaz 8 ve 10, DISC kompleksi tarafından aktive olur. Efektör kaspazlar 3,6 ve 7 daha sonra aktive olarak hücresel proteinleri ve hücre iskeletini yıkarlar. DISC kompleksi, c-FLIP inhibitörü tarafından düzenlenir. Ayrıca aktif kaspaz 8, sadece BH-3 bölgesi içeren pro-apoptotik BID proteinini keserek aktiflaşmasını (tBID) sağlar. tBID, BAX ve BAK'ı aktive ederek hücre içi apoptotik yolağı aktif etmiş olur (Pfeffer ve Singh, 2018) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Apoptoz Yolakları (Mishra ve diğerleri, 2019)

Bax Proteinini

BAX, 21 kDa ağırlığında, BAX geni tarafından kodlanan ve Bcl-2'ye büyük ölçüde homolog olan bir pro-apoptotik proteindir. BAX, Bcl-2 protein ailesinin ilk tanımlanan pro-apoptotik üyesidir. Bu protein Bcl-2 ile bir heterodimer oluşturur ve bir apoptotik aktivatör olarak işlev görür. BAX ile Bcl-2 arasındaki ilişki ve oran, apoptotik bir uyarıyı takiben bir hücrenin hayatta kalmasını veya ölümünü belirlemektedir. Sağlıklı memeli hücrelerinde, BAX'in çoğu sitozolde bulunur, ancak apoptotik sinyalin başlaması üzerine Bax, konformasyonel bir değişim geçirir. Apoptozun indüksiyonu üzerine BAX, özellikle mitokondriyal membran ile ilişkili hale gelir. Bax; mitokondriyal voltaja bağımlı anyon kanalı (VDAC) ile etkileşime girerek, membran potansiyelinin kaybına ve sitokrom c salınımına yol açar. Mitokondriyal apoptoz sinyal iletim yolundaki en önemli olay, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasıdır. Sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımı sonrasında kaspazların aktivasyonuna neden olur (Bax, National Center for Biotechnology Information,2020).

Bcl-2 Proteinini

İnsanlarda Bcl-2 geni tarafından kodlanan Bcl-2, hücre ölümünün önemli düzenleyicilerindendir. Bcl-2, B hücreli lenfomada, kromozomal kırılma noktasında (14; 18) (q32; q21) tanımlanmıştır ve anti-apoptotik işlevler taşıdığı keşfedilen ilk proto-onkojendir. Şimdiye kadar, 20'den fazla Bcl-2 ailesi proteini tespit edilmiştir ve Bcl-2, bu ailenin en çok incelenen üyesi olmuştur (Jain ve diğerleri, 2013). Önceki yıllarda, Bcl-2 ifadesinin insan malign tümör tiplerinde en dikkat çekici özellik olduğu ve yaygın olarak anti-apoptotik faktör olarak kabul edildiği ortaya çıkmıştır. Bcl-2'nin ürünü, mitokondriyal ve çekirdek membranlarda ve endoplazmik retikulumda lokalize olan 26 kDa'lık bir proteindir (Li ve diğerleri, 2018). Beklin-1'in belki de en önemli negatif düzenleyicisi Bcl-2'dir. Başlangıçta bir anti-apoptotik gen olarak klonlanan Bcl-2'nin otofajideki rolü Beklin-1'in, Bcl-2 etkileşim gösteren bir protein olarak tanımlanmasına kadar gerçekleşmemiştir. Bcl-2, Beklin-1'e bağlanarak Beklin-1 aracılı otofajiyi inhibe eder. Bu nedenle, Bcl-2 ailesi, hem otofaji hem de apoptoz yollarının merkezi bir düzenleyicisidir (Kung ve diğerleri, 2011).

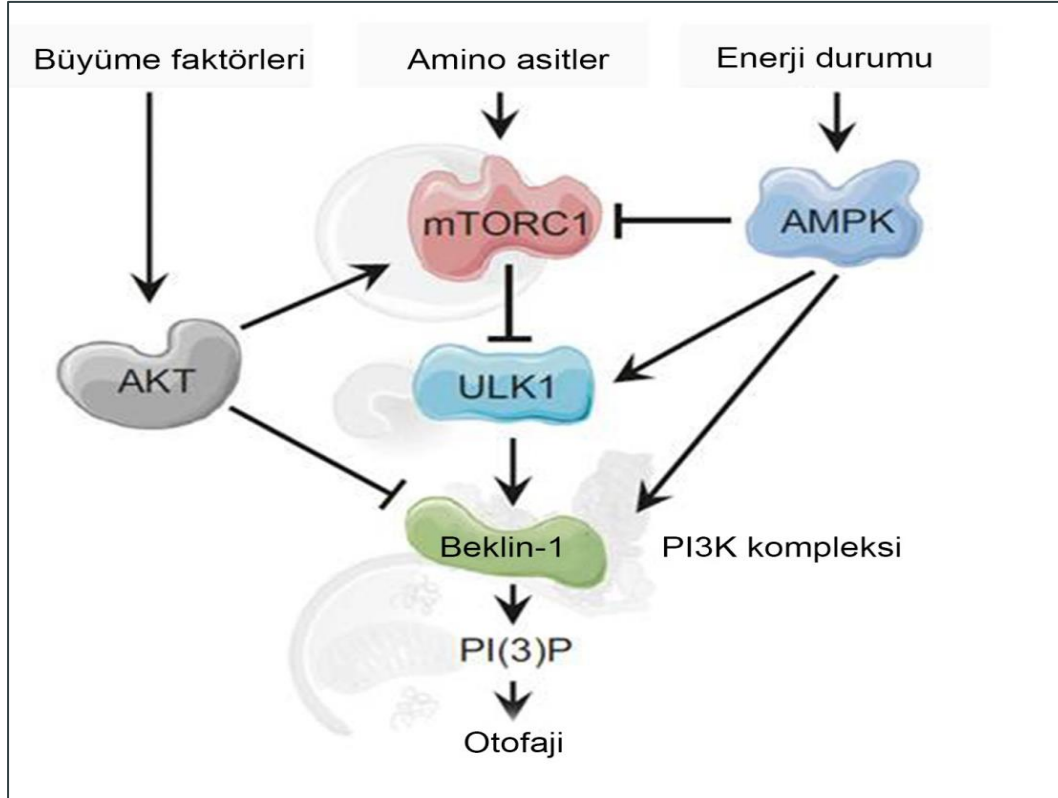
Kaspaz 3 Proteini

Kaspazlar, sisteinil aspartat proteinazlardır (Kumar, 2007). Kaspazlar, kaspaz aktif bölgesindeki katalitik sistein rezidülerine bağlı bir reaksiyonla peptit bağlarını hidrolize eder ve substratlarında yalnızca belirli aspartik asit rezidülerinden sonra kesim yapan endo-proteazlardır. Aynı zamanda programlanmış hücre ölümünde önemli roller oynayan bir proteaz enzim ailesidir. Kaspazlar, pro-kaspazlar olarak adlandırılan zimojenler olarak inaktif bir formda sentezlenirler. Hücre ölümü sürecinin kontrollü yürütülmesine izin veren form, bu aktif olmayan formdur. İnaktif formdaki kaspazlar aktif enzimi oluşturmak için korunmuş aspartik kalıntılarından proteolitik işleminden geçerler. Kaspazların sıralı aktivasyonu, apoptozunun uygulama aşamasında merkezi bir rol oynar. Kaspazlar etki mekanizmalarına göre, başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8 ve kaspaz-9) ve yürütücü (uygulayıcı, efektör) kaspazlar (kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7) olarak sınıflandırılır (Huang ve diğerleri, 2017). Kaspaz-3 proteini, sistein aspartik asit proteaz ailesinin bir üyesidir. Apoptotik yolağın temel efektör kaspazı olan kaspaz-3, hücrelerde aktif olmayan (pro-kaspaz-3) bir 32 kDa'lık pro-enzim olarak bulunur (Huang ve diğerleri, 2017). Apoptoz sırasında pro-kaspaz-3, kendi kendine protealiz ile veya kaspaz-6, kaspaz-8 ve granzim B gibi kaspazlar tarafından kesim yoluyla işlenir. Kaspaz-3, apoptotik hücrede hem dışsal hem de içsel yolaklarla aktive edilir. Çekirdek enzimi, poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) gibi birçok anahtar proteinin proteolitik kesiminden kısmen veya tamamen sorumlu olduğu için kritik bir apoptoz uygulayıcısıdır ve apoptotik indeks uygulamalarında yararlıdır (Huang ve diğerleri, 2017).

2.3.2. Otofaji

Otofaji, sitoplazmik makromoleküllerin lizozomal enzimlerle yıkımını içeren, oldukça korunmuş çok aşamalı katabolik bir süreci ifade etmektedir. Otofaji, hücrelerin strese adaptasyonu için kritik bir mekanizmadır ve besin yokluğu, hipoksi, hormon uyarımı ve DNA hasarı dahil olmak üzere çok sayıda uyarıcı tarafından tetiklenmektedir (Kung ve diğerleri, 2011). Bu süreçte, yanlış katlanmış proteinler ve zarar görmüş organeller, otofagozom adı verilen kapalı çift membranlı veziküller ile sitoplazmadan ayrılır ve sindirim için lizozomlara aktarılır (Li ve

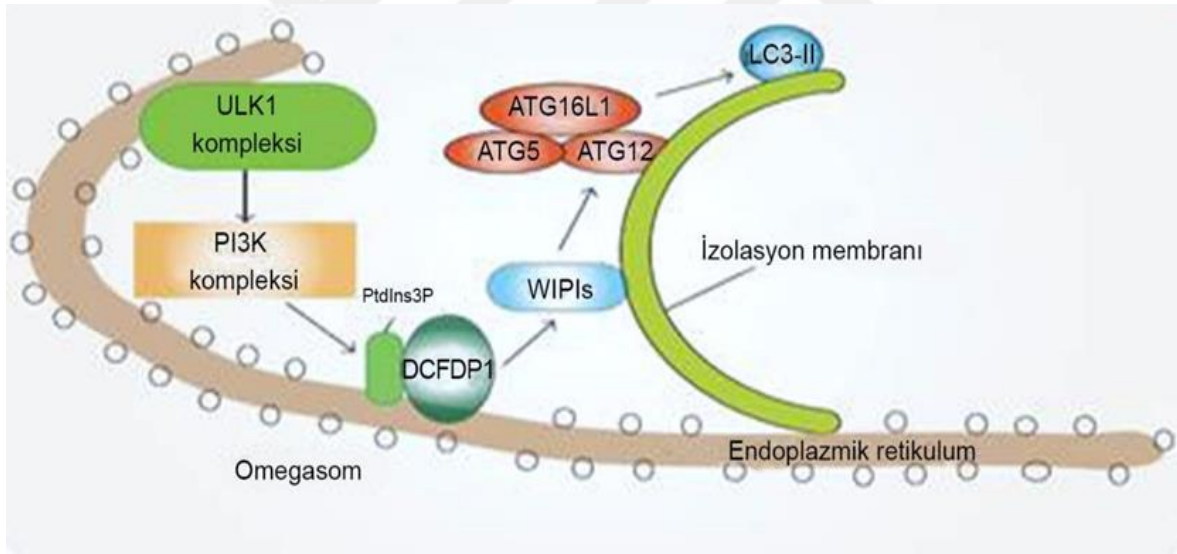
diğerleri, 2020). Otofaji terimi ilk kez 1974'te lizozomların keşfi ile Nobel Tıp Ödülü'nü kazanan Prof. Christian De Duve tarafından kullanılmıştır. 2016 yılında ise, otofaji sürecindeki tüm genleri tanımlayan Prof. Yoshinori Ohsumi, fizyoloji veya tıp alanında Nobel Ödülü'ne layık görülmüştür (Frentzel ve diğerleri, 2017). Otofaji, çoklu sinyal yolları tarafından kontrol edilen; indüksiyon, çekirdeklenme, uzama, olgunlaşma, füzyon, yıkım ve geri-dönüşüm sıralı basamaklarından oluşur. Otofaji ilişkili proteinler (ATG), bu adımların düzenlenmesinde önemli rol oynar (Li ve diğerleri, 2020). Otofaji aktivasyonu, çeşitli hücre içi ve dışı değişim sinyallerini algılayan dört kinaz tarafından düzenlenir. Bunlar; Rapamisin kompleksi 1'in mekanik hedefi (mTORC1), Unc-51 benzeri otofajiyi aktive eden kinaz 1 (ULK1), AMP ile aktive olan protein kinaz (AMPK) ve P rotein kinaz B (AKT) (Hill ve diğerleri, 2019). mTORC1, amino asitler ve büyüme faktörleri mevcut olduğunda otofaji inhibe edici bir etkiye sahiptir. mTORC1, ULK1'i fosforile ederek otofajiyi baskılar (Singh ve diğerleri, 2018). AMPK, hücre sel enerjiye aracılık eden ve onu koruyan önemli bir protein kinazdır. AMPK, enerjideki düşüşleri tespit eder ve ardından otofajiyi etkinleştirir. Büyüme faktörleri varlığında, AKT kinaz aşağı yönde hedefi olan mTORC1'i etkinleştirerek otofajiyi baskılar. AKT, PI3K kompleks proteinlerinin doğrudan fosforilasyonu ile otofajiyi de uyarabilir (Hill ve diğerleri, 2019). AMPK, raptor proteininin doğrudan fosforilasyonu veya tüberoz skleroz kompleksi 2'nin (TSC2) dolaylı fosforilasyonu ile mTOR aktivitesini baskılar. AMPK ayrıca ULK1 fosforilasyonu ile otofajiyi doğrudan etkinleştirebilir (Sui ve diğerleri, 2013) (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Otofajinin çoklu sinyal yolları tarafından düzenlenmesi ve son iletimin Beklin-1 içeren PI3K kompleksinde birleşmesi (Hill ve diğerleri, 2019)

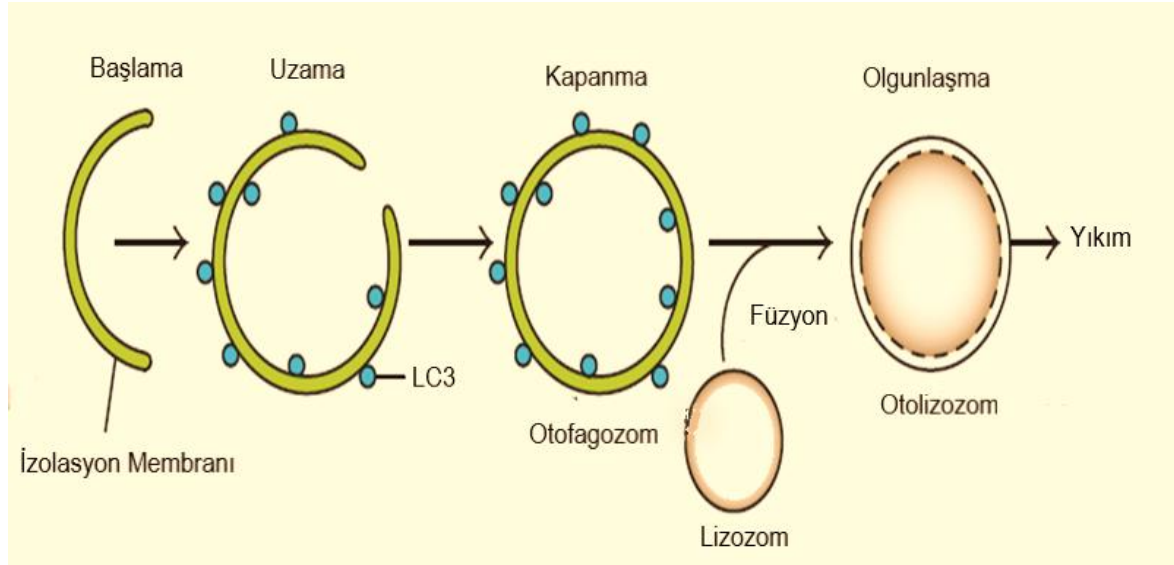
Otofaji başlangıcı, dört alt birimden oluşan ULK1 başlatma kompleksi tarafından düzenlenir (ULK1, FIP200, ATG13 ve ATG101) (Zhang ve diğerleri, 2018). Besin varlığında mTORC1, ULK1 kompleksini fosforile ederek otofajiyi baskılar. Besin yokluğunda mTORC1 inaktive olur ve mTORC1'in inhibe edici fosforilasyon etkisi fosfatazlar tarafından bozulur. Fosfatazlar, ULK1'i defosforile ederek ULK1'in mTORC1 kompleksinden ayrılmasını sağlar (Dossou ve Basu, 2019). mTORC1 kompleksinden ayrılan ULK1 aktive olur ve sınıf III fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3KC3) kompleks I aracılığıyla omegozom membranına yönlendirilmesini sağlar. PI3KC3 kompleksi; Vps34, Beklin-1 (Atg6), p150 (Vps15) ve ATG14L çekirdek alt birimlerini içerir (Kung ve diğerleri, 2011; Deng ve diğerleri, 2019). Bu bölgede, PI3KC3 kompleksinin katalitik alt birimi Vps34, fosfatidilinositolün (PI) fosforilasyonu ile fosfatidilinositol 3-fosfat (PI3P) üretir. PI3P ve PI3P bağlayıcı çinko parmak FYVE alanı içeren protein 1 (DFCP1 veya ZFYVE1) ile zenginleştirilmiş bu bölgeler omegasomlar olarak adlandırılır ve otofagozomun başlangıç bölgesi olarak kabul edilir. WD tekrar alanlı fosfoinositit etkileşimli proteinler (WIPI'ler) ayrıca omegasomda bulunan PIP3'e bağlanır ve omegasom

membranlarından çift membranlı fagor oluşumunu düzenler. Omegasom membranında PIP3 oluşumu, fagofor oluşumu için bu bölgeye diğer ATG proteinlerinin toplanması için önemlidir (Deng ve diğerleri, 2019). Zar çekirdeklenmesi sonrası izolasyon membranı; organelleri ve proteinleri seçici veya seçici olmayan bir şekilde yutarak genişler ve büyür. İzolasyon membran genişlemesinin ayırt edici özelliklerinden biri, LC3 proteinlerinin membrana bağlanmasıdır (Frentzel ve diğerleri, 2017). LC3 proteinleri, C-terminal glisin rezidüsü yoluyla PE'nin fosfolipid içeren baş grubuna kovalent olarak bağlanan ubikitin benzeri proteinlerdir (Martens ve diğerleri, 2016). İzolasyon membranının uzaması ve otofagozom veziküllerinin oluşumu, iki ubikitinasyon benzeri sistem LC3 ve ATG12–ATG5 konjugasyon sistemleri tarafından düzenlenir. Her iki konjugasyon sisteminin amacı, fagofor membranın uzamasını sağlamak için lipid edilmiş LC3 II'yi oluşturmaktır (Mizushima, 2020) (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Otofajik sürecin başlangıç aşamaları (Vural ve Kehrl, 2014)

Otofagozom olgunlaşmasından sonra otofagozom, lizozom ile birleşeceği çekirdek çevresine taşınır. Mikrotübüller ve motor proteinler, otofagozomların bu taşınımında rol alır. Otofagozom ve lizozomların birleşmesi sonrası lizozomal hidrolazlar, hücresel bileşenlerini yıkar ve yıkım ürünleri serbest amino asitler ve makromoleküller olarak yeniden kullanım için sitozole geri taşınır (Kung ve diğerleri, 2011)(Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Otofajik sürecin genel şeması (Vural ve Kehrl, 2014)

Beklin-1 Proteinini

BECN1 geni, otofajik yolun iyi bilinen bir düzenleyicisi olan Beklin-1 proteinini kodlar. Bu gen, mayadaki ATG6 geninin bir memeli ortologudur ve ilk tanımlanan memeli otofaji genlerinden biridir. Beklin-1, hücredeki bir dizi proteinle etkileşime girer ve bu da otofajik yolağın ya aktivasyona veya inhibisyona yol açabilmektedir. Otofajiyi, düzenleyici rolünün yanı sıra Beklin-1'in hücre içinde apoptoz ve embriyogenez gibi önemli biyolojik süreçleri de etkilediği gösterilmiştir. Beklin-1'in ayrıca kanser, nörolojik bozukluklar (örn., Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı) ve viral enfeksiyonlar dahil çeşitli hastalık durumlarının patolojisinde kritik bir rol oynadığı belirtilmiştir (Sahni ve diğerleri, 2014). Beklin-1, otofaji ve apoptoz arasındaki iletişimde önemli bir rol oynar. Beklin-1'in anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-XL ile bağlandığı bilinmektedir, bu da Beklin-1 aracılı otofajik aktivasyonunu inhibisyonuna yol açmaktadır (Sahni ve diğerleri, 2014).

LC3B Proteinini

Mikrotübül ile ilişkili protein 1A/1B hafif zincir 3 (LC3), işlendikten sonra otofagozom membranları ile ilişkili olan maya Atg8'in bir memeli ortologudur (Huang ve diğerleri, 2020). Mayada yalnızca bir Atg8 proteini varken, insan ATG8 proteinleri LC3 (LC3A, LC3B, LC3B2 ve LC3C) ve GABARAP (GABARAP,

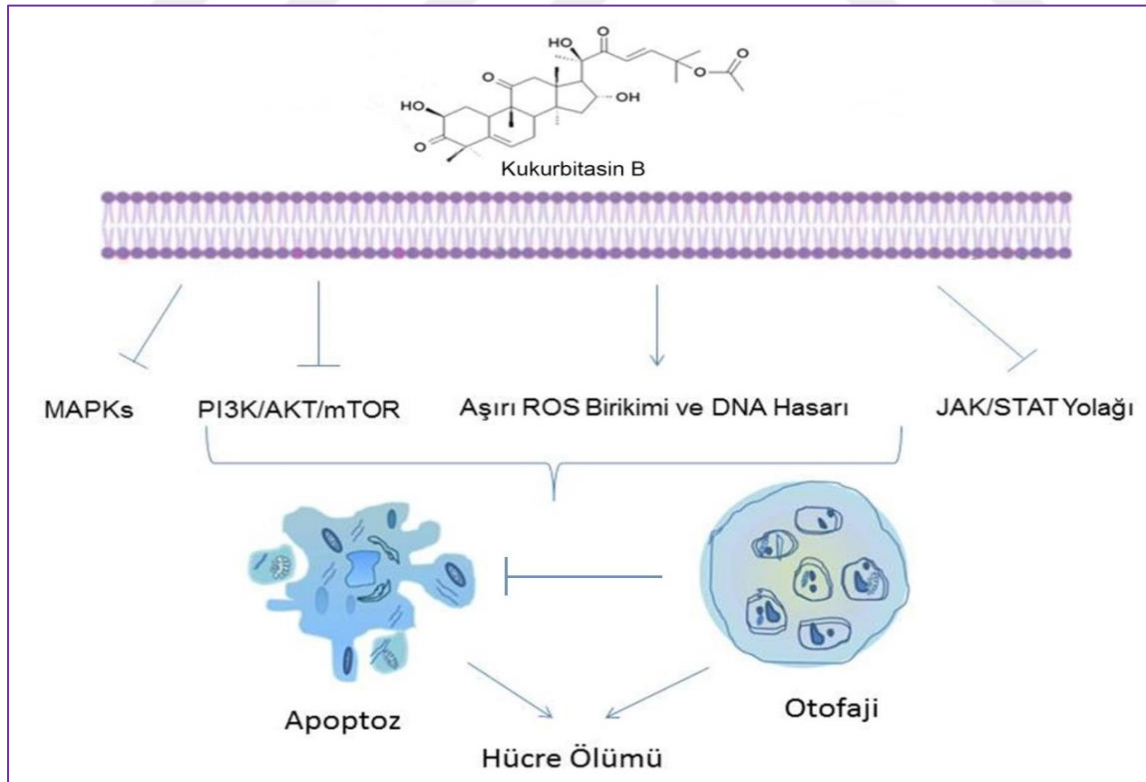
GABARAPL1, GABARAPL2 (aynı zamanda GATE-16 olarak da adlandırılır)) alt ailelerinde gruplanmış yedi gen tarafından kodlanır (Lystad ve Simonsen, 2019). LC3 lipidasyonu, bu proteinlerin otofagozom oluşumunda, otofagozomların lizozomlarla füzyonunda ve kargo seçiminde yer aldığı otofajinin ayırt edici bir özelliğidir. ATG8 proteinleri, membran lipidlerinin amino ana grubuna bağlanır. Lipidasyon olarak da adlandırılan bu konjugasyonun ana hedefi PE'dir.

ATG8 proteinleri otofajik yolağın izlenmesi ve incelenmesi için bir belirteç olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Martens ve Fracchiolla, 2020). LC3; LC3I ve LC3II olmak üzere iki izoformdan oluşur, LC3I sitoplazmada dağılmış halde bulunurken, lipid eklenmiş LC3 (LC3II) yeni oluşan otofagozom membranlarında birikmeye başlar ve otofajiyi izlemek için bir belirteç olarak kullanılır (Ávalos ve diğerleri, 2014; Huang ve diğerleri, 2020). Halihazırda, otofajik aktivitenin ölçüldüğü çeşitli yöntemler mevcuttur. Bunlar arasında LC3 immün-blotlama en yaygın kullanılanıdır. LC3'ün memelilerde birkaç homologu olmasına rağmen, LC3B yaygın olarak otofaji deneyleri için kullanılır. Endojen LC3, SDS - PAGE ve immün-blotlamayı takip eden iki bant olarak tespit edilir: biri sitosolik olan LC3I ve diğeri PE ile konjuge olan ve izolasyon membranlarında ile otofagozomlarda yer alan LC3II'yi temsil eder. Öncü LC3I sentezden hemen sonra Atg4 tarafından LC3I'e işlendiği için normal koşullar altında saptanmaz. LC3II'nin moleküler ağırlığı PE'nin eklenmesinden dolayı LC3I'den daha büyük olmasına rağmen, LC3II, SDS - PAGE'de muhtemelen aşırı hidrofobikliğinden dolayı LC3-I'den daha hızlı göç eder. Bu nedenle, LC3I'den LC3II'ye dönüşüm, LC3'ün işlenmesini değil, PE-konjugasyonunu temsil eder. LC3I, jelde genellikle 16 kD civarında tespit edilirken; LCII yaklaşık 14 kD olarak tespit edilir. LC3II miktarı, otofagozom oluşumunun iyi bir göstergesi olan otofagozomların sayısı ile yakından ilişkilidir (Mizushima, 2007).

2.4. Kukurbitasin B

Kukurbitasinler, kabakgiller ailesine ait geleneksel Çin tıbbi bitkilerinde bulunan tetrasiklik triterpenoidlerdir. Tüm kukurbitasinler yüksek oranda oksijenli, temel bir 19-(10→9β)-abeo--10α-lanost-5--ene halka iskeleti içermektedir. Başlıca bilinen 40 kabakgiller türü vardır ve bunların türevleri; A, B, C, D, E, I, H, Q, R,

dihidrokurbitasin B olmak üzere 12 gruba ayrılmıştır. Bu türler arasında, KuB kansere karşı en aktif bileşendir ve çeşitli kanser modellerinde umut vaat etmektedir (Garg ve diğerleri, 2018). KuB ($C_{32}H_{46}O_8$, moleküler ağırlığı 558.712 g/mol), kabakgiller bitkilerinde ve Brassicaceae gibi diğer bitki familyalarında bulunan, kendine özgü acı tadı ve sitotoksik özellikleri olan bir steroid olarak sınıflandırılır. Daha önce çeşitli hastalıklara, özellikle iltihaplanma ve aljeziye, karbon klorür kaynaklı hepatotoksisite, kolestaza, lösemik bozukluklara, immün aracılı ve anjiyojenik bozukluklara karşı etkili olduğu bildirilmiştir (Garg ve diğerleri, 2018). KuB'nin, tümör büyümesine karşı çeşitli biyolojik aktiviteler gösterdiği çok sayıda çalışmada gösterilmiştir. KuB'nin; meme, prostat, akciğer, uterin serviks, karaciğer, deri ve beyin kanserleri dahil olmak üzere çok sayıda insan kanser hücre hattı ve tümör ksenograftlarının büyümesini engellediği rapor edilmiştir (Liu ve diğerleri, 2010). Aynı zamanda, KuB'nin çeşitli insan kanser hücre hatlarında kemoterapi ilaçlarının anti-proliferatif etkilerini güçlendirdiğini gösterilmiştir (Iwanski ve diğerleri 2010; T. Liu ve diğerleri 2010; X. Liu ve diğerleri 2017; P. Liu ve diğerleri, 2019) (şekil 2.19).



Şekil 2.19. KuB'nin kimyasal yapısı ve ilişkili olduğu sinyal yolaklarının grafiksel özeti (Wakimoto ve diğerleri, 2008)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan cihazlar

- Biyogüvenlik kabini (DanLaf, Danimarka)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Derin dondurucu, -30°C (Sanyo, Japonya)
- Derin dondurucu, -86°C (Sanyo, Japonya)
- Hassas terazi (AND-ER-182A)
- Mikroplaka ELISA okuyucu (SpectraMax M3 (Molecular Devices, ABD))
- Invert mikroskop (Zeiss,Almanya)
- Cedex hücre sayım cihazı (Innovatis, Almanya)
- Kuru ısıtıcı blok (Biosan,Letonya)
- Ph metre (WTW 422, Almanya)
- Elektroforez güç kaynağı (Thermo Scientific, ABD)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Mikro 22 R, Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (TMA 2071, Almanya)
- Spin vorteks (Biosan, Letonya)
- Western Blot aparatları (Biorad,ABD)
- Vorteks (Biosan)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Mikropipetler; 10µl, 100µl, 1000µl (Axygen,ABD)
- Karbondioksitli etüv (Sanyo, Japonya)

3.1.2. Kullanılan sarf malzemeleri

- Hücre kültürü flaskaları, 25cm² ve 75 cm² (SPL)
- 15ml santrifüj tüpü (SPL)
- 50ml santrifüj tüpü (SPL)
- Hücre kültürü için 96 kuyucuklu plaka (SPL)

- Hücre dondurma tüpleri (SPL)
- Steril pipet uçları (AXYGEN)

3.1.3. Kullanılan kimyasallar

- RPMI 1640 besiyeri (Biological Industries, ABD)
- Fetal Siğır Serumı (FCS) (Biological Industries, ABD)
- Penisilin/Streptomisin (Biological Industries, ABD)
- Tripsin-EDTA (Biological Industries, ABD)
- Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Thermo, ABD)
- Fenilmetilsülfonilflorid (PMSF) (Sigma, Almanya)
- RIPA Lizis Buffer (Sigma, Almanya)
- Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS) (Biological Industries, ABD)
- Amonyum Persülfat (Amresco, ABD)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Thermo Fisher Scientific, Almanya)
- Tetrametilendiamin (TEMED) (Amresco, ABD)
- Tris base(Sigma, Almanya)
- Yağsız süt tozu (CST)
- ColorPlus Protein Standardı (NEB)
- BSA Blocking Buffer (Thermo, ABD)
- ECL Western Blotting Substrate (Thermo, ABD)
- NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) (Thermo, ABD)
- PhosSTOP™ 10 tablet (Roche, Almanya)
- PVDF Transfer membranı (SCBT)
- Tween 20 (Thermo Fisher Scientific, Almanya)
- Akrilamid/bis-Akrilamid (29:1 solusyonu) 500 ml (NZYTECH)
- Kukurbitasin B (Cayman, ABD)
- Sisplatin (Cayman, ABD)
- Glisin (Merck, Almanya)
- Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) (Ambresco, ABD)
- Metanol (Thermo Fisher Scientific, Almanya)
- Protein Marker (New England Biolabs, Almanya)

3.1.4. Kullanılan kitler

- Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche, Almanya)
- Pierce™ BCA Protein Assay Kit
- Human/Mouse AKT Pathway Phosphorylation Array C1 (Raybiotech, ABD)

3.1.5. Kullanılan Antikorlar

- Bax (Bioassay Technology Laboratory, Çin)
- Bcl-2 (Bioassay Technology Laboratory, Çin)
- Cleaved Caspase 3 (Asp 175) ((Bioassay Technology Laboratory, Çin)
- Beclin-1 (Bioassay Technology Laboratory, Çin)
- LC3B (LC3I, LC3II) (Cell Signaling Technology, ABD)

3.1.6. Kullanılan Besiyeri, Tampon ve Çözeltilerin Hazırlanışı

33 mM Stok Sisplatin Çözeltisinin Hazırlanması

50 mg sisplatin 5 ml DMSO'da çözüldü. Elde edilen stok çözelti, 1 ml'lik tüplere dağıtılarak -20 °C'de saklandı.

18 mM Stok Kukurbitasin B Çözeltisinin Hazırlanması

10 mg KuB, 1 ml dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde çözüldü. Elde edilen stok çözelti 1 ml'lik tüplere dağıtılarak -20 °C'de saklandı.

%10'luk RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanışı

2 mM L-glutamin içeren 450 ml'lik besiyerine sırasıyla önceden ısı ile inaktive edilmiş 50 ml fetal sığır serumu (FBS) ve 5 ml 100 µg/ml'lik antibiyotik karışımı eklendi.

%1'lik RPMI 1640 Besiyerinin Hazırlanışı

2 mM L-glutamin içeren 495 ml'lik besiyerine sırasıyla önceden ısı ile inaktive edilmiş 5 ml fetal sığır serumu (FBS) ve 5 ml 100 µg/ml'lik antibiyotik karışımı eklendi.

RIPA Lizis Tamponunun Hazırlanışı

Distile su kullanarak 10X RIPA lizis tamponu seyreltilerek 1X'lik çalışma solüsyonu hazırlandı.

PMSF Solüsyonu

0,03484 g PMSF tartıldı ve 10 ml izopropanol içerisinde çözdürüldü.

1,5 M Tris Buffer (pH:8,8) (150 ml)

27,23 g Tris base 80 ml suda çözdürüldü. Sodyum hidroksit (NaOH) ve hidroklorik asit (HCl) kullanılarak ile çözelti pH'ı 8,8'e ayarlandı. Daha sonra distile su ile son hacim 150 ml'e tamamlanarak +4°C'de saklandı.

0,5 M Tris Buffer (pH:6,8) (100 ml)

6 g Tris base 60 ml suda çözdürüldü. Sodyum hidroksit (NaOH) ve hidroklorik asit (HCl) kullanılarak pH değeri 6,8'e ayarlandı. Daha sonra distile su ile son hacim 100 ml'e tamamlanarak +4°C'de saklandı.

10X Yürütme Tamponu (Running buffer) (pH:8,3) (1000 ml)

30,3 g Tris base, 144 g glisin ve 10 ml %10'luk SDS 500 ml distile su içerisinde çözdürüldü. Daha sonra distile su ile son hacim 1000 ml'e tamamlanarak +4°C'de muhafaza edildi.

10x Tris Glisin Stok Solüsyonu

30,3 g tris base ve 144 g glisin 1000 ml distile suda çözdürüldü. pH, HCl ile 8,5'e ayarlandı.

Transfer Tamponu

100 ml 10X Tris glisin stoğuna 200 ml metanol eklendi ve son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Sodyum hidroksit (NaOH) ve hidroklorik asit (HCl) kullanılarak ile çözelti pH'ı 8,3'e ayarlandı.

Amonyum persülfat (APS) solüsyonu (100 ml, %10)

100 mg APS, 1 ml distile suda çözdürüldü. Her çalışma öncesi APS taze olarak hazırlandı.

10X TBS solüsyonu

12,1 g Tris base ve 40 g NaCl 500 ml suda çözdürüldü. Sodyum hidroksit (NaOH) ve hidroklorik asit (HCl) kullanılarak ile çözelti pH'ı 7,4'e ayarlandı.

Primer antikorların hazırlanışı

10X konsantrasyondaki TBS 1X'e dilüe edildi. Ardından 10 ml alındı. Daha sonra %5 lik 0,5 g BSA ve %0,05'lik 5 µl sodyum azid çözeltisi ile karıştırıldı. Bu solüsyon ile primer antikor 1:1000 oranında dilüe edildi.

Sekonder antikorların hazırlanışı

1X TBS, %0,1 tween20 ve yağsız süt tozu ile en az 1:5000 oranında hazırlandı.

Membran bloklama solüsyonu

10 ml 1X TBS içerisinde %1 Tween20, ve %5 lik 0,5 g BSA ile taze hazırlandı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Hattı

Deneylerimizde 7,12 dimetilbenzantrasen ile indüklenen C57BL/6 fare mesanesinin transisyonel (değişici) hücre karsinomundan türetilen MB49 hücre hattı kullanılmıştır. En çok kullanılan murin mesane karsinoma hücre hatlarından biri olan MB49, C57BL/6 birincil mesane epitel hücre eksplantlarının 24 saat boyunca 7,12-dimetilbenz [a] antrasene (DMBA) maruz bırakılması ve ardından uzun süreli kültür ile üretilmiştir. İnsan mesane kanseri ile hücre yüzey belirteçleri, apoptoza duyarlılık ve immünolojik profil gibi birçok önemli tümör özelliğini paylaşır. Karyotip analizi yapılan MB49 hücrelerinin ağırlıklı olarak diploid hücrelerden oluştuğu gösterilmiştir. Kromozom 6'nın trizomisi ve kromozom 19 kazanımı tüm MB49 hücrelerinde görülmüştür. Kromozom 5 ve 9 arasındaki dengeli translokasyonlar, kromozom 19'un bir izokromozomu, kromozom 6 ve 19'un trizomileri diploid MB49 hücrelerinde en sık görülmüş anomalilerdir. MB49 hücre hattı bir erkek fareden gelmesine rağmen, tüm MB49 hücrelerin Y kromozomunun kaybı gözlenmiştir (Fabris ve diğerleri, 2012).

MB49 fare mesane kanseri hücre hattı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Onkoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr.Güneş Esendağlı'dan temin edilmiştir.

3.2.2. Hücre Kültürü

MB49 hücreleri; %10 inaktive edilmiş FBS, 200 mM L-glutamin, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ile desteklenmiş RPMI1640 besiyeri ile %5 CO₂ içeren nemli inkübatörde 37°C de kültüre edildi.

3.2.3. Hücrelerin Çözülmesi, Pasajlanması ve Dondurulması

-80 °C'de saklanan MB49 hücreleri, uygulamalar öncesi oda sıcaklığında hızlı bir şekilde çözündürüldü. Çözünme sonrası hücreleri içeren dondurma medyumunu (90% FBS, 10% DMSO) 15 ml'lik konik tüpe aktarıldı. DMSO'nun hücreler üzerindeki

toksik etkisini ortadan kaldırmak için önce 9 ml besiyeri dondurma medyumunun üstüne damlatarak ilave edildi. Sonra tüp 1800 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin pellet şeklinde dibe çökmesi sağlandı. Süpernatant döküldükten sonra hücre pelleti 10 ml ılık besiyeri ile tekrar çözündürülerek 75'lik flaskaya transfer edildi ve flaskalar inkübatöre yerleştirildi. Hücrelerin flask zeminine tutunlaması takip edilerek 2-3 gün de bir, hücrelerin besiyerleri değiştirildi. Tripsin-EDTA hücrelerin flask zemininden ayrılması ve pasajlanması için kullanılmıştır. Etüvden çıkartılan flaskalar 1X PBS ile yıkandıktan sonra flaskalara 3-5 ml tripsin-EDTA ilave edilip 5 dakika inkübatörde bekletildi. Bekleme süresi sonrası hücrelerin zeminden ayrıldığı mikroskop altında teyit edildikten sonra tripsin aktivitesinin sona erdirilmesi için flaskalara 5-6 ml besiyeri eklendi. Ayrılmış hücreler 15 mL'lik konik tüpe aktarıldı. Sonra tüp 1800 rpm de 5 dakika santrifüj edilerek hücrelerin dibe çökmesi sağlanır. Dibe çöken hücreler besiyeri ilavesi ile süspanse hale getirilerek ve hücre yoğunluğuna göre değişik olaralarda flaskalara ekildi. MB49 hücreleri, flaskın yaklaşık % 70'ini kaplandığında ortamda yüzen küçük kümeler halinde ayrılma eğilimindedir. Bu yüzden pasajlama öncesi bu oranının aşılmasına dikkat edilmiştir. Dondurulacak hücreler cryo tüpe aktarılarak dondurma medyumunu içerisinde homojen bir şekilde karışması sağlandı ve - 80°C'ye kaldırıldı.

3.2.4. Ajan Uygulamaları ve Hücre Canlılığının Belirlenmesi

WST-1 kiti, sitotoksik ajanların uygulanması sonucu hücre canlılığı ve ilaç duyarlılığının 96 kuyucuklu hücre kapları kullanılarak spektrofotometrik ölçümünün yapıldığı kolorimetrik bir kittir. Bu yöntem, bir tetrazolyum tuzu olan WST'nin canlı hücrelerde formazan oluşturmak için mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından bölünmesine dayanan bir analizdir. Canlı, metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı, WST-1'in eklenmesinin ardından üretilen formazan ürününün miktarı ile ilişkilidir. Hücrelerdeki formazan seviyesinin tespiti ile hücre sayısı belirlenebilir. Metabolik olarak aktif hücreler tarafından üretilen formazan boyasının absorbanı uygun dalga boylarında spektrofotometre ile ölçülür. Hücreler; 96'lık kuyucuk içeren petri kabındaki her bir kuyucuğa yaklaşık 5000 hücre olacak şekilde 100 µL %1 FBS içeren besiyeri ile ekildi. 37°C %5'lik CO₂ inkübatörde 24 saatlik inkübasyon süresi sonrası besiyerleri uzaklaştırılarak hücrelere sırasıyla sisplatin (0,1-50µM) ve kukurbitasin B'nin (0,01-50µM) değişik konsantrasyonları ile bu ajanların kombine

dozları uygulandı. Bu dozlar, ara stok Kukurbitasin B ve sisplatin çözeltilerinden %10 FBS içeren RPMI-1640 ile seyreltilerek hazırlandı. İlaç uygulamaları sonrası hücreler 24 ve 48 saat süresince karbondioksitli etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süreleri sonrası ilaçlı besiyerleri çekildi ve herbir kuyucuğa 100 µl fenol red içermeyen RPMI 1640 besiyeri ve 10 µl WST-1 reaktifi eklendi. 2 saatlik inkübasyon sonrasında her bir kuyucuktaki absorbans değeri 440 nm dalga boyunda mikropılaka ELISA okuyucusunda ölçüldü ve elde edilen ortalama absorbans değeri, madde uygulaması yapılmayan kontrole oranlanarak ilaçların hücre canlılığına etkileri excel programı ile belirlendi. Her bir doz için 4 tekrar yapılarak ortalama absorbans değeri hesaplanmıştır. Kontrol grubu olarak ilaçların çözücüsü olan DMSO kullanılmıştır.

3.2.5. Dokulardan Protein İzolasyonu

Kukurbitasin B ve sisplatinin tekli ve kombine dozları uygulanmış hayvanlardan derin anestezi altında intrakardiyak kan alınarak ötenazi uygulandı ve bu hayvanların tümör dokuları kesilip çıkartıldıktan sonra aşağıda belirtilen basamaklar sırası ile izlenerek protein izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

1. Dokular birkaç kez PBS ile yıkandı ve buz üstünde küçük parçalara ayrılarak ağırlıkları ölçüldü.
2. Yaklaşık 5 mg tümör dokusu için herbir mikrosantrifüj tüpüne 1 mM PMSF içeren 500 µl soğuk 1X RIPA lizis tamponu eklendi.
3. Dokular, parçalar kalmayıncaya kadar buz üstünde homojenizatör yardımıyla yüksek hızda homojenize edildi.
4. Homojenizasyon sonrası mikrosantrifüj tüpleri 30 dakika buz üstünde bekletildi.
5. İnkübasyon sonrası tüpler vortekslendi ve +4°C'de 15000 rpm de 20 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüj sonrası süpernatant alındı ve alikotlandıktan sonra proteinler -80°C'ye kaldırıldı.

3.2.6. Protein Miktar Tayini

İlaç uygulamaları sonrası; MB49 hücre hattı ile oluşturulmuş singeneik mesane tümörlü farelerden elde edilen proteinlerin miktar tayini, BCA protein ölçüm kiti kullanılarak aşağıda belirtilen basamaklara göre gerçekleştirildi.

1. Kit içerisinde gelen 2mg/mL derişiminde stok sığır serum albümin (BSA) standardı ile; 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125; 0,025 ve 0 µg/ml konsantasyonlarda saf su kullanılarak standart tüpler hazırlandı.
2. Standartlar ve protein örnekleri; 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 25 µl olacak şekilde konuldu.
3. Reaktif A: B oranı 50:1 olacak şekilde hazırlanmış çalışma solüsyonu, her bir kuyucuğa 200 µl olacak şekilde eklendi.
4. Plakanın üzeri örtülerek 37°C'lik inkübatörde 30 dakika bekletildi.
5. İnkübasyon sonrası, mikrolaka ELISA okuyucuda 562 nm dalga boyunda plaka okutuldu ve çıkan sonuca göre excel programında standart eğri çizilerek hesaplamalar yapıldı.

3.2.7. Western Blot Yöntemi

Kukurbitasin B ve sisplatinin tekli ve kombine doz uygulamaları sonucu; Bcl-2, Bax, kaspaz 3, bölünmüş kaspase 3, Beckin-1, LC3I, LC3II proteinlerinin ifadelerindeki değişim, Western Blot yöntemiyle belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak beta-aktin (ACTB) proteini kullanılmıştır.

Jel dökülmesinde kullanılacak camlar alkol ile iyice temizlendikten sonra art arda konularak jel kasetine yerleştirildi. Akrilamid/bisakrilamid, Tris bazı, SDS, dH₂O, TEMED ve APS belirli oranlarda karıştırılarak alt jel (ayırıcı jel) karışımı (%10'luk) (Çizelge 2.9) camlar arasından döküldü. Alt jelin döküldükten sonra düzgün bir şekilde polimerleşmesi ve hava kabarcıkları oluşmaması için hava ile temasını kesecek şekilde bütanol eklendi. Alt jelin polimerleşmesinden sonra bütanol dökülerek alt jelin üstüne üst jel (yığınlama jeli) karışımı (%5 lik) (Çizelge 2.10) döküldü. Jel karışımı dökülür dökülmez taraklar jele yerleştirildi ve polimerleşmesi beklendi. Polimerleşme sonrası taraklar çıkartıldı. Protein miktarları belirlenmiş

olan örneklerden her bir kuyucukta 40 µg olacak şekilde protein karışımları belirlendi. Daha sonra protein karışımları; 4x konsantrasyonunda numune tamponu ve distile su ile karıştırılarak toplam hacim 10 µl olacak şekilde yükleme çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler, protein denatürasyonu için 95°C'de ısıtıcı blokta bekletildi ve inkübasyon sonrası örnekler kuyucuklara yüklendi. Yükleme sonrası proteinler 1x yürütme tamponunda 150 V, 250 mA de 90 dk boyunca yürütülerek proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrımı sağlandı. Yükleme boyası jelin tabanına gelince güç kaynağı kapatılarak yürütme durduruldu. Jel kaseti elektroforez tankından çıkartıldı ve iki camın birbirinden ayrımı sağlanarak jel alındı. Protein bantlarının bulunmadığı jelin üst kısmı bistüri yardımıyla kesildi. PVDF membran jel ile aynı boyutta kesilerek yaklaşık 30 saniye metanolde bekletildikten sonra transfer tamponuna kondu. Transfer için; kurutma kağıdı sünger pedleri 1x transfer tamponu içinde ıslatıldı. Transfer kasedinin içine sırayla sünger pedi, 2 adet kurutma kağıdı, jel, PVDF membran, 2 adet kurutma kağıdı ve sünger pedi üst üste gelecek şekilde yerleştirildi. Transfer kaseti tank içerisine yerleştirildi ve transfer tamponu da eklendikten sonra 100 V ve 250 mA'de 2 saat boyunca transfer gerçekleştirildi. Transfer sonrası spesifik olmayan antikörlerin bağlanmasını engellemek için membranlar 1 saat çalkalayıcı üzerinde bekletilerek bloklama işlemi gerçekleştirilir. Bloklama sonrası, membranlar TBST ile 3 defa yıkandıktan sonra hedef proteinlere özgü primer antikörlerle (1:1000 oranında seyreltilmiş) gece boyu +4°C de çalkalayıcı üzerinde inkübe edildi. Gece boyu inkübasyon sonrası membranlar TBST ile 3 defa yıkandıktan sonra sekonder antikörlerle (1:5000 oranında seyreltilmiş) 2 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrası proteinler tekrar TBST ile 3 defa yıkandı ve ECL substrat varlığında Gel Logic 2200 Pro görüntüleme sistemi ile membranların görüntülenmesi yapıldı. Sinyal yoğunluğunun sayısal değerleri image J programı kullanılarak ölçüldü.

Çizelge 3.1. %10'luk SDS-PAGE için ayırma jelinin bileşenleri

%10'luk Ayırma Jeli	Hacim (mL)
dH ₂ O	4 mL
%30'luk Akrilamid / Bisakrilamid karışımı	3,3 mL
1,5 M Tris Bazı (pH 8.8)	2,5 mL
%10 SDS	0,1 mL
%10 APS	0,1 mL
TEMED	0,015 mL

Çizelge 3.2. %5'lik SDS-PAGE için yığınlama jelinin bileşenleri

%5'lik Ayırma Jeli	Hacim (mL)
dH ₂ O	3,4 mL
%30'luk Akrilamid / Bisakrilamid karışımı	0,83 mL
1,5 M Tris Bazı (pH 6.8)	0,63 mL
%10 SDS	0,05 mL
%10 APS	0,05 mL
TEMED	0,005 mL

3.2.8. AKT Yolağı Proteinlerinin, Fosforilasyon Değişim Miktarlarının Belirlenmesi

Apoptoz ve otofaji yollarıyla ilişkili proteinlerinin fosforile formları fare AKT yolağı fosforilasyon dizileri (Mouse AKT Pathway Phosphorylation Array C1) kiti ile belirlendi. Bu kitte, yakalayıcı antikorlar membrana yerleştirilmiştir ve her bir antikor çifti membran üzerinde nokta ile analiz edilmektedir. Membran üzerindeki örnekler Western Blot yönteminde olduğu gibi kemilüminesan ışığa ile belirlenmektedir. Deney aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilmiştir.

1. Kit içerisinde çıkan antikor dizilerini içeren 4 membran, yine kit içerisinde çıkan 4 kuyucuklu tepsiye yerleştirilmiştir. Membranlar tedavi gruplarına göre isimlendirilmiştir.
2. Her bir kuyucuktaki membran üzerine, kit içerisinde çıkan bloklama tamponundan 2'şer ml ilave edildi ve 30 dakika oda sıcaklığında beklendi.
3. İnkübasyon süresi sonrası bloklama tamponu pipet yardımıyla çekildi.
4. Protein örnekleri 5 kez seyreltikten sonra her bir membran için 3000 µg olacak şekilde protein karışımı hazırlandı.
5. 1 ml protein karışımı her bir membrana ilave edildi ve gece boyu +4°C de inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonrası protein karışımı membranlardan çekildi ve membranlar yıkama tamponu ile 5'er dakika 3 kez yıkandı.
7. Membranların üzerine kit içerisinde çıkan Detection Antibody Cocktail Incubation solüsyonundan 1'er ml döküldü ve oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyon sonrası her bir membrandan solüsyonlar çekildi ve membranlar yıkama tamponuyla yıkandı.

9. Yıkama sonrası, membranlar 2 ml HRP-konjuge-anti-rabbit karışımında 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
10. İnkübasyon sonrası membranlar yıkandı ve membranların işaretli tarafları yukarı bakacak şekilde kit içerisinde çıkan plastik bir tabakaya aktarıldı.
11. Kit içerisinde çıkan görüntüleme solüsyonları; Detection Buffer C ve Detection Buffer D'den 250'şer µl hacimlerde alınarak eşit hacimlerde karıştırılarak her bir membran üzerine 500 µl olacak şekilde döküldü.
12. Yaklaşık 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra Gel Logic 2200 Pro görüntüleme sisteminde proteinlerdeki ifade değişimleri gözlemlendi.
13. Membran üzerindeki örnekler Western Blot yönteminde olduğu gibi görüntüleme solüsyonu varlığında kemilüminesan ışımaya ile belirlenmiştir. Miktar ölçümü için Image J programı kullanıldı.

3.2.9. Mesane Kanseri Fare Modelinin Oluşturulması

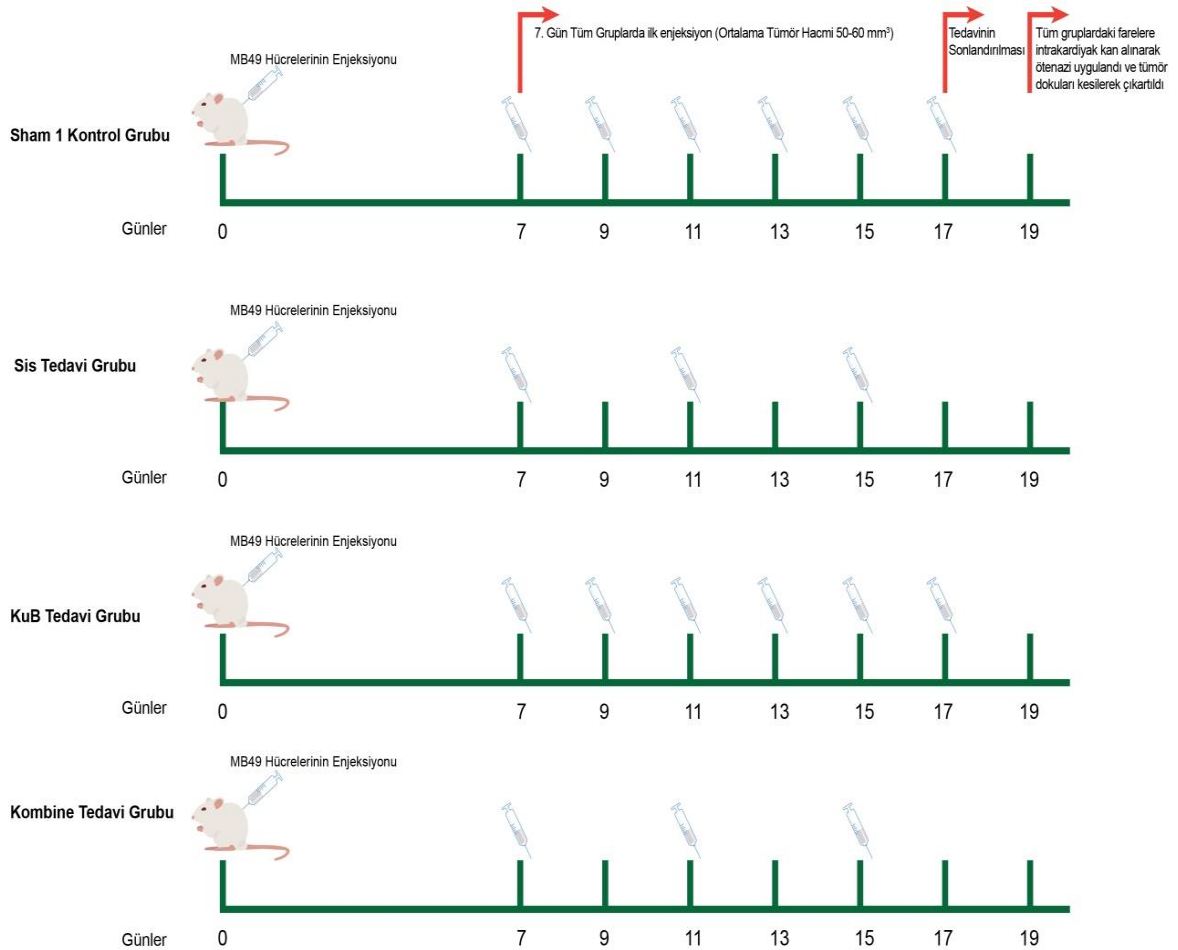
Çalışmamızda 6-8 haftalık C57BL/6 erkek fareler kullanılmıştır. Fare MB49 mesane kanseri hücre hattı, C57BL/6 fare soyuna verilerek singeneik tümör modeli oluşturulmuştur. Hayvan deneyleri için Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alınmıştır (G.Ü.ET-18.028).

MB49 hücreleri kültür kabında %70'lik yoğunluğa ulaştığında canlı hücre sayımı yapılarak 1×10^6 hücre, 100 µL PBS içinde subkutan olarak C57BL/6 erkek farelerinin yan tarafına (flank kısmına) verilmiştir. Logaritmik büyüme fazındaki MB49 hücreleri enjeksiyon için kullanılmıştır. Hücreler buz üzerinde tutularak her enjeksiyondan önce iyice karıştırılmıştır.

Tümör hacimleri yaklaşık 5 mm çapına ulaştığında hayvanlar rasgele olarak 4 gruba ayrılmıştır (n=40): Bir sham grubu ve 3 tedavi grubu olacak şekilde gruplar düzenlenmiştir. Her grup için 10 hayvan kullanılmıştır (şekil 3.1).

Gruplar

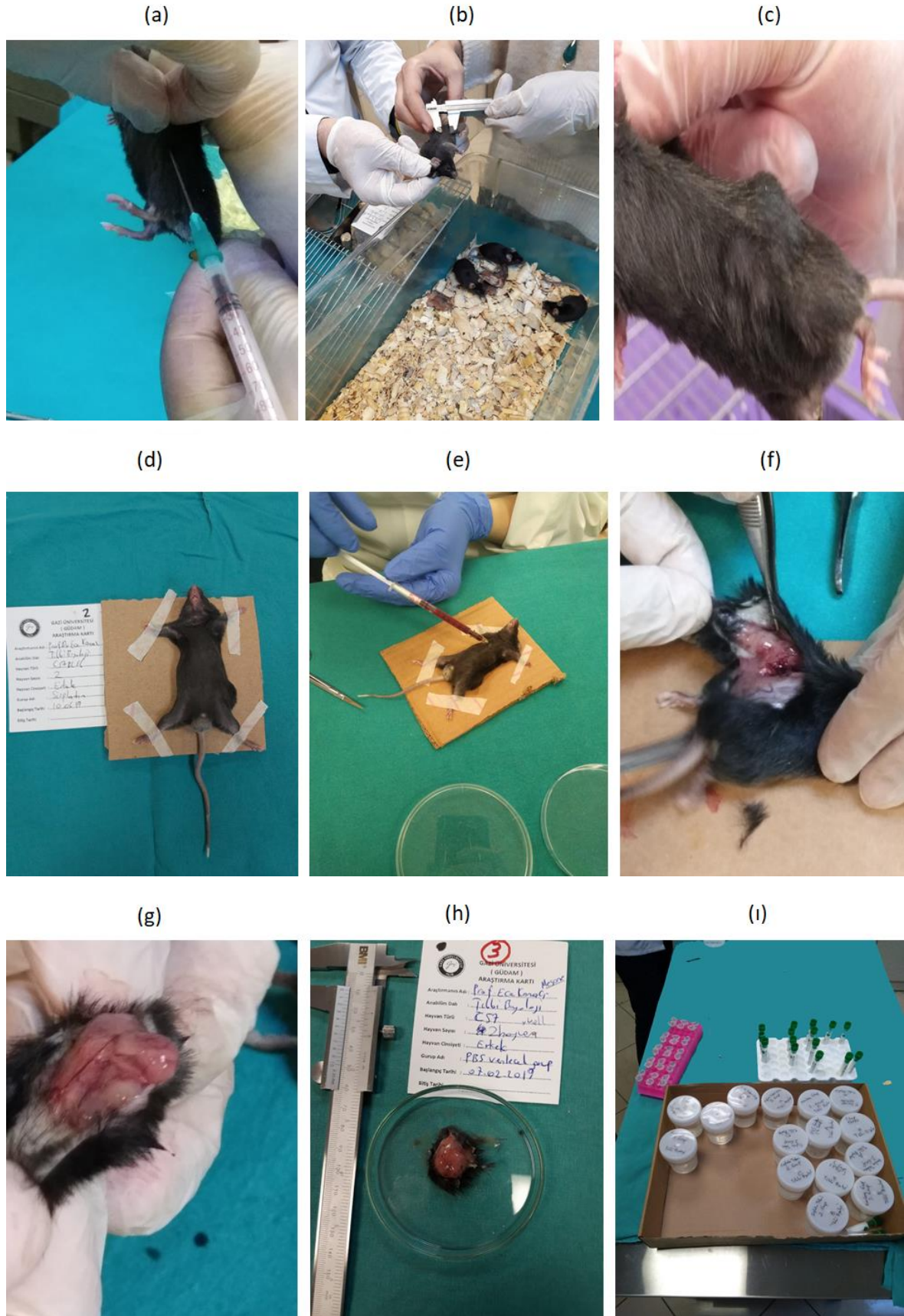
- Sham 1 Kontrol Grubu → PBS ile seyreltilmiş DMSO verildi (n=10)
- Tedavi Grubu 1: → Kukurbitasin B (1 mg/kg) haftada 3 kez PBS içinde intraperitoneal olarak verildi (n=10)
- Tedavi Grubu 2: → Sisplatin (3 mg/kg) haftada iki kez PBS içinde intraperitoneal olarak verildi (n=10)
- Tedavi Grubu 3: → Kukurbitasin B (0,5 mg/kg) haftada 3 kez ve Sisplatin (2mg/kg) haftada iki kez ayrı ayrı PBS içinde intraperitoneal olarak verildi (n=10)



Şekil 3.1. Tümör taşıyan farelere, Sis, KuB ve Sis+KuB kombinasyonlarının sabit zaman çizelgesine göre uygulanması

Uygulanacak ajanların dozları ve uygulama sıklığı, literatür taramalarına göre belirlenmiştir. Sham ve tedavi gruplarına aynı zaman ve dozaj programında enjeksiyon yapılmıştır. İlaç uygulamaları 100 µL'lik hacimlerde gerçekleştirilmiştir.

Tümör hacimleri yaklaşık 5 mm çapına ulaştığında ilaç uygulamalarına başlanmıştır. Kukurbitasin B haftalık 3 kez, sisplatin ise haftalık iki doz olarak intraperitoneal enjeksiyonla tedavi gruplarına verilmiştir. Kombine doz uygulamalarında, ilaca bağlı toksisiteyi önleyebilmek her iki ilacın dozu azaltılmıştır. İlaç uygulamalarından itibaren tümör hacimleri gün aşırı kumpas ile ölçülerek takip edilmiştir. Tümör hacmi, (uzunluk x genişlik x derinlik) x 0,5236 formülüne göre hesaplanmıştır (Iwanski ve diğerleri, 2010). Son ilaç uygulamasından iki gün sonra, tedavi 19. günde sonlandırılmıştır. Tedavi bitiminde hayvanlardan derin anestezi altında intrakardiyak kan alınarak ötenazi uygulanmış ve hayvanların tümör dokuları kesilip çıkartılarak ağırlıkları ölçülmüştür. Tümör büyümesinin inhibisyon oranı $(1-MT/MC) \times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır. MT ve MC, sırasıyla tedavi ve kontrol gruplarının ortalama tümör hacimleridir (Iwanski ve diğerleri, 2010). Kesilen tümör dokuları tüy içeren deri tabakasından arındırıldıktan sonra serum fizyolojik ile yıkanarak bir kısmı buz içerisindeki mikrosantrifüj tüplerine aktararak daha sonraki moleküler analizler için -80°C de saklanmıştır. Kalan tümör dokuları ve organlar (akciğer, karaciğer, kalp, böbrek ve mesane) histolojik analizler için %10'luk formaldehite konularak muhafaza edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Mesane kanseri fare modeli deney aşamaları

3.2.10. Histopatolojik İnceleme

Tümör ve olası metastaz dokuları; akciğer, karaciğer, böbrek, kalp ve mesane, hayvanlardan kesilerek % 10 formaldehit içinde sabitlendi. Sabitlenmiş numuneler parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklardan, döner mikrotom kullanılarak 4 mm'lik kesitler alındı ve rutin hematoksil-eozin (H&E) boyaları ile boyandı. Kesitler ışık mikroskobu altında histopatolojik olarak incelendi. Histopatolojik incelemede esas olarak hem primer tümör bölgelerinin metastazına hem de uygulanan ajanların yukarıda bahsedilen beş doku üzerindeki toksik etkilerine odaklanılmıştır. Histolojik bölümlerin görüntüleri bir dijital kamera kullanılarak çekildi.

3.2.11. İstatiksel Analiz

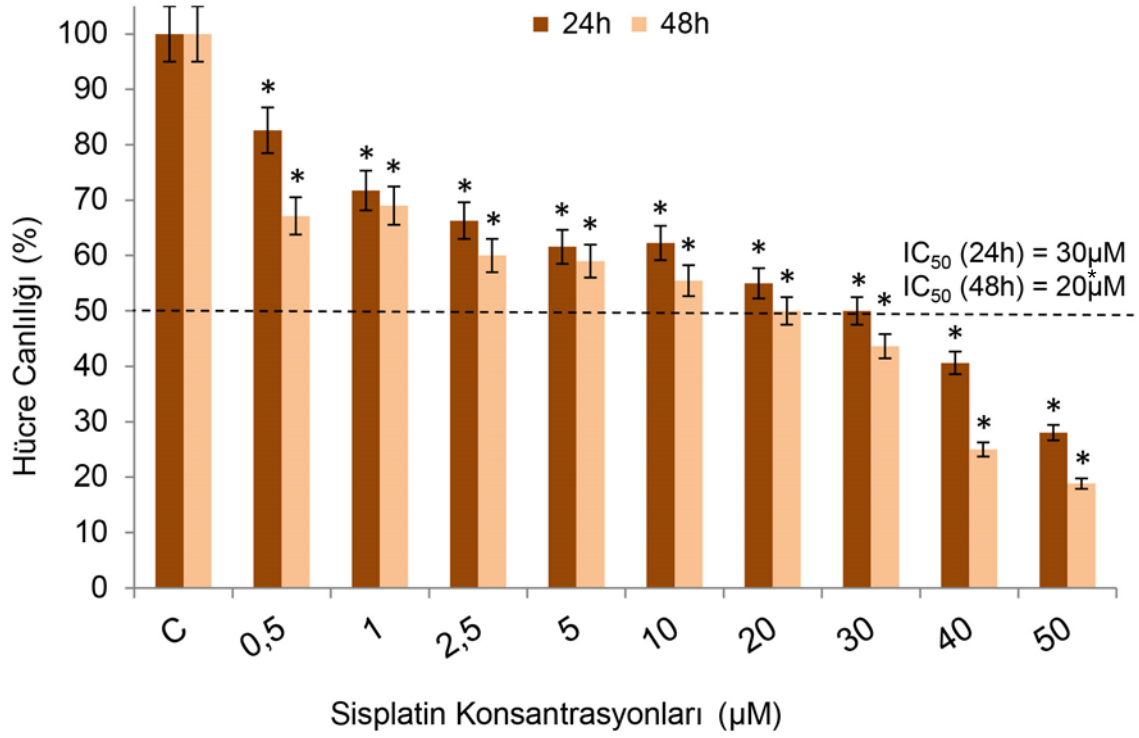
DeneySEL sonuçlardan elde edilen veriler SPSS 21.0 istatistik programı kullanılarak analiz edilmiştir. Her deneyden elde edilen sonuçlar, üç bağımsız deneyin ortalama standart sapması (SD) olarak sunulmuştur. Grup ortalamaları arasındaki farkı değerlendirmek için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Çiftlerin karşılaştırılmasında Bonferroni düzeltmeli ($P < 0.016$) Mann-Whitney U testi kullanıldı. Hücre canlılığını değerlendirmek açısından tüm gruplar arası karşılaştırmalarda $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

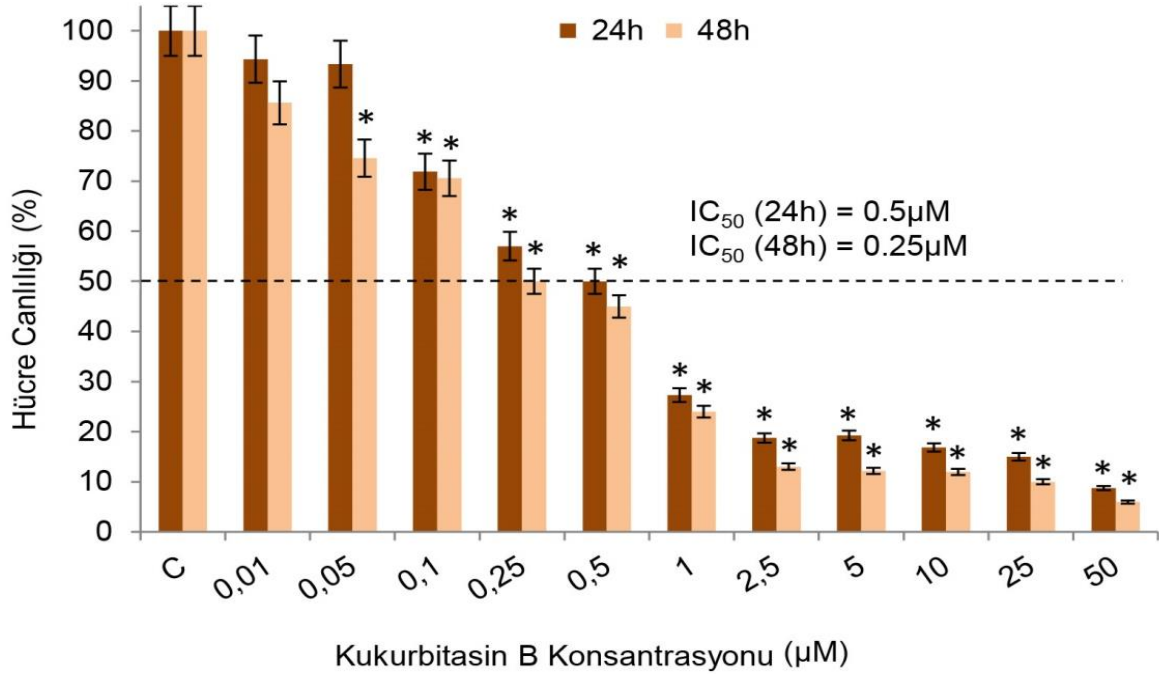
4.1. *İn Vitro* Deney Bulguları

4.1.1. MB49 Fare Mesane Kanseri Hücre Hattında Kukurbitasin B ve Sisplatinin Hücre Canlılığı Üzerine Olan Etkilerinin Değerlendirilmesi

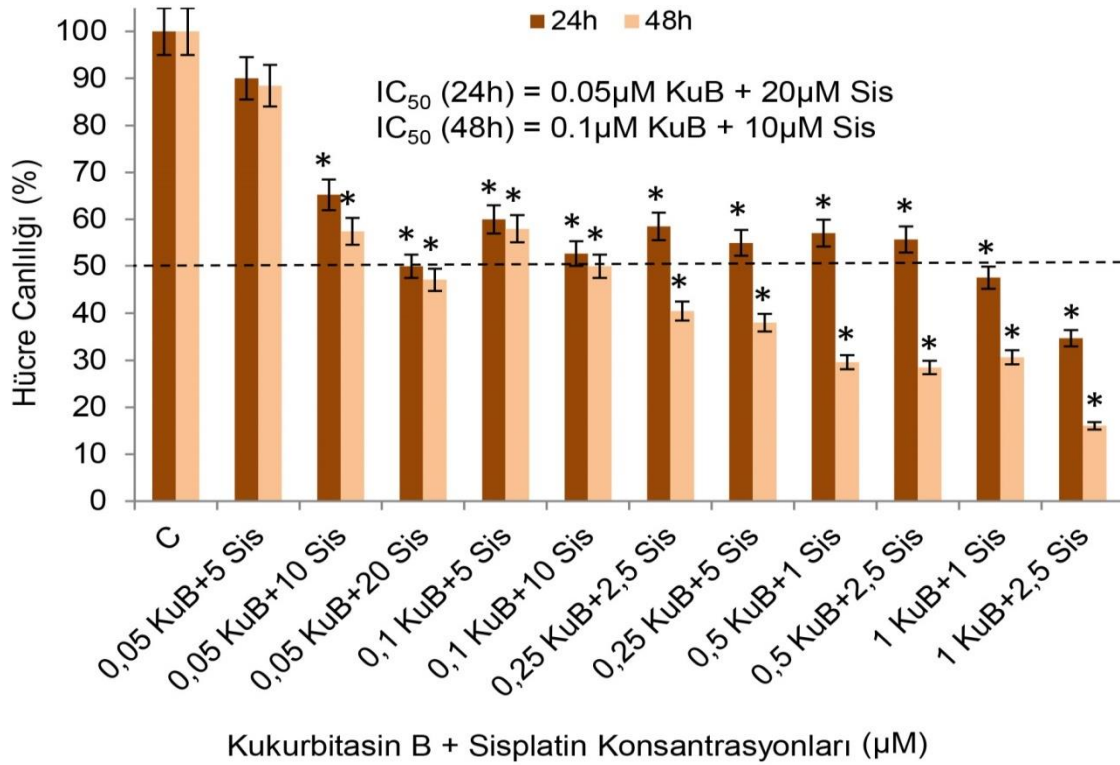
KuB ve sisplatin'in hücre canlılığına etkilerini değerlendirmek için MB49 hücreleri, Sis (0,1-50 μ M) ve KuB'nin (0,01-50 μ M) tekli olarak değişik konsantrasyonları ve bu ajanların kombine konsantrasyonları ile 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücre canlılığı WST-1 kiti ile analiz edilmiştir. MB49 hücrelerinin canlılığı, artan ilaç dozları ve uygulama süresi ile azalmıştır. KuB, siplatine kıyasla daha düşük dozlarda hücre ölümüne neden olmuştur. Sisplatin için IC₅₀ (yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonları) değeri, 24 saatlik inkübasyondan sonra yaklaşık 30 μ M ve 48 saatlik inkübasyondan sonra 20 μ M olarak bulunmuştur (Şekil 4.1). IC₅₀ değeri, KuB için 24 saatlik inkübasyondan sonra 0,5 μ M olarak bulunurken bu değer, 48 saatlik inkübasyondan sonra 0,25 μ M olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2). Sisplatinin en yüksek konsantrasyonu olan 50 μ M'da hücre canlılığı 24 saat için %28, 48 saat için % 19 olarak bulunmuştur. KuB için en yüksek konsantrasyon 50 μ M'da, hem 24 hem de 48 de hücre canlılığı %10'un altına düşmüştür. KuB ve sisplatin kombinasyon halinde kullanıldığında, hücre proliferasyonu ve canlılığını zamana bağlı olarak önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür. KuB sisplatin ile birlikte sinerjik etki yaratarak MB49 hücrelerinin canlılığını azaltmıştır. Bu iki ajanın birlikte inkübe edildiği 24 saatlik zaman diliminde elde edilen IC₅₀ değerleri, KuB ve sisplatin için sırasıyla 0.05 μ M ve 20 μ M'dır. 48 saatlik inkübasyon sonunda ise IC₅₀ değeri KuB için 0.1 μ M; sisplatin için ise 10 μ M olarak hesaplanmıştır (şekil 4.3). Sisplatin için IC₅₀ değerleri, duyarlılaşma nedeniyle önemli ölçüde azalmıştır.



Şekil 4.1. MB49 hücrelerinin (5000 hücre/kuyu) sisplatin ile belirtilen dozlarda, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları
*; p<0.05, IC₅₀ değerleri çizgili hat ile gösterilmiştir



Şekil 4.2. MB49 hücrelerinin (5000 hücre/kuyu) KuB ile belirtilen dozlarda, 24 ve 48 saat inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları
*; p<0.05, IC₅₀ değerleri çizgili hat ile gösterilmiştir.



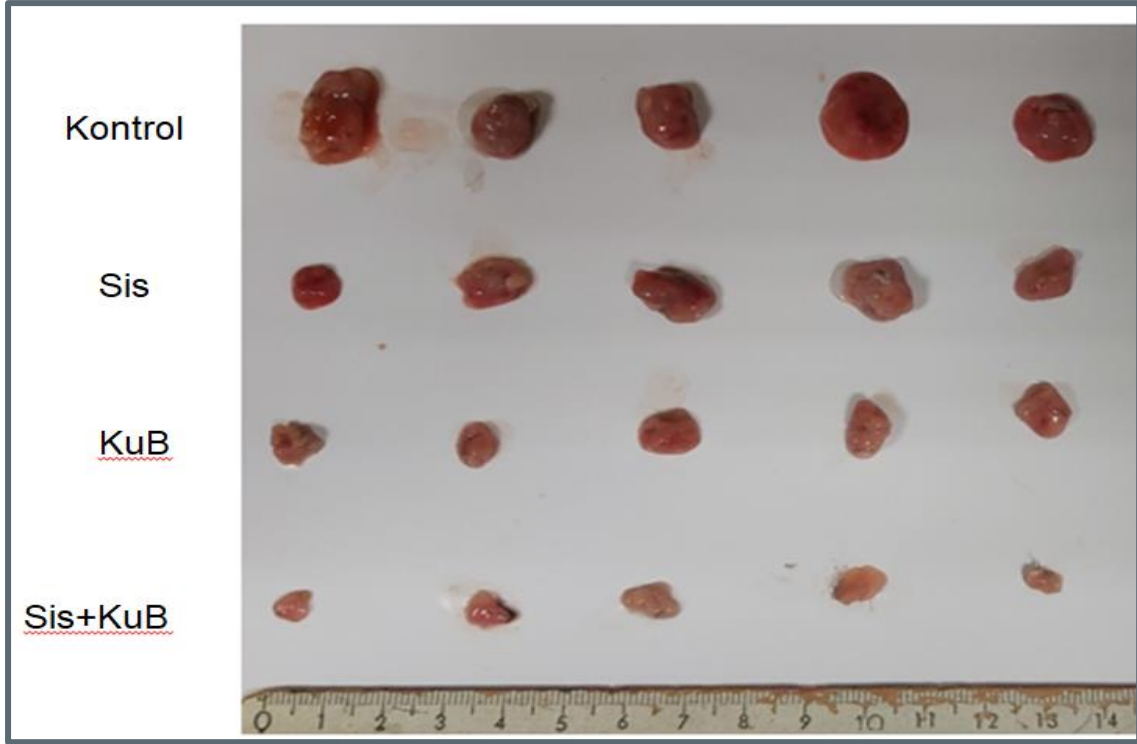
Şekil 4.3. MB49 hücrelerinin (5000 hücre/kuyu) KuB ve Sisplatin kombinasyonu ile belirtilen dozlarda, 24 ve 48 saatlik inkübasyonu sonucu belirlenen hücre canlılık oranları *;p<0.05, IC₅₀ değerleri çizgili hat ile gösterilmiştir

4.2. *In Vivo* Deney Bulguları

4.2.1. Mesane Kanseri MB49 Fare Modelinde Ajan Uygulaması Sonrası Tümör Gelişiminin Değerlendirilmesi

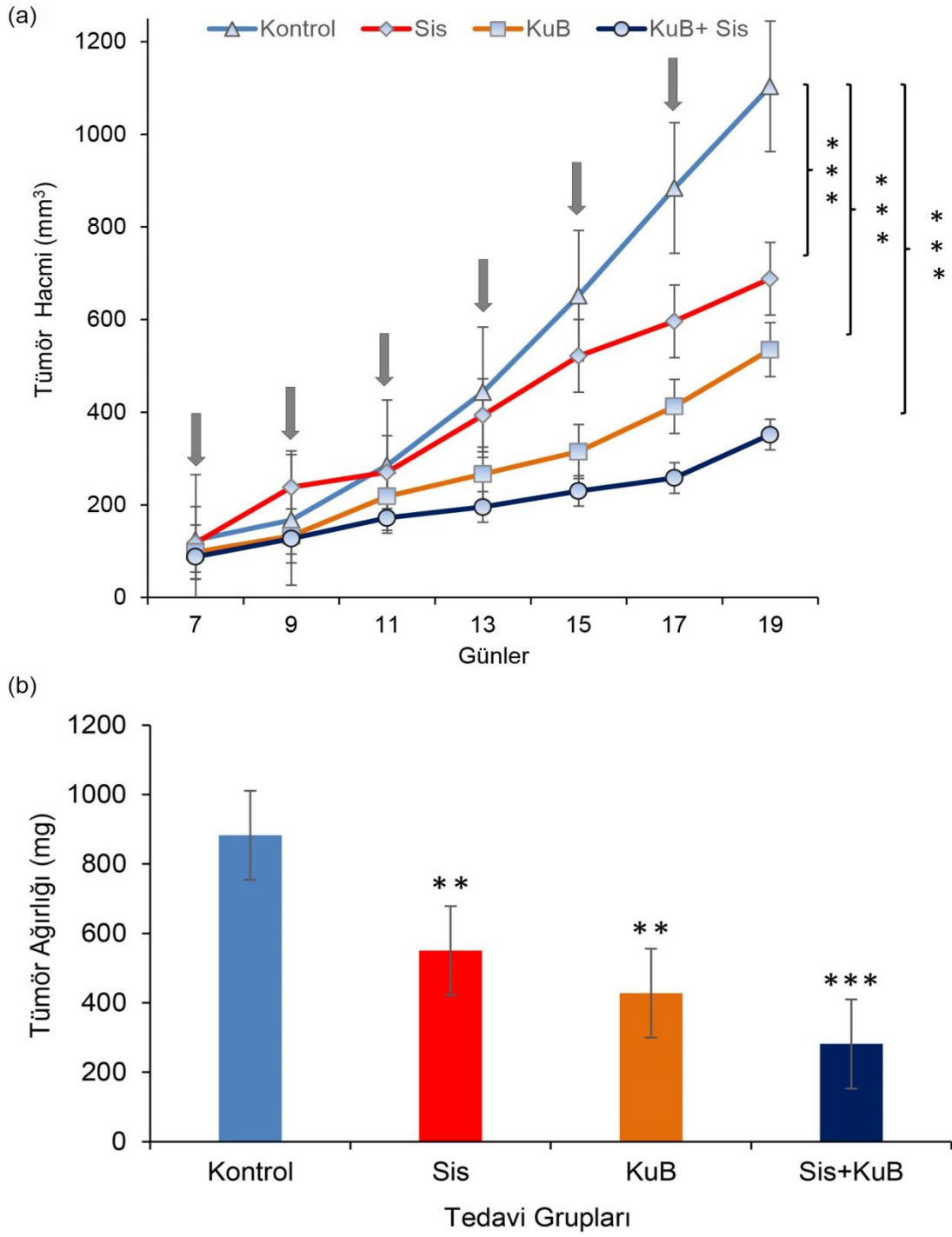
MB49 hücrelerinin *in vivo* ortamdaki davranışı, fare singeneik tümör modelinde araştırılmıştır. Kullandığımız ajanların anti-tümör etkileri, MB49 hücreleri tarafından indüklenebilen mesane kanseri singeneik fare modelinde değerlendirilmiştir.

Kültürlenmiş MB49 hücreleri, subkutan olarak singeneik farelere implante edildikten sonra tümör çaplarının yaklaşık 50-60 mm³ e ulaşması beklenmiştir. Tümör hacimleri istenilen düzeye geldikten sonra fareler sabit zaman çizelgesine göre Sis, KuB ve Sis+KuB ile tedavi edilmiştir. Tedavi süreci öncesinde tüm gruplarda tümör oluşumu gözlenmiştir. Deney sırasında, kontrol farelerinin tümör hacmi zaman içinde dramatik bir şekilde artarken tekli ve kombine tedavi gruplarındaki tümör hacimleri ve ağırlıkları, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde daha küçük kalmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. KuB ve Sis ile tedavi edilen, MB49 tümör hücrelerini taşıyan fare dokularından kesilen tümörlerin temsili görüntüleri

Sisplatin ve KuB'nin tekli uygulamaları, tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe etmiştir. Tümör inhibisyon oranları Sis ve KuB tedavi gruplarında sırasıyla % 52 ve % 62 iken, bu oran kombine tedavi grubunda % 77'ye kadar çıkmıştır (Şekil 4.5(a)). Bu sonuçlar, sisplatin ve KuB'nin mesane tümör büyümesini ve ilerlemesini önemli ölçüde azaltan sinerjik etkilerini güçlü bir şekilde desteklemektedir. Tümör ağırlıkları da tümör hacimleri ile orantılıdır ve tümör ağırlıklarındaki ortalama artış en az kombine tedavi grubunda görülmüştür (Şekil 4.5(b)). KuB'nin uygulandığı tedavi gruplarında vücut ağırlığında önemli bir değişiklik olmazken, aynı zamanda bu ajan ile tedavi edilen hayvanlarda KuB'nin toksik etkisi gözlenmemiştir.



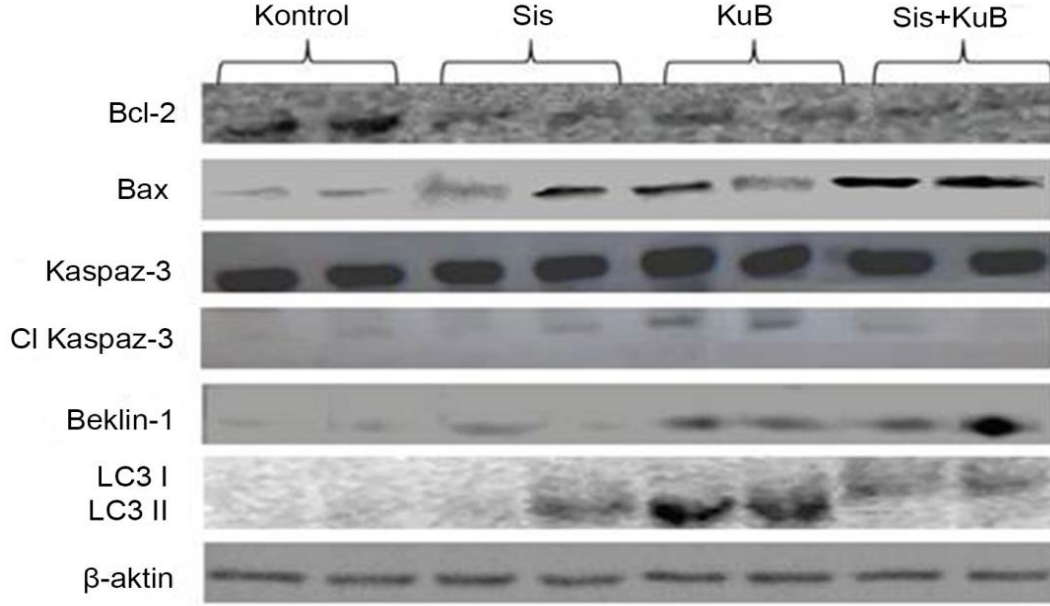
Şekil. 4.5. Tedaviden sonra her gruptaki farelerden alınan tümör dokularının ortalama hacimleri (a) ve ağırlıkları (b), *** P < 0.001, ** P < 0.01

4.2.2. Kukurbitasin B ve Sisplatin Uygulamalarına Bağlı Olarak Tümör Dokularında Apoptoz ve Otofaji Yolaklarına Ait Proteinlerin İfade Değişimlerinin İncelenmesi

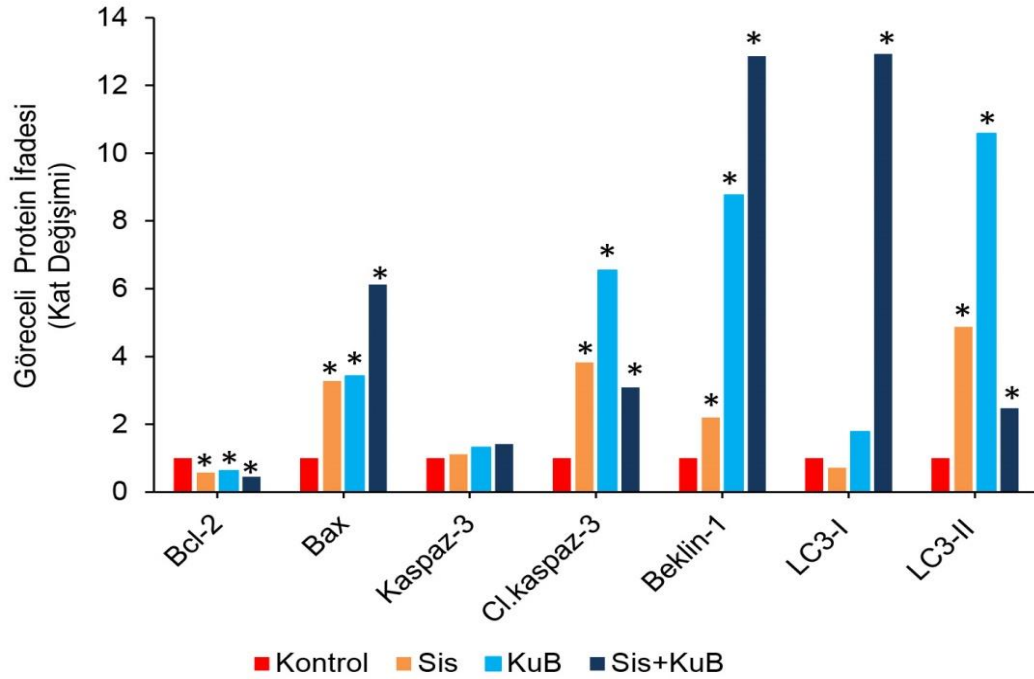
KuB ve Sis'in apoptotik yol üzerindeki etkilerini araştırmak için, Western Blot yöntemi ile Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve Cl Kaspaz-3 ifade seviyeleri tespit edilmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında, anti-apoptotik Bcl-2 protein seviyeleri tedavi gruplarında önemli ölçüde azalmıştır ($p < 0.05$). Bcl-2 ifadesindeki azalma sisplatin grubunda KuB grubuna göre daha yüksek iken en fazla azalma kombine grupta görülmüştür. Sis ve KuB ile tedavi edilen gruplarda pro-apoptotik Bax proteinin ifade seviyeleri benzer şekilde kontrol grubuna göre yaklaşık 3 kat artarken, kombine tedavi grubunda bu artış yaklaşık 6 kat olmuştur. Cl Kaspaz-3, apoptoz belirteci olarak kullanılan birçok proteinin kesilmesinden sorumlu olan hücre ölümünün ana uygulayıcısıdır. Tedavi edilen tüm gruplarda, Cl kaspase-3'ün ifade seviyeleri önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur ($P < 0.05$). Tedavi grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında, Cl kaspaz 3 ifade seviyesinde artış en fazla KuB grubunda olmuştur ($p < 0.05$). Öte yandan, tedavi edilen gruplarda Kaspaz 3 seviyelerinde önemli bir farklılık yoktur. Bu sonuçlar KuB'nin mitokondriyal apoptotik yolları tetikleyerek apoptozun başlamasına yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.

Tümör dokularında otofaji yolağındaki değişiklikleri belirlemek için Beklin-1, LC3I ve LC3II ifade seviyeleri Western Blot yöntemi ile incelenmiştir. Sadece Sis ve sadece KuB ile tedavi edilen gruplarda Beklin-1 ifade seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulunurken, Beklin-1 seviyesinde en fazla artış kombine grupta gözlenmiştir ($P < 0.0001$). Kombine tedavi grubunda Beklin-1 ifade seviyeleri yaklaşık 13 kat artmıştır ($P < 0.0001$). LC3I protein ifade seviyesi, tek ajanla tedavi edilen gruplarla karşılaştırıldığında kombine tedavi grubunda önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur ($P < 0.0001$). KuB, kontrol grubuna kıyasla LC3II seviyelerini önemli ölçüde yükseltmiştir. Bununla birlikte, kombine tedavi grubundaki LC3II seviyelerinde, tek ajanla tedavi edilen gruplara kıyasla önemli bir düşüş görülmüştür. Sisplatin, KuB'nin otofajik aktivitesini azaltmış olabilir ve belki de bu iki ajanın birlikte kullanımının otofajik yolağın aktivasyonunda sinerjistik bir etkisi

bulunmamaktadır. Sonuçlarımıza göre artan LC3II ve Beklin-1 protein seviyeleri özellikle KuB'nin otofaji yolağını uyardığını göstermektedir (Şekil 4.6 ve 4.7).



Şekil.4.6. Belirtilen antikorlar kullanılarak; KuB, Sis ve KuB + Sis ile muamele edilmiş tümör dokularında meydana gelen protein ifade değişimlerinin gösterilmesi



Şekil.4.7. KuB, Sis ve KuB + Sis tedavisinden sonra apoptotik (Bcl-2, Bax, Kaspaz-3 ve Cl Kaspaz-3) ve otofaji proteinlerinin (Beklin-1, LC3I, LC3II) göreceli ifade seviyeleri

4.2.3. Ajan Uygulamalarına Bağlı Olarak PI3K/AKT Yolağı İle Bağlantılı Proteinlerdeki Fosforilasyon Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Sis ve KuB aracılı ölüm yollarının aktivasyonunda rol oynayan mekanizmaların daha iyi tanımlanması için bu yollarla ilgili proteinlerin fosforilasyon düzeyleri AKT Phosphorylation Array C1 dizi kiti ile araştırılmıştır. PI3K-Akt yolağı; hücre sağkalımı, büyümesi, migrasyonu, apoptoz ve otofaji gibi hücresel süreçlerle ilişkili en önemli sinyal yollarından biridir. Bu yöntemle bu sinyal yolağıyla ilişkili 18 proteinin fosforilasyon miktarlarındaki değişimlere bakılmıştır. Bunun için her bir gruptaki proteinler belirli hacimlerde karıştırılıp membranlarla inkübe edilmiştir.

Thr198'deki fosforilasyon, bu proteinin stabilizasyonunu ve aktivasyonunu etkiler. PI3K kinazlar tarafından p27'nin T198 rezidüsünden fosforilasyonu; siklin bağımlı kinaz inhibitör etkisini ortadan kaldırmakta ve siklin D-siklin bağımlı kinaz aktivasyonunu arttırmaktadır (Sun ve diğerleri, 2016). KuB tedavi grubunda fosforile p27 miktarı, kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. 40 kDa'lık prolin bakımından zengin Akt substratı (PRAS40), AKT'nin hedef proteinidir. Bu protein, PI3K/Akt ve mTOR yolları ile ilişkilidir. PRAS40'ın fosforilasyonu bu yolların aktivasyonunu arttırmaktadır (Lu ve diğerleri 2014). PRAS40 fosforilasyonu, KuB tedavi grubunda kontrol gruplarına göre önemli ölçüde azalmıştır ($p<0.05$), ancak diğer tedavi gruplarında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. c-Raf, hücre proliferasyonunu ve ölümünü etkileyen bir serin-treonin kinazdır. Ser301 fosforilasyonu, bu proteinin aktif formu ile ilişkilidir (Hekman, 2005). KuB tedavi grubunda Raf-1 fosforilasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($P<0.05$).

KuB ve sis kombinasyonu, AKT, ERK1/ERK2, mTOR, BAD fosforilasyon seviyelerini sinerjik olarak azaltmış ve fosfo-AMPK α seviyesini ise artırmıştır. AKT fosforilasyonu KuB ve kombine gruplarında azalmıştır. Kombine grupta fosfo-AKT protein seviyeleri kontrol grubundaki miktarın yaklaşık yarısına düşmüştür ($P<0.05$).

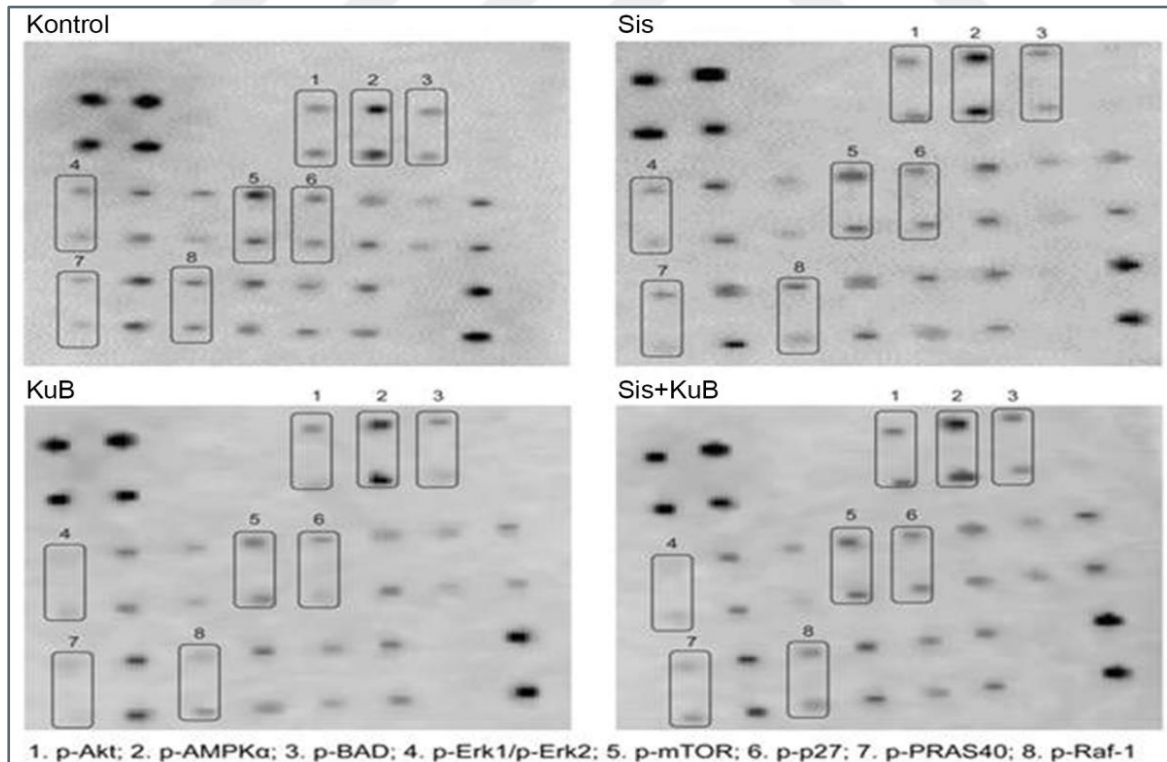
Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz 1 (ERK1)(pT202/pY204) ve ERK2'nin (pT185/pY187) fosfo formları tüm tedavi gruplarında azalırken; özellikle ERK1 fosforilasyonu kombine grupta önemli ölçüde azalmıştır ($P<0.05$).

AMPK α 'nın fosforilasyon seviyeleri tekli tedavi gruplarında artarken en yüksek artış kombine grupta gözlemlendi ($P<0.05$).

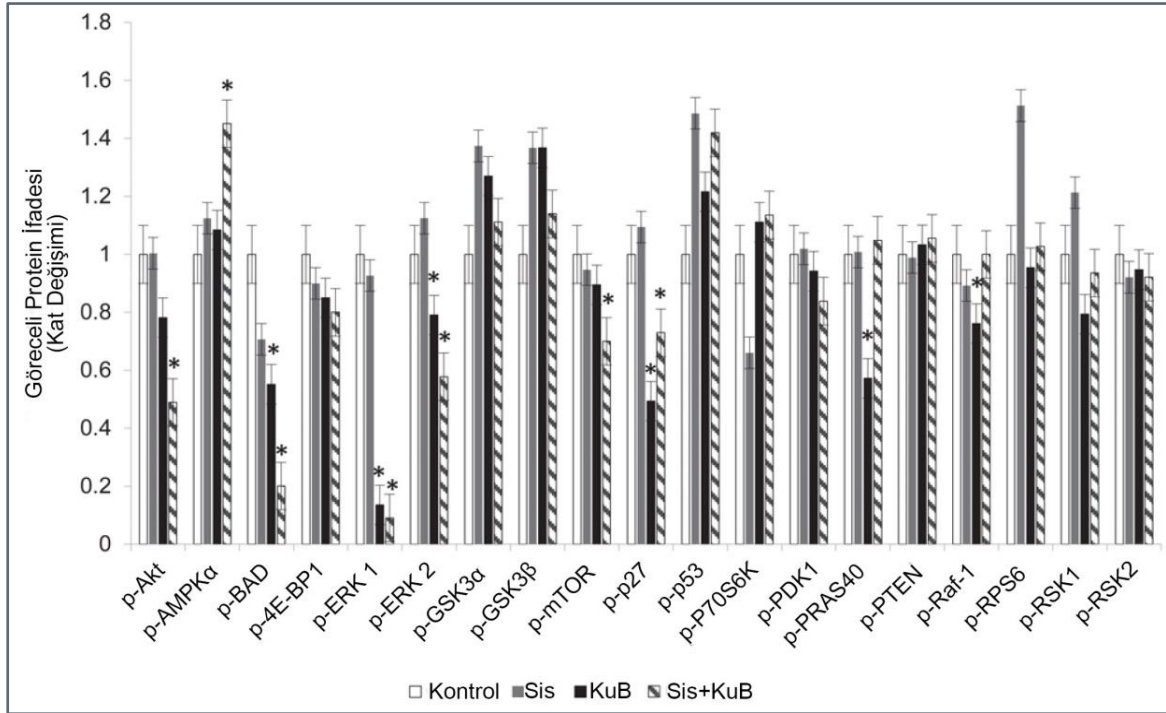
mTOR proteininin fosforilasyon seviyeleri Sis ve KuB gruplarında kademeli olarak azalırken, kombine grupta önemli düşüş görülmüştür ($P<0.05$).

Ser-112 rezidüsünün fosforilasyonu, BAD proteininin pro-apoptotik aktivitesini azaltmaktadır. KuB ve kombine grupta BAD fosforilasyonu önemli bir azalma göstermiştir ($P<0.05$). Fosfo-BAD miktarındaki azalma en fazla kombine grupta olmuştur.

Araştırılan diğer proteinlerin (4E-BP1, GSK3 α , GSK3 β , P53, P70S6K, PDK1, PTEN, RPS6, RSK1, RSK2) fosforilasyon miktarlarında tedavi sonrası anlamlı bir değişim görülmemiştir (Şekil 4.8 ve 4.9).



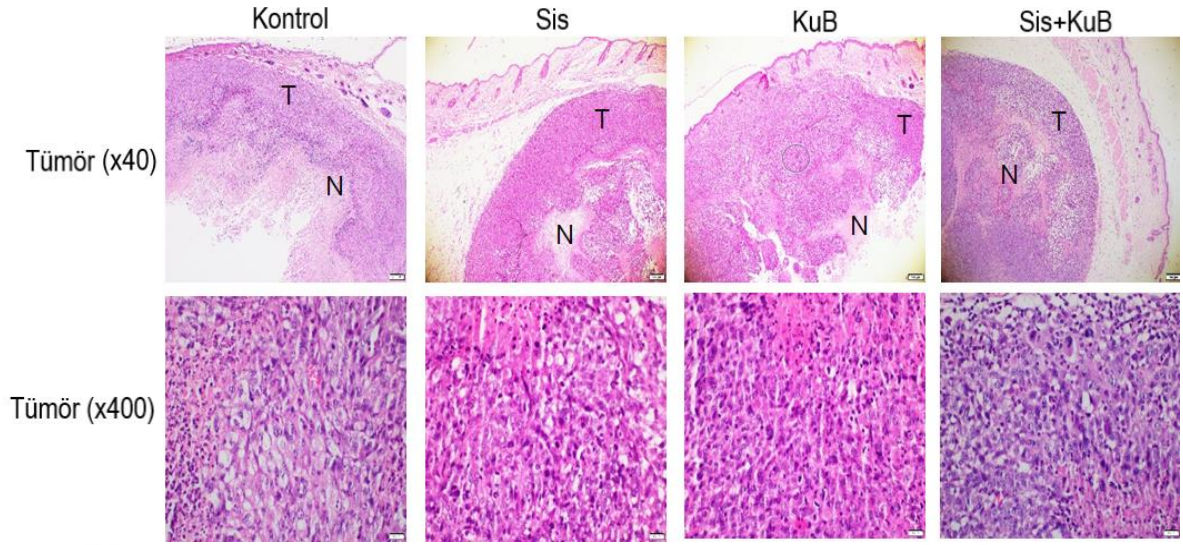
Şekil.4.8. Dört membrandaki fosfo-proteinlerin ifade değişimleri, numaralandırılmış kare çerçeveler ile gösterilmiştir. Nokta yoğunluklarının sayısal değeri image J programı kullanılarak ölçülmüştür, * $P<0.05$



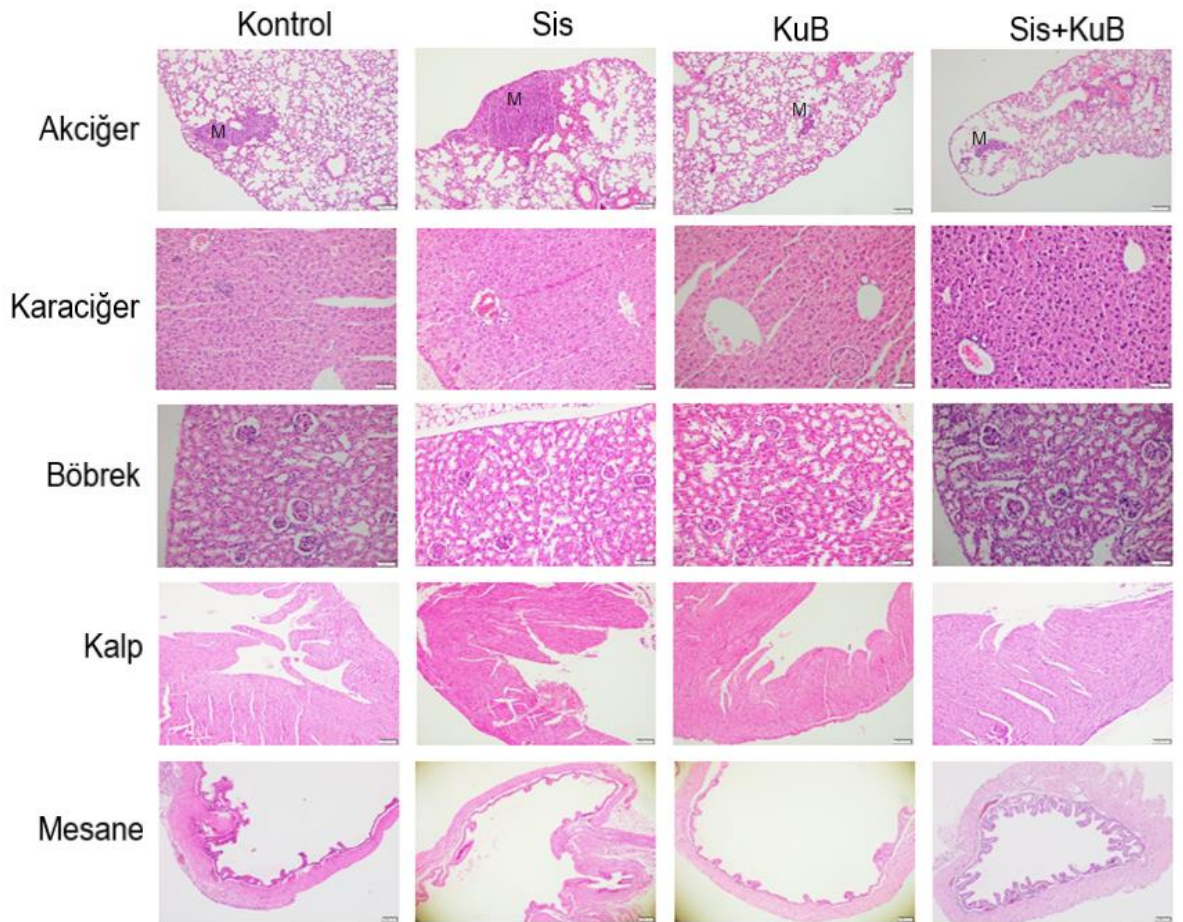
Şekil 4.9. Dört membrandaki fosfo-proteinlerin göreceli ifade değişimlerinin çubuklu grafik ile gösterimi, *P<0.05

4.2.4. Histopatolojik Değerlendirmeler

Tümör dokularının ve uygulanan ilaçların dokulara patolojisi hematoksilin-eozin boyaması ile değerlendirilmiştir. En büyük tümör çapı ve en büyük nekroz alanı kontrol grubunda bulunmuştur. En az tümör gelişimi kombine tedavi grubunda gözlenmiştir. Tümör hücreleri, büyük veziküler hiperkromatik çekirdeklere, belirgin nükleollere ve orta genişlikte sitoplazmaya sahipti. Gruplar arasında mitoz oranlarında farklılık bulunmamıştır. Tüm gruplarda 7-12 mitoz/1 yüksek güç alanı (hpf) gözlemlendi (Şekil 4.10). Toksisite; karaciğerde portal inflamasyon, globüler inflamasyon, steatoz, kupffer hücre hiperplazisi; akciğerde iltihap, tıkanıklık ve kanama olarak değerlendirilmiştir. Böbrek dokusunda, tübüler nekroz, inflamasyon ve glomerüler patoloji olarak değerlendirildi. Ayrıca kalp nekrozu da değerlendirilmiştir. Tüm gruplarda akciğer metastazı saptanmıştır. Kontrol grubunda birden fazla lobda metastaz görülmüştür. Kontrol ve tedavi gruplarında karaciğer, böbrek, kalp ve mesane bölümlerinde histopatolojik değişiklik veya metastaz bulunmamıştır. KuB' nin tekli ve sisplatin ile birlikte uygulamaları toksisite açısından güvenli bir profil çizmiştir (Şekil 4.11). Bu sonuçlar KuB 'nin toksisite göstermeyen potansiyel bir anti-tümör ajanı olabileceğini desteklemektedir.



Şekil 4.10. Tedaviden sonra çıkarılan tümör dokularının hematoksilin ve eozin ile boyanmış görselleri, T:Tümör, N:Nekroz



Şekil.4.11. Tedaviden sonra çıkarılan organların (akciğer, karaciğer, böbrek, kalp ve mesane), hematoksilin ve eozin ile boyanmış görselleri, M:Metastaz



5. TARTIŞMA

Mesane kanseri, yüksek morbidite ve mortalitenin eşlik ettiği, sürekli artan insidansı ve prevalansı ile dünyada en yaygın görülen kanserlerden biridir (Batista ve diğerleri, 2020).

Mesane kanseri tedavisinde; radikal sistektomi (RS), radyoterapi ve postoperatif kemoterapi veya immünoterapi gibi gelişmekte olan tedavi uygulamalarına rağmen, yüksek nüks ve metastaz sıklığı nedeniyle hastaların prognozu hala tatmin edici seviyede değildir. Bu nedenle, yeni anti-tümör ajanların keşfedilmesi ve tanımlanması acilen gerekmektedir (Ma ve diğerleri, 2020).

Kasa invaziv mesane kanseri tedavisi, son 30 yılda sisplatin bazlı kombinasyon kemoterapi ve cerrahinin ötesine geçememiştir. Nükseden veya metastatik mesane kanseri olan hastalar için medyan sağkalım, sisplatin bazlı kemoterapi ile 14-15 aydır ve yaygın olarak tanınan ikinci basamak tedavisi yoktur (TCGA, 2014). Bununla birlikte, yanıtın kalıcılığı değişkendir ve ilerlemiş hastalığı olan hastaların prognozu zayıf kalır (Alifrangis ve diğerleri, 2019).

Sisplatinin başlangıçtaki terapötik başarısı, temel olarak kısmi yanıt veya hastalık stabilizasyonuna bağlıdır. Bir anti-kanser ilaç olarak sisplatinin klinik faydası, edinilen kemo-direnç ve sisplatin ile ilişkili toksisite nedeniyle sınırlıdır. Bu nedenle, hedef dışı doku toksisitesini azaltan doğal bileşiklerle kombinasyon terapileri yoluyla anti-kanser ilaçların anti-kanser potansiyelini iyileştirmeye odaklanan alternatif tedavi stratejilerine odaklanılmıştır (Kalai Selvi ve diğerleri, 2017).

Anti-neoplastik ilaçların doz artırımı, kanser hücresi direncindeki küçük bir artışın bile üstesinden gelmek için gereklidir (Kalai Selvi ve diğerleri, 2017). Dolayısıyla, ilaç kombinasyonları ile aynı terapötik etkiye daha düşük dozda ulaşma ve yüksek doz kaynaklı yan etkilerin en aza indirilmesi amaçlanmaktadır (Lee ve diğerleri, 2010).

Geleneksel Çin tıbbından veya diğer tıbbi bitkilerden doğal olarak türetilen benzersiz aktif kompozisyonların araştırılması, seçici moleküler hedeflerine dayalı olarak çok sayıda insan kanserinin tedavisi için yeni ve güvenilir terapötik materyal bulmaya yardımcı olmaktadır. Geleneksel Çin tıbbından türetilen biyoaktif bileşenler, yüksek biyoyararlanımları ve oldukça güvenli olmaları, minimum yan etkilere sahip olmaları ve en önemlisi uygun maliyetli olmaları nedeniyle dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır (Luan ve diğerleri, 2020). Doğu Asya ülkelerinde binlerce yıldır geleneksel tıpta kullanılan kukurbitasinler, kanser kemoprevansiyonu ve kemoterapi için kullanıma potansiyeline sahiptir (Gao ve diğerleri, 2014). Kukurbitasinler, aslen Cucurbitaceae türlerinde bulunan yapısal olarak çeşitli triterpenoidlerdir ve muazzam farmakolojik potansiyele sahiptir (Kim ve diğerleri, 2020). Kukurbitasin B, kukurbitasinlerin en bol bulunan formlarından ve aynı zamanda kukurbitasin ailesinin en iyi çalışılmış üyelerinden biridir (Gao ve diğerleri, 2014). KuB, çeşitli tümörler üzerinde antikanser etkilerinin olduğu bildirilen en umut verici ajanlardan biridir (Gao ve diğerleri, 2014). Çeşitli çalışmalarda; KuB'nin; prostat, meme, serviks, karaciğer, pankreas ve beyin kanserlerini içeren çeşitli kanser hücre hatlarında, hücre döngülerini belirli evrelerde durdurarak hücre çoğalmasını inhibe ettiği, apoptoz ve otofaji yollarını aktive ederek tümör ksenograft modellerinde tümör gelişimini engellediği gösterilmiştir (Chan ve diğerleri, 2010b; Chen ve diğerleri, 2010; Liu ve diğerleri, 2010; Zhu ve diğerleri, 2012; Zhang ve diğerleri, 2017; Qin ve diğerleri, 2018).

Çalışmamızda, KuB ve sisplatin arasındaki sinerjistik etki, *in vitro* ve *in vivo* mesane kanseri modellerinde araştırılmıştır. KuB'nin daha önce araştırıldığı *in vivo* kanser modellerinde normal dokulara toksik etki göstermemesi, birçok kanser türü ile yapılan pre-klinik modelde kuvvetli anti-kanserojen etki göstermesi ve kemoterapötik ajanlarla sinerjik etki göstermesinden dolayı sisplatin ile birlikte kullanacağımız kombinasyon ajanı olarak seçilmiştir.

KuB ve sisplatinin kombine uygulamalarının, sinerjistik bir etki yaratarak sisplatin etkinliğini arttırdığı çeşitli *in vitro* modellerde gösterilmiştir (Chen ve diğerleri, 2010; Liu ve diğerleri, 2010; El-Senduny ve diğerleri, 2016; Zhang ve diğerleri, 2017; Qin ve diğerleri, 2018; Liu ve diğerleri, 2019; Xu ve diğerleri, 2020).

Çalışmamızda, KuB tek başına MB49 hücrelerine karşı güçlü bir anti-proliferatif etki göstermiştir. KuB, sisplatin ile kıyaslandığında çok düşük dozlarda hücre çoğalmasını azaltmıştır. Kullandığımız doz aralığı, literatürde KuB'nin anti-kanser aktivitesini gösterdiği mikromolar konsantrasyon aralığı ve IC₅₀ değerleri (Zheng ve diğerleri, 2014; Khan ve diğerleri, 2017; Liu ve diğerleri, 2017; Yang ve diğerleri, 2017; Zhou ve diğerleri, 2017; Qin ve diğerleri, 2018) ile uyumlu iken KuB nin daha düşük doz aralığında (0,0156-0,353 μ M) (Chan ve diğerleri, 2010a; Gupta ve Srivastava, 2014) ve daha yüksek dozlarda (>10 μ M) kullanıldığı çalışmalar (Zheng ve diğerleri 2014; Zhang ve diğerleri 2017) mevcuttur. KuB'nin etki gösterdiği IC₅₀ değerlerindeki farklılıkların, kullanılan KuB'nin saflığına ve kanser modellerinin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Gupta ve Srivastava, 2014). Klinik deneylerde kanserin önlenmesi ve tedavisi için doğal ajanların kullanımı için en sınırlayıcı faktörlerden biri, bu ajanların etkilerini genellikle fizyolojik olarak elde edilemeyen yüksek konsantrasyonlarda göstermeleridir (Khan ve diğerleri, 2017). Bu nedenle, KuB'nin düşük dozlarda etkin olması klinik kullanım ve biyolojik etkinliği açısından önemlidir. Ayrıca KuB, sisplatin ile sinerjistik etkileşim oluşturarak sisplatinin kanser hücreleri üzerindeki anti-proliferatif etkilerini arttırmıştır. Son birkaç on yılda sisplatin direncinin üstesinden gelmek ve böbrek fonksiyonunu korumak sisplatinin daha düşük dozlarda etkili olduğu çok sayıda çalışma yapılmaktadır (Kim ve diğerleri, 2020). KuB ile sisplatin arasındaki bulduğumuz bu sinerjistik etkileşim, sisplatinin daha düşük dozlarda aynı etkiye sahip olmasına izin vererek, sisplatinin klinik kullanımda yüksek doza bağlı toksik etkilerinin azaltılması açısından önemlidir.

Takeyama ve arkadaşları (2020), MB49 hücrelerini 6 ay boyunca sisplatine maruz bırakarak sisplatin dirençli hücre soyları oluşturmuşlardır (MB49R). Bu ekip, MB49 hücrelerinin IC₅₀ değerini 1,2 μ M olarak bulurken; bu hücre hattının sisplatine dirençli soyunda bu değerinin 20 μ M'a kadar çıktığını rapor etmişlerdir. Çalışmamızda MB49 hücrelerinin sisplatin için IC₅₀ değerinin, 24-48 saatlik zaman dilimlerinde yaklaşık 20-30 μ M olması, bu hücrelerin de sisplatine dirençli bir hücre hattı olabileceğini göstermektedir. Dolayısıyla KuB'nin sisplatine dirençli MB49 hücrelerinin sisplatine karşı yanıtını arttırması ayrıca önemlidir (Takeyama ve diğerleri, 2020).

Tip I programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptoz, birçok moleküler ve biyokimyasal olayı içeren oldukça kontrollü ve sıkı bir şekilde düzenlenmiş bir süreçtir. Organizmalardaki temel işlevleri, gelişim sırasında anormal hücreleri fizyolojik olarak uzaklaştırmak ve doku homeostazını sürdürmektir (Liu ve diğerleri, 2020). Kanseri hücrelerinde apoptoz indüksiyonu, birçok bileşiğin anti-kanser etkilerini sergilediği anahtar bir mekanizmadır (Klungsaeng ve diğerleri, 2019). Bcl-2 ve Bax, çok önemli apoptotik düzenleyiciler ve biyobelirteçlerdir. Bu proteinler arasındaki denge, artan mitokondriyal membran geçirgenliğinin ve pro-apoptotik moleküllerin sitoplazmaya salınmasını aktive eden içsel apoptoz yolağında merkezi bir rol oynar (Mani ve diğerleri, 2015). Bcl-2'nin aşırı ifadesi mesane kanserinde kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Bcl-2 gibi anti-apoptotik üyelerin, mesane kanseri dahil olmak üzere birçok malignitede oldukça fazla ifade edildiği, kemoresistiviteyi ve radyosensitiviteyi olumsuz etkilediği bilinmektedir (Mani ve diğerleri, 2015).

Önceki bir çalışmada, mesane kanseri olan tüm hastaların % 69'unda Bcl-2'nin pozitif olarak ifade edildiği ve ifade seviyesinin kanserle ilişkili olduğunu gösterilmiştir (Li ve diğerleri, 2018).

Sistein-aspartik asit proteaz (kaspaz) ailesinin merkezi bir üyesi olan Kaspaz-3; apoptotik sinyal yolunda ve hücrel apoptozu düzenlemede baskın bir role sahiptir. Buna bağlı olarak, kaspaz-3 birçok kanser türünün gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Liu ve diğerleri, 2018). Kaspaz-3 başlangıçta aktif olmayan bir pro-enzim formuna çevrilir. Hücreler apoptoz geçirdiğinde kaspaz-3 aktive olur. Bölünmüş kaspaz-3, kaspaz-3'ün aktif formudur ve apoptozu düzenlemek için hücrelerde diğer kaspazları ve diğer ilgili hedefleri proteolitik olarak parçalayabilir ve aktive edebilir. Yüksek kaspaz-3 ifade seviyeleri birçok malignitede karakterize edilmiştir (Liu ve diğerleri, 2018).

Normal hücreler ile karşılaştırıldığında, bazı tümör hücrelerinde kaspaz-3 ifadesinin arttığı ancak bazı tümörlerde ise azaldığı bulunmuştur. Ayrıca artan bölünmüş kaspaz-3 ifadesi, birkaç kanser tipinde azalan genel sağkalım ile ilişkilidir (Hu ve diğerleri, 2014).

KuB'nin, CIP2A/PP2A/Akt, JAK2/STAT3 ve MAPK gibi kanser ile ilişkili sinyal yollarını inhibe ederek Bcl-2 ailesi proteinleri (anti-apoptotik Bcl-2 ifadelerini azaltarak pro-apoptotik Bax ifadelerini arttırarak) yoluyla apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Ding ve diğerleri, 2017; Zhang ve diğerleri, 2017; Qin ve diğerleri, 2018; Liu ve diğerleri, 2019).

Sonuçlarımıza göre pro-apoptotik Bax ve efektör protein bölünmüş kaspaz 3 miktarındaki artışlar ve anti-apoptotik Bcl-2 miktarındaki azalma, KuB ve sisplatinin apoptotik yolağı uyardığını göstermektedir. Bu sonuçlarımız önceki çalışmaları desteklemektedir (Kausar ve diğerleri, 2013; Gupta ve Srivastava, 2014; El-Senduny ve diğerleri, 2016; Zhang ve diğerleri, 2017; Klungsaeng ve diğerleri, 2019). Ancak bölünmüş kaspaz 3 miktarı KuB grubunda en fazla artışı gösterirken kombine gruptaki artış daha az gerçekleşmiştir. Bu durum sisplatinin, kombine grupta apoptozu azaltıyormuş gibi bir etki gösterdiğini düşündürse de kombine grupta tümör küçülmesi daha fazla olmuştur. Dolayısıyla bu sonuç bize, KuB'nin hücre ölümünü kaspaz bağımsız bir yolak üzerinden gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Geçtiğimiz birkaç yılda, literatürde biriken kanıtlar, kaspazdan bağımsız programlanmış hücre ölümü yollarının varlığını desteklemektedir. Bu yollar, muhtemelen kusurlu hücrelerin organizmadan etkili bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlayan "ölüm yedek sistemleri" gibi davranmaktadır. Kaspaz-bağımlı programlanmış hücre ölümü olarak bilinen klasik apoptoza benzer şekilde, mitokondri, kaspaz bağımsız hücre ölümünün indüksiyonu için gerekli aşamaları düzenleyen ana organeldir. Ayrıca Bax gibi, pro-apoptotik proteinler, kaspaz bağımsız hücre ölüm yolağına katılmaktadır. Kaspaz bağımlı hücre ölümünün aksine, kaspaz bağımsız hücre ölüm yolağı; katepsinleri, kalpainleri ve serin proteazları içeren kaspazlar dışındaki uygulayıcıları içerir. Apoptoz indükleyici faktör (AIF) proteini kaspaz bağımsız hücre ölümünün indüksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Constantinou ve diğerleri, 2009). Bcl-2/Bax arasındaki ilişki kaspaz bağımlı hücre ölümünde olduğu gibi kaspaz bağımsız hücre ölümünde de mitokondrial yolak üzerinden etki göstermektedir. Bax, kaspaz bağımlı hücre ölümünde olduğu gibi kaspaz bağımlı hücre ölümünde de mitokondri membran bütünlüğünü ve potansiyelini bozarak; AIF ve Endonükleaz (Endo G) gibi pro-apoptotik proteinlerin mitokondri membranlar arası boşluktan önce sitoplazmaya daha sonra çekirdeğe geçişine neden olmaktadır.

Bu pro-apoptotik proteinler kaspazdan bağımsız olarak DNA kondensasyonu ve fragmentasyonuna neden olarak kaspaz bağımsız ölüme neden olabilmektedirler (Sun ve diğerleri, 2014). Başka bir çalışmada, KuB uygulamasına bağlı olarak kolanjiyokarsinom hücrelerinin sitozolünde AIF salınımının gerçekleştiği gösterilmiştir (Klungsaeng ve diğerleri, 2019). Zhang ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada, kanser hücresindeki STAT3 ifadesine bağlı olarak KuB'nin kaspaz aktivasyonunu gerçekleştirirmeden otofajik hücre ölümünü uyardığını göstermişlerdir. Bu çalışmada, otofajinin inhibisyonuyla otofajik hücre ölümünden apoptotik hücre ölümüne geçişin gerçekleştiğini bildirmişlerdir (Zhang ve diğerleri, 2012). KuB'nin, otofaji ve apoptoz arasındaki dengeyi düzenleyen bir anti-kanser ilacı olabileceğini ileri sürülmüştür (Zhang ve diğerleri, 2012). Bulgularımızda bu sonucu desteklemektedir.

Otofaji, makromoleküller ve organeller de dahil olmak üzere hasarlı sitoplazmik bileşenlerin yıkıldığı ve daha sonrasında geri dönüştürerek hücresel homeostazın korunmasında önemli bir rol oynar (Li ve diğerleri, 2019). Otofaji, hem benzersiz bir hücre ölümü yolağı hem de tümör hücrelerinin hayatta kalmasını destekleyen strese karşı bir adaptasyon mekanizması olarak karakterize edilmiştir (Mukhopadhyay ve diğerleri, 2014). Bu nedenle, otofaji, kanser gelişimi ve tedavi tasarımında "iki ucu keskin kılıç" olarak tanımlanmıştır (Huang ve diğerleri, 2020). Kanser gelişiminin ilk aşamalarında, otofaji, genom bütünlüğünü koruyarak, tümör baskılamasında önemli bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, kanserin oluşumundan sonra, kanser hücreleri, olumsuz koşullardaki streslerden kurtulmak için otofajiyi kullanabilmektedirler. Anti-kanser tedavisinin neden olduğu hücresel koruyucu otofaji, kanser hücreleri arasındaki tedavi direncinde önemli bir rol oynamaktadır. Hücre koruyucu özelliğinin yanısıra otofajinin tek başına veya apoptoz ile bağlantılı olarak hücre ölümünü kolaylaştırabilen, sitotoksik özelliği de bulunmaktadır (Li ve diğerleri, 2019). Otofaji, kanser tedavisi de dahil olmak üzere çeşitli çevresel streslere yanıt olarak hayatta kalma mekanizması olarak hizmet ettiği ve otofaji inhibisyonun terapötik yanıtı güçlendirmek için kullanılabileceği bilinmektedir. Bununla birlikte, otofajinin farklı bir hücre ölüm yolağı olarak da hareket edebileceğini, ancak yalnızca kanser hücrelerinin apoptoza giremediği belirli koşullarda gerçekleştiğini gösteren önemli kanıtlar da vardır (Sun ve diğerleri, 2019). Otofaji, birçok hücre içi sinyal yolağı, özellikle de besin algılama

mekanizmaları ve hücre ölümü sinyal olayları ile karmaşık bir şekilde bağlantılıdır (Sun ve diğerleri, 2019). Dolayısıyla otofajinin yalnızca hücre ölümünü aktive etmek ve engellemekle kalmaz, aynı zamanda hücre ölüm mekanizmaları arasındaki geçişi de kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte, birçok soru araştırılmaktadır: hangi tümörler ve genetik arka plan otofaji inhibisyonuna en duyarlıdır ve hangi tedaviler otofaji inhibitörleriyle birleştirilmelidir. Ayrıca, kanser hücreleri seçici baskı altında olduklarından ve özellikle tedaviden sonra adaptasyona eğilimli olduklarından, hücrelerin otofaji inhibisyonuna adapte olup olmadıkları ve oldular ise nasıl adapte oldukları açık değildir (Towers ve diğerleri, 2020). Bu nedenle, kanser tedavisi ile otofaji arasındaki etkileşimin daha iyi anlaşılması ve kanser hücrelerini öldürmek için otofajik süreci manipüle etmeye yönelik spesifik girişimler vazgeçilmezdir (Sun ve diğerleri, 2019).

Diğer kanserlere benzer şekilde, otofajinin mesane kanserindeki etkisi tartışmalıdır (Huang ve diğerleri, 2020). Otofaji, kemoterapi direncinde önemli bir faktör iken, otofajinin aşırı uyarılması otofajik hücre ölümüne neden olabilmektedir. Bazı anti-kanser ajanları, otofaji aktivasyonu aracılığı ile kanser hücrelerinin proliferasyonunu azaltmaktadır. Kanser tedavilerinde apoptotik yol, tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında birincil hedeftir, ancak bu yol genellikle tümör hücrelerinde bozulur, bu da ilaç direnci gelişimi ve tümör agresifliği ile sonuçlanmaktadır (Kalai Selvi ve diğerleri, 2017). Otofaji, apoptoz direncine karşı alternatif bir hedeftir. Çeşitli çalışmalar, otofajinin mesane kanserinde hücre ölümünden sorumlu olduğunu göstermiştir (Peng ve diğerleri, 2017; Jin ve diğerleri, 2020; Zhang ve diğerleri, 2020).

Otofajinin sisplatinin direncindeki rolü tartışmalıdır. Otofaji artışı bazı kanser türlerinde sisplatin direnci ile ilişkiliyken (Wang ve Wu, 2014; Wu ve diğerleri, 2015) diğer kanserlerde sisplatine karşı yanıtın artışından ve hücre ölümünden sorumludur (Li ve diğerleri, 2014; Washington ve diğerleri, 2015; Wang ve diğerleri, 2016).

Otofajinin mesane kanserinde sisplatin direnci üzerinde olumlu bir rol sergilediğini gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (Li ve diğerleri, 2013,2014; Hsin ve diğerleri, 2016; Chen ve diğerleri, 2018). Bu çalışmaların aksine sisplatin

tedavisinin koruyucu otofajiyi aktive ettiği ve apoptozu sınırladığı gösterilmiştir (Ojha ve diğerleri, 2014; Liao ve diğerleri, 2016; Lin ve diğerleri, 2017; Yu ve diğerleri, 2019).

Beklin-1, kanserle ilişkili olduğu gösterilen ilk otofaji genidir. Spontan tümör gelişmeleri Beklin-1 eksikliği olan BECN1 +/- fare modellerinde gösterilmiştir (Yue ve diğerleri, 2003, Qu ve diğerleri, 2003). Aynı zamanda Beklin-1 delesyonları çeşitli insan kanserlerinde tanımlanmıştır (Ding ve diğerleri, 2008; Li ve diğerleri, 2020). Bu kanserlerde, Beklin-1'in azalmış ifade seviyeleri, otofajinin tümör baskılayıcı özelliği ile ilişkilendirilmiştir. Ancak bazı kanserlerde Beklin-1 ifadelerinin arttığı da gösterilmiştir (Ahn ve diğerleri, 2007; Li ve diğerleri, 2020). Bu kanserlerde ise beklin-1'in tümör oluşumunda rol oynadığı düşünülmüştür (Li ve diğerleri, 2020). Liu ve arkadaşları (2013), Beklin-1 ifadelerini 147 mesane kanseri hastasında araştırmış ve Beklin-1 ifadesinin, mesane tümörünün klinikopatolojik özellikleri ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Beklin-1 ifadesindeki azalmaların, mesane kanserinin artmış histolojik dereceleri ve klinik aşamaları ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır (Liu ve diğerleri, 2013). Başpınar ve arkadaşları (2013), Beklin-1 ve Bcl-2 ifadeleri ile klinik parametreler arasındaki ilişkiyi 84 mesane tümöründe ve 10 kontrol dokuda değerlendirmiştir. Beklin-1 protein ifadesi ile mesane kanseri yüksek histolojik dereceler ve pT evreleri arasında negatif ilişki bulmuşlardır. Aksine, Bcl-2 ifadesindeki artışın tümör evreleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca mesane tümörlerinde Beklin-1 ve Bcl-2 ifadelerinin birbirleriyle ters ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Baspınar ve diğerleri, 2013).

ATG8/LC3 ailesi proteinleri, lipidasyon olarak adlandırılan bir süreçte membran lipidi PE'nin baş grubuna bağlanan evrimsel olarak korunmuş ubikuitin benzeri düzenleyicidirler. LC3 lipidasyonu (LC3II oluşumu), bu proteinlerin otofagozom oluşumunda, otofagozomların lizozomlarla füzyonunda ve kargo seçiminde yer aldığı otofajinin ayırt edici bir özelliğidir. LC3II, otofagozom membranlarına bağlandığı için otofajik vezikülleri diğer hücre zarlarından ayıran en iyi belirteç kabul edilmektedir (Lopez ve diğerleri, 2018; Martens ve Fracchiolla, 2020). Western blot ile LC3 lipidasyonunun ölçülmesi, otofajiyi izlemek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Lopez ve diğerleri, 2018).

KuB'nin; B16F10 (Ouyang ve diğeri, 2011), Hela (Zhang ve diğeri, 2012), Jurkat (Zhu ve diğeri, 2012), MCF7 (Ren ve diğeri, 2015) ve SGC7901 (Liu ve diğeri, 2017) gibi çeşitli hücre hatlarında otofaji uyardığı gösterilmiştir.

Bazı kanser hücre hatlarında, KuB tarafından üretilen reaktif oksijen türleri otofajiye neden olurken (Zhang ve diğeri, 2012; Ren ve diğeri, 2015; Niu ve diğeri, 2016), KuB'nin sisplatine dirençli mide kanseri hücre hattında mTORC1 inhibisyonu ile otofaji aktive ettiği bildirilmiştir (Liu ve diğeri, 2017). Bu çalışmalarda otofaji; temel otofaji proteinleri olan Beklin-1 ve LC3II miktarındaki artışa göre değerlendirilmiştir.

Western blot sonuçlarımıza göre LC3II ve Beklin-1 miktarındaki artış tüm tedavi gruplarında otofajinin uyarıldığını göstermektedir. Bu sonuçlarımız, KuB'nin otofaji uyardığını gösteren önceki çalışmaları desteklemektedir. LC3II miktarındaki artış en fazla KuB grubunda olurken en az artış kombine grupta olmuştur. Bu sonuçlara göre otofajinin en fazla KuB ile tedavi edilen grupta gerçekleştiği görülmektedir. Ancak ilginç bir şekilde Beklin-1 ifadesi de tüm tedavi gruplarında artarken özellikle kombine grupta önemli bir artış (yaklaşık 13 kat) göstermiştir. Yani Beklin-1 ile LC3II miktarlarındaki artış birbirleriyle bağlantılı değildir.

Literatürde olağan olmayan otofaji (non-canonical) olarak bilinen ve Beklin-1 den bağımsız olarak otofagozom oluşumunun olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu otofaji türünün her zaman hücre ölümüyle ilişkili olduğu kanıtlar vardır (Sun ve diğeri, 2015; Athamneh ve diğeri, 2017). İlaç uyarımına bağlı olarak otofajinin gerçekleştiği bazı hücrelerde Beklin-1 ile LC3 ifadesinin birbirinden bağımsız olduğu çeşitli çalışmalarda da gösterilmiştir (Sun ve diğeri, 2015; Kalai Selvi ve diğeri, 2017; Athamneh ve diğeri, 2017). İlaça karşı farklı yollar üzerinden otofajinin uyarılmasının hücreye özgü olduğu düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda da, Beklin-1 ve LC3II ifade miktarları arasında korelasyonunun olmaması, oluşturduğumuz MB49 fare singeneik mesane kanseri modelinde, KuB'nin farklı yollardan otofaji uyarabileceğini göstermektedir. Verilerimiz, KuB'nin anti-proliferatif mekanizmalarının dokuya veya hücreye özgü olabileceğini doğrulamaktadır (Shang ve diğeri, 2014).

Otofajinin uyarılması ve başlangıç aşamaları, hücredeki besin ve enerji değişimlerini algılayan mTORC1, AMPK ve AKT kinazları tarafından düzenlenmektedir. AMPK hücredeki düşük enerji miktarını algılayarak ATP üretimi sağlayacak katabolik sürece geçişi uyarır. AMPK, mTOR kinazı inhibe ederek otofajiyi uyarmaktadır. Besin durumu için bir diğer önemli girdi, hücre dışı büyüme faktörlerinin varlığıdır. Bir serin treonin kinaz olan AKT, sinyal iletimi esnasında plazma membranındaki aktif büyüme faktörü reseptörlerine dahil olur ve aşağı yöndeki akış kaskadını başlatır. AKT fosforilasyonu mTORC1'i aktive eder ve otofajiyi inhibe eder. AKT ayrıca, PI3K kompleksinin bileşenleri de dahil olmak üzere anahtar otofaji proteinlerinin doğrudan fosforilasyonu ile mTOR'dan bağımsız yollarla otofajiyi baskılamaktadır (Hill ve diğerleri, 2019). PI3K/AKT/mTOR yolağının aşırı aktivasyonun tümör gelişimi ile ilişkisi diğer birçok kanserde olduğu gibi mesane kanserinde de çok iyi tanımlanmıştır. Mesane tümörlerinin yaklaşık %40'ında bu yolağın sürekli aktivasyonuna sebep olan mutasyonlar görülmektedir. Bu yolak hücre dışı sinyaller ile uyarılmasına bağlı olarak; hücre çoğalması, farklılaşma, anjiyogenez gibi olayları kontrol eden ve mesane kanserinin gelişiminde rol oynayan diğer sinyal yollarıyla ilişkilendirilmiştir (Liu ve diğerleri, 2018). Fosfo-mTOR (p-mTOR) miktarındaki artış mesane kanserinin invaziv formlarında gösterilmiştir (Wu ve diğerleri, 2012). Aynı zamanda p-mTOR yoğunluğu, mesane kanserinde azalan sağ kalım ile ilişkilidir. PI3K yolağının, mesane kanserinde hücre büyümesi, sağ kalım, apoptozu düzenleyen temel bir yoldur ve AKT bu yolağın merkezinde yer almaktadır. PTEN, mesane tümör gelişiminin baskılanmasında kritik bir rol oynar (Platt ve diğerleri, 2009). PI3K/AKT yolağı; otofaji ve apoptoz yollarıyla yakından ilişkilidir (Yang ve diğerleri, 2013). Diğer çalışmalarla (Ma ve diğerleri, 2014; Ren ve diğerleri, 2015; Niu ve diğerleri, 2016; Khan ve diğerleri, 2017; Liu ve diğerleri, 2017) uyumlu olarak çalışmamızda, KuB'nin p-mTOR ve p-Akt seviyelerinde düşüşe; p-AMPK seviyesinde ise artışa sebep olduğunu gösterdik. Bu sonuçlar, PI3K/AKT/mTOR yolağının KuB'nin, hedef yollarından biri olduğunu ve aynı zamanda KuB aracılı otofajinin yine bu yolak ile ilişkili olabileceğini göstermektedir.

BAD; Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik bir üyesidir. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinine bağlanarak Bcl-2/BAX kompleksinden BAX'ın ayrılıp apoptozu uyarmasını sağlamaktadır. BAD'ın ser-112 fosforilasyonu bu proteinin 14-3-3 protein

tarafından sitoplazmada tutulmasına ve Bcl-2' ye bağlanmasını engellemektedir. Dolayısıyla ser-112 fosforilasyonu; BAD'ın pro-apoptotik etkisini inhibe etmektedir. Ayrıca p-BAD yüzdesinin çeşitli kanser hücrelerinde yüksek olduğu bulunmuştur (Stickles ve diğerleri, 2015). Tüm tedavi gruplarımızda fosforile BAD miktarı azalma gösterirken özellikle kombine grupta kontrol grubuna göre yaklaşık 5 kat azalma görülmüştür. Özellikle KuB ve kombine gruplarında BAD fosforilasyonundaki azalma, apoptotik yolağın uyarılabileceğini göstermektedir. KuB uygulamasına bağlı olarak BAD fosforilasyonunun azaldığını gösteren başka bir çalışma yoktur. Dolayısıyla bu bulgumuz ilk defa gösterilmesi açısından önemlidir.

C-Raf, hücre dışı sinyallerin reseptör tirozin kinazlardan çekirdeğe taşınmasına aracılık eden Raf ailesi protein kinazlarının 3 izoformundan biridir. c-Raf hücre; çoğalması, sağ kalım ve apoptoz gibi hücreyel olayları etkileyen bir serin threonin kinazdır. Raf'ın aktivasyonu, hücre büyümesini ve hayatta kalmayı doğrudan desteklemektedir (Chan ve diğerleri, 2010a). Literatürde KuB uygulamasına bağlı olarak c-Raf fosforilasyonunun azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur. Dolayısıyla KuB'nin RAF/MEK/ERK yolağı üzerinden anti-kanser özelliği gösterdiği ileri sürülmüştür (Chan ve diğerleri, 2010a, 2010b). Bununla birlikte, KuB uygulanan BEL-7402 hücrelerinde, c-Raf fosforilasyonu azalırken; c-Raf'ın aşağı yönündeki hedefi olan ERK1/2'nin fosforilasyonu önemli ölçüde artmıştır. BEL-7402 hücrelerinde ERK1/2'nin aktivasyonu ve c-Raf'ın baskılanması, KuB'nin c-Raf'tan bağımsız olarak ERK1/2'yi düzenleyebileceğini ve hücre büyümesinin durmasını indükleyebileceğini göstermektedir. C-Raf ve ERK1/2 arasındaki fosforilasyon durumundaki tutarsızlık, sinyal yolları arasındaki etkileşimden kaynaklanıyor olabilmektedir (Chan ve diğerleri, 2010b). Çalışmamızda, KuB'nin verildiği tedavi grubunda kontrol grubuna göre önemli ölçüde c-Raf fosforilasyonu azalmıştır. Bu sonucumuz KuB tedavisi ile c-Raf fosforilasyonunun azaldığı iki çalışmanın da bulgularını desteklemektedir (Chan ve diğerleri, 2010a, 2010b). Iwanski ve arkadaşları (2010), KuB uygulanmış pankreas kanseri hücrelerinde c-RAF fosforilasyon miktarında bir değişim bulmamışlardır. Bu durum, KuB'nin pankreas kanseri hücreleri üzerindeki inhibe edici etkisi için bu yolağa ihtiyaç duymadığını göstermektedir.

En çok çalışılan MAPK kaskadı olan ERK'nın hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Zheng ve diğerleri, 2014). ERK yolağının hücre sağkalımını ve hücre çoğalmasını uyardığı bilinmesine rağmen, belirli koşullar altında apoptotik yolağı aktive edici etkiye sahip olabilmektedir (Liu ve diğerleri, 2008). Bununla birlikte, çeşitli çalışmalar, KuB aracılı ERK1/2 fosforilasyonunun hücre tipine bağlı olarak farklı çift yönlü etkiye sahip olduğunu göstermiştir (El-Senduny ve diğerleri, 2016). Bazı çalışmalarda KuB'nin, ERK fosforilasyonunu azalttığı bulunurken (Chan ve diğerleri, 2010a; Gupta ve Srivastava, 2014; Zheng ve diğerleri, 2014; Zhang ve diğerleri, 2017; Ding ve diğerleri, 2017; Liu ve diğerleri, 2019) diğer bazı çalışmalarda ise ERK fosforilasyonunu arttırdığı rapor edilmiştir (Liu ve diğerleri, 2008; Chan ve diğerleri, 2010b; Kim ve diğerleri, 2017; Zhou ve diğerleri, 2017). Sonuçlarımıza göre sisplatin, ERK1/2 fosforilasyonunu etkilemezken; KuB, ERK fosforilasyonunu önemli ölçüde azaltmıştır ancak en fazla azalma kombine grupta olmuştur. Bizim sonuçlarımız KuB'nin ERK fosforilasyonunu azalttığını gösteren çalışmalar ile uyumludur. Sonuçlarımızdan farklı olarak KuB ve sisplatinin birlikte araştırıldığı başka bir çalışmada, KuB'nin sisplatin ile kombinasyonu, tekli uygulamalara kıyasla farklılık göstermiştir (Senduny ve diğerleri, 2016). Bu çalışmada KuB, aracılı ERK1/2 fosforilasyonundaki artışın apoptozu uyardığı ardından hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. KuB, sisplatin ile beraber uygulandığı zaman sisplatinin, apoptoz indüksiyonuna yol açan ERK1/2'nin fosforilasyonu üzerinde inhibe edici bir etki gösterdiği bulunmuştur (El-Senduny ve diğerleri, 2016). Bu durumun daha önce belirtilen ERK1/2 nin anti-apoptotik ve pro-apoptotik etki göstermesinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir.

Literatürdeki çalışmalarda genel olarak KuB'nin AKT fosforilasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Gupta ve Srivastava, 2014; Shang ve diğerleri, 2014; Khan ve diğerleri, 2017; Qin ve diğerleri, 2018; Liu ve diğerleri, 2019). Diğer çalışmalardan farklı olarak Ma ve arkadaşları (2014) çalışmalarında KuB uygulamasının ERK ve mTOR fosforilasyonunu azaltırken; AKT fosforilasyonunu arttığını bulmuşlardır (Ma ve diğerleri, 2014). KuB uygulaması ile gerçekleşen mTOR inhibisyonunun, AKT aktivasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir. mTOR; farklı sinyal yolları ile ilişkili iki çok proteinli kompleks (mTORC1 ve mTORC2) tarafından oluşmaktadır. MTORC1'in baskılanması, doğrudan mTORC2'nin aktivitesini

artırarak fosforilasyon ile Akt aktivasyonuna yol açabilmektedir (Ma ve diğerleri, 2014). Ayrıca bu sonuçlar MAPK yolağının, PI3K/AKT yolağı ile yakından bağlı olduğunu göstermektedir.

AKT fosforilasyonu, PTEN dahil birkaç fosfataz tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Shang ve diğerleri, 2014). Shang ve arkadaşları (2014), KuB tedavisinin, tümör baskılayıcı PTEN'in ifadesini artırarak AKT yolağını inhibe ettiğini bildirmiştir (Shang ve diğerleri, 2014), Niu ve arkadaşları (2016) ise KuB'nin BEL-7402 hücrelerinde PTEN fosforilasyonunu artırdığını bulmuşlardır (Niu ve diğerleri, 2016). Sonuçlarımıza göre tedavi grupları ile kontrol grubu arasında PTEN fosforilasyon seviyeleri açısından önemli fark bulunmamıştır. Şaşırtıcı bir şekilde, 4E-BP1, GSK3a, GSK3b, P53, P70S6K, PDK1, RPS6, RSK1 ve RSK2 fosforile seviyeleri, tedavi edilen grupların hiçbirinde önemli ölçüde değişmemiştir. Bu durum bu genlerin, KuB ve sisplatinin hedefleri olmayabileceğini düşündürmektedir.

Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü p27, hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayan temel bir düzenleyici proteindir. p27, siklin-siklin bağımlı kinaz kompleksini inhibe ederek G1 fazındaki hücre döngüsünü durdurmaktadır (Shang ve diğerleri, 2014; Sun ve diğerleri, 2016; Xie ve diğerleri, 2016). p27'nin 198-Treoninden fosforilasyonu, bu proteinin hücre döngüsünün G1 fazında çekirdekten sitoplazmaya taşınmasına ve proteazom yolu tarafından yıkımına yol açar. p27 proteinin degradasyonu, hücre döngüsünün ilerlemesini tetiklemektedir. Bu durum, p27'nin tümör baskılayıcı özellikten onkojenik özelliğe geçişine neden olmaktadır (Sun ve diğerleri, 2016; Yoon ve diğerleri, 2019). Bazı çalışmalarda; KuB'nin p27 ifadesini arttırdığı dolayısıyla kanser hücrelerinde hücre döngüsünü G1 evresinde durdurduğu gösterilmiştir (Shang ve diğerleri, 2014; Xie ve diğerleri, 2016). Ancak p27 fosforilasyonu bu çalışmalarda değerlendirilmemiştir. Çalışmamızda p27 fosforilasyonun özellikle KuB grubunda önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Bu sonuç KuB'nin anti-kansirojen özelliğine farklı bir bakış açısı kazandıracaktır.

PRAS40, mTOR kompleks 1'in bir bileşenidir ve mTOR aktivasyonundan sorumludur. AKT substati olan PRAS40'ın, aktivasyonu bu proteinin fosforilasyonu ile düzenlenmektedir ve aşırı PRAS40 fosforilasyonunun birçok kanserle ilişkisi

gösterilmiştir (Lv ve diğerleri, 2017). AKT, PRAS40'ı fosforile ederek mTOR üzerindeki inhibe edici etkisini azaltmaktadır. PI3K/AKT ve AMPK yolları PRAS40 üzerinde kesişmektedir. PRAS40'ın treonin 246'dan AKT tarafından fosforilasyonu ve AMPK tarafından de-fosforilasyonu, mTOR aktivitesi üzerinden hücre büyümesini ve otofaji arasındaki ilişkiyi düzenlemektedir (Lu ve diğerleri, 2014). Khan ve ekibi (2017), KuB uygulanan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde, PRAS40 fosforilasyonunun azaldığını göstermişlerdir (Khan, ve diğerleri, 2017). Bu çalışmayı destekleyecek şekilde bizim verilerimize göre de KuB, PRAS40 fosforilasyonun kontrol grubuna göre yarı yarıya azaltmıştır.

Hayvan modellerinde potansiyel kemopreventif ajanların *in vivo* etkinliğinin gösterilmesi, bunların klinik gelişimleri için gerekmektedir (Gao ve diğerleri, 2014). Çeşitli kanser hücre hatları ile oluşturulan ksenograft modellerde KuB'nin hem tek olarak hem de kemoterapötik ajanlarla birlikte tümör büyümesini önemli oranlarda engellediği gösterilmiştir (Thoennissen ve diğerleri, 2009; Iwanski ve diğerleri, 2010; Aribi ve diğerleri, 2013; Ding ve diğerleri, 2017).

KuB'nin; küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hattı H1299 (Kausar ve diğerleri, 2013), pankreas kanseri hücre hattı Panc-1 (Thoennissen ve diğerleri, 2009; Iwanski ve diğerleri, 2010), hepatosellüler karsinom hücre hattı BEL-7402 (Chan ve diğerleri, 2010b), prostat kanseri hücre hattı PC-3 (Gao ve diğerleri, 2014), meme kanseri hücre hattı MDA-MB-231 (Luo ve diğerleri, 2018), kolon kanseri hücre hattı HCT116 (Dandawate ve diğerleri, 2020) ve mide kanseri hücre hattı SGC7901 (Xu ve diğerleri, 2020) içeren birçok ksenograft fare modelinde tümör gelişimini engellediği bildirilmiştir.

In vivo deneylerimiz de KuB ve sisplatin arasındaki sinerjik anti-tümör etkiyi doğrulamıştır. MB49 hücrelerini kullanarak oluşturduğumuz subkutan fare modelinde KuB ve sisplatin uygulamaları, kilo kaybına veya başka herhangi bir yan etkiye neden olmadan tümör büyümesini önemli ölçüde inhibe etmiştir.

KuB nin 1 mg/kg olarak kullandığı; MDA-MB-231 meme kanseri (Wakimoto ve diğerleri, 2008), Panc-1 pankreas kanseri (Thoennissen ve diğerleri, 2009; Iwanski ve diğerleri, 2010), H1299 küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (Kausar ve

diğerleri, 2013), 4T-1 meme kanseri (Gupta ve Srivastava, 2014) ksenogreft fare modellerinde, tümör inhibisyon oranları sırasıyla %39, %69,2, %55 ve %70 olduğu bulunmuştur. Bu çalışmalarla uyumlu olarak, bizim çalışmamızda KuB, tümör gelişimini yaklaşık % 62 oranında engellemiştir. Bu oran KuB'nin sisplatin ile birlikte uyguladığı tedavi grubunda %77'ye çıkmıştır. Bu sonuçlar KuB'nin, belirgin toksisite olmaksızın, ksenograft mesane kanseri hücrelerini sisplatine duyarlı hale getirdiğini göstermektedir. KuB ve sisplatinin kombine uygulamaları, daha önceki çalışmalarda *in vitro* düzeyde araştırılmıştır. Çalışmamız, KuB ve sisplatinin *in vivo* modelde araştırıldığı ilk çalışmadır.





6.SONUÇ VE ÖNERİLER

On yıllardır sisplatini içeren kombine tedaviler mesane kanserinin tedavisinin temelini oluşturmalarına rağmen, gelişen ilaç direnci ve toksik etkiler nedeniyle hasta sağ kalım oranı oldukça düşüktür. Doğal ürünlerin kemoterapötik ajanlarla birlikte uygulanması, dirençli hücrelerin platin bazlı bileşiklere duyarlı hale getirilmesine yönelik potansiyel bir terapötik yaklaşım olarak araştırılmaktadır.

Bu nedenle mevcut araştırmamız, KuB ile kombinasyon terapisi yoluyla sisplatinin terapötik etkinliğini artırmaya yöneliktir.

Çalışmamızda mesane kanserine karşı bu iki ajan arasındaki sinerjik etki ilk kez gösterilmiştir. KuB ve sisplatin kombinasyonu, MB49 hücrelerinde apoptoz ve otofaji yollarını aktive ederek bu hücrelere karşı kuvvetli anti-proliferatif etki göstermiştir. Verilerimiz, KuB'nin, sisplatin doz gereksinimini azaltmaya yardımcı olduğunu, bunun da sisplatin kaynaklı toksisite ve ilaç direncinin azaltılmasına katkı sağlayacağını göstermektedir. Aynı zamanda bu iki ajanın birlikte uygulandığı tümör gruplarında herhangi bir toksisite olmaksızın tümör gelişimi önemli ölçüde engellenmiştir.

Özetle, çalışmamız, KuB'nin tek başına ve sisplatin ile kombine edildiğinde, mesane kanseri tümör dokularında kaspaz-bağımlı/bağımsız apoptotik ve otofajik yollar yoluyla tümör büyümesini önemli ölçüde azalttığını gösteren ilk ve öncü çalışmadır. Bu bağlamda, KuB aracılı hücre ölümünün altında yatan moleküler mekanizmalara yeni bakış açısı sağlayacaktır.

Sonuçlarımızın daha ileri klinik araştırmalar ve mesane kanseri için geleneksel tedavileri destekleyebilecek yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için önemli etkileri olacaktır. Gelecekteki çalışmalarda, mesane kanserinin tedavisi için KuB tarafından hedeflenen moleküler yollar araştırılmalıdır.



KAYNAKLAR

- Ahn, C. H., Jeong, E. G., Lee, J. W., Kim, M. S., Kim, S. H., Kim, S. S., Yoo, N. J., & Lee, S. H. (2007). Expression of beclin-1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, 115(12), 1344–1349.
- Alifrangis, C., McGovern, U., Freeman, A., Powles, T., & Linch, M. (2019). Molecular and histopathology directed therapy for advanced bladder cancer. *Nature Reviews. Urology*, 16(8), 465–483.
- Arantes-Rodrigues, R., Colaço, A., Pinto-Leite, R., & Oliveira, P. A. (2013). In vitro and in vivo experimental models as tools to investigate the efficacy of antineoplastic drugs on urinary bladder cancer. *Anticancer Research*, 33(4), 1273–1296.
- Aribi, A., Gery, S., Lee, D. H., Thoennissen, N. H., Thoennissen, G. B., Alvarez, R., Ho, Q., Lee, K., Doan, N. B., Chan, K. T., Toh, M., Said, J. W., & Koeffler, H. P. (2013). The triterpenoid cucurbitacin B augments the antiproliferative activity of chemotherapy in human breast cancer. *International Journal of Cancer*, 132(12), 2730–2737.
- Athamneh, K., Hasasna, H. E., Samri, H. A., Attoub, S., Arafat, K., Benhalilou, N., Rashedi, A. A., Dhaheri, Y. A., AbuQamar, S., Eid, A., & Iratni, R. (2017). Rhus coriaria increases protein ubiquitination, proteasomal degradation and triggers non-canonical Beclin-1-independent autophagy and apoptotic cell death in colon cancer cells. *Scientific Reports*, 7(1), 11633.
- Audenet, F., Attalla, K., & Sfakianos, J. P. (2018). The evolution of bladder cancer genomics: What have we learned and how can we use it?. *Urologic Oncology*, 36(7), 313–320.
- Ávalos, Y., Canales, J., Bravo-Sagua, R., Criollo, A., Lavandero, S., & Quest, A. F. (2014). Tumor suppression and promotion by autophagy. *BioMed Research International*, 2014, 603980.
- Babjuk, M., Burger, M., Compérat, E. M., Gontero, P., Mostafid, A. H., Palou, J., van Rhijn, B., Rouprêt, M., Shariat, S. F., Sylvester, R., Zigeuner, R., Capoun, O., Cohen, D., Escrig, J., Hernández, V., Peyronnet, B., Seisen, T., & Soukup, V. (2019). European Association of Urology Guidelines on Non-muscle-invasive Bladder Cancer (TaT1 and Carcinoma In Situ) - 2019 Update. *European Urology*, 76(5), 639–657.
- Baspinar, S., Bircan, S., Yavuz, G., & Kapucuoglu, N. (2013). Beclin 1 and bcl-2 expressions in bladder urothelial tumors and their association with clinicopathological parameters. *Pathology, Research and Practice*, 209(7), 418–423.
- Batista, R., Vinagre, N., Meireles, S., Vinagre, J., Prazeres, H., Leão, R., Máximo, V., & Soares, P. (2020). Biomarkers for Bladder Cancer Diagnosis and

- Surveillance: A Comprehensive Review. *Diagnostics* (Basel, Switzerland), 10(1), 39.
- Bertz, S., Eckstein, M., Stoeher, R., Weyerer, V., Hartmann, A. (2017). Urothelial bladder cancer: An update on molecular pathology with clinical implications. *European Urology Supplements*, 12, pp. 272-294.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
- Chade, D. C., Andrade, P. M., Borra, R. C., Leite, K. R., Andrade, E., Villanova, F. E., & Srougi, M. (2008). Histopathological characterization of a syngeneic orthotopic murine bladder cancer model. *International Brazilian Journal of Urology: Official Journal of the Brazilian Society of Urology*, 34(2), 220–229.
- Chan, K. T., Li, K., Liu, S. L., Chu, K. H., Toh, M., & Xie, W. D. (2010). Cucurbitacin B inhibits STAT3 and the Raf/MEK/ERK pathway in leukemia cell line K562. *Cancer Letters*, 289(1), 46–52.
- Chan, K. T., Meng, F. Y., Li, Q., Ho, C. Y., Lam, T. S., To, Y., Lee, W. H., Li, M., Chu, K. H., & Toh, M. (2010). Cucurbitacin B induces apoptosis and S phase cell cycle arrest in BEL-7402 human hepatocellular carcinoma cells and is effective via oral administration. *Cancer Letters*, 294(1), 118–124.
- Chan, Y. Y., Sandlin, S. K., Kurzrock, E. A., & Osborn, S. L. (2017). The Current Use of Stem Cells in Bladder Tissue Regeneration and Bioengineering. *Biomedicines*, 5(1), 4.
- Chandrasekar, T., Erlich, A., & Zlotta, A. R. (2018). Molecular Characterization of Bladder Cancer. *Current Urology Reports*, 19(12), 107.
- Chen, C. H., Changou, C. A., Hsieh, T. H., Lee, Y. C., Chu, C. Y., Hsu, K. C., Wang, H. C., Lin, Y. C., Lo, Y. N., Liu, Y. R., Liou, J. P., & Yen, Y. (2018). Dual Inhibition of PIK3C3 and FGFR as a New Therapeutic Approach to Treat Bladder Cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 24(5), 1176–1189.
- Chen, W., Leiter, A., Yin, D., Meiring, M., Louw, V. J., & Koeffler, H. P. (2010). Cucurbitacin B inhibits growth, arrests the cell cycle, and potentiates antiproliferative efficacy of cisplatin in cutaneous squamous cell carcinoma cell lines. *International Journal of Oncology*, 37(3), 737–743.
- Choi, W., Porten, S., Kim, S., Willis, D., Plimack, E. R., Hoffman-Censits, J., Roth, B., Cheng, T., Tran, M., Lee, I. L., Melquist, J., Bondaruk, J., Majewski, T., Zhang, S., Pretzsch, S., Baggerly, K., Siefker-Radtke, A., Czerniak, B., Dinney, C. P., & McConkey, D. J. (2014). Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell*, 25(2), 152–165.

- Chulpanova, D. S., Kitaeva, K. V., Rutland, C. S., Rizvanov, A. A., & Solovyeva, V. V. (2020). Mouse Tumor Models for Advanced Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4118.
- Compérat, E. M., Burger, M., Gontero, P., Mostafid, A. H., Palou, J., Roupr  t, M., van Rhijn, B., Shariat, S. F., Sylvester, R. J., Zigeuner, R., & Babjuk, M. (2019). Grading of Urothelial Carcinoma and The New "World Health Organisation Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs 2016". *European Urology Focus*, 5(3), 457–466.
- Compérat, E., Varinot, J., Moroch, J., Eymerit-Morin, C., & Brimo, F. (2018). A practical guide to bladder cancer pathology. *Nature Reviews. Urology*, 15(3), 143–154.
- Constantinou, C., Papas, K. A., & Constantinou, A. I. (2009). Caspase-independent pathways of programmed cell death: the unraveling of new targets of cancer therapy?. *Current Cancer Drug Targets*, 9(6), 717–728.
- Dadhania, V., Zhang, M., Zhang, L., Bondaruk, J., Majewski, T., Siefker-Radtke, A., Guo, C. C., Dinney, C., Cogdell, D. E., Zhang, S., Lee, S., Lee, J. G., Weinstein, J. N., Baggerly, K., McConkey, D., & Czerniak, B. (2016). Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use. *EBioMedicine*, 12, 105–117.
- Damrauer, J. S., Hoadley, K. A., Chism, D. D., Fan, C., Tiganelli, C. J., Wobker, S. E., Yeh, J. J., Milowsky, M. I., Iyer, G., Parker, J. S., & Kim, W. Y. (2014). Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(8), 3110–3115.
- Dandawate, P., Subramaniam, D., Panovich, P., Standing, D., Krishnamachary, B., Kaushik, G., Thomas, S. M., Dhar, A., Weir, S. J., Jensen, R. A., & Anant, S. (2020). Cucurbitacin B and I inhibits colon cancer growth by targeting the Notch signaling pathway. *Scientific Reports*, 10(1), 1290.
- Dasari, S., & Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology*, 740, 364–378.
- Deng, S., Shanmugam, M. K., Kumar, A. P., Yap, C. T., Sethi, G., & Bishayee, A. (2019). Targeting autophagy using natural compounds for cancer prevention and therapy. *Cancer*, 125(8), 1228–1246.
- Deng, S., Shanmugam, M. K., Kumar, A. P., Yap, C. T., Sethi, G., & Bishayee, A. (2019). Targeting autophagy using natural compounds for cancer prevention and therapy. *Cancer*, 125(8), 1228–1246.
- Desilets, A., Adam, J. P., & Souli  res, D. (2020). Management of cisplatin-associated toxicities in bladder cancer patients. *Current Opinion in Supportive and Palliative Care*, 14(3), 286–292.

- Ding, J., Xu, D., Pan, C., Ye, M., Kang, J., Bai, Q., & Qi, J. (2014). Current animal models of bladder cancer: Awareness of translatability (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(3), 691–699.
- Ding, X., Chi, J., Yang, X., Hao, J., Liu, C., Zhu, C., Wang, X., Liu, X., Niu, Y., Ji, W., Chen, D., & Wu, X. (2017). Cucurbitacin B synergistically enhances the apoptosis-inducing effect of arsenic trioxide by inhibiting STAT3 phosphorylation in lymphoma Ramos cells. *Leukemia & Lymphoma*, 58(10), 2439–2451.
- Ding, Z. B., Shi, Y. H., Zhou, J., Qiu, S. J., Xu, Y., Dai, Z., Shi, G. M., Wang, X. Y., Ke, A. W., Wu, B., & Fan, J. (2008). Association of autophagy defect with a malignant phenotype and poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Cancer Research*, 68(22), 9167–9175.
- Dossou, A. S., & Basu, A. (2019). The Emerging Roles of mTORC1 in Macromanaging Autophagy. *Cancers*, 11(10), 1422.
- Drayton, R. M., & Catto, J. W. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance in bladder cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 12(2), 271–281.
- El-Senduny, F. F., Badria, F. A., El-Waseef, A. M., Chauhan, S. C., & Halaweish, F. (2016). Approach for chemosensitization of cisplatin-resistant ovarian cancer by cucurbitacin B. *Tumour Biology: the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(1), 685–698.
- Fabris, V. T., Lodillinsky, C., Pampena, M. B., Belgorosky, D., Lanari, C., & Eiján, A. M. (2012). Cytogenetic characterization of the murine bladder cancer model MB49 and the derived invasive line MB49-I. *Cancer Genetics*, 205(4), 168–176.
- Faiena, I., Rosser, C. J., Chamie, K., & Furuya, H. (2019). Diagnostic biomarkers in non-muscle invasive bladder cancer. *World Journal of Urology*, 37(10), 2009–2016.
- Felsenstein, K. M., & Theodorescu, D. (2018). Precision medicine for urothelial bladder cancer: update on tumour genomics and immunotherapy. *Nature Reviews. Urology*, 15(2), 92–111.
- Frentzel, J., Sorrentino, D., & Giuriato, S. (2017). Targeting Autophagy in ALK-Associated Cancers. *Cancers*, 9(12), 161.
- Gallagher, D. J., Milowsky, M. I., & Bajorin, D. F. (2008). Advanced bladder cancer: status of first-line chemotherapy and the search for active agents in the second-line setting. *Cancer*, 113(6), 1284–1293.
- Gao, Y., Islam, M. S., Tian, J., Lui, V. W., & Xiao, D. (2014). Inactivation of ATP citrate lyase by Cucurbitacin B: A bioactive compound from cucumber, inhibits prostate cancer growth. *Cancer Letters*, 349(1), 15–25.

- Garg, S., Kaul, S. C., & Wadhwa, R. (2018). Cucurbitacin B and cancer intervention: Chemistry, biology and mechanisms (Review). *International Journal of Oncology*, 52(1), 19–37.
- Gupta, P., & Srivastava, S. K. (2014). Inhibition of Integrin-HER2 signaling by Cucurbitacin B leads to in vitro and in vivo breast tumor growth suppression. *Oncotarget*, 5(7), 1812–1828.
- Hedegaard, J., Lamy, P., Nordentoft, I., Algaba, F., Høyer, S., Ulhøi, B. P., Vang, S., Reinert, T., Hermann, G. G., Mogensen, K., Thomsen, M., Nielsen, M. M., Marquez, M., Segersten, U., Aine, M., Höglund, M., Birkenkamp-Demtröder, K., Fristrup, N., Borre, M., Hartmann, A., ... Dyrskjød, L. (2016). Comprehensive Transcriptional Analysis of Early-Stage Urothelial Carcinoma. *Cancer Cell*, 30(1), 27–42.
- Hekman, M., Fischer, A., Wennogle, L. P., Wang, Y. K., Campbell, S. L., & Rapp, U. R. (2005). Novel C-Raf phosphorylation sites: serine 296 and 301 participate in Raf regulation. *The Federation of European Biochemical Societies Letters*, 579(2), 464–468.
- Hill, S. M., Wrobel, L., & Rubinsztein, D. C. (2019). Post-translational modifications of Beclin 1 provide multiple strategies for autophagy regulation. *Cell Death and Differentiation*, 26(4), 617–629.
- Hsin, I. L., Wang, S. C., Li, J. R., Ciou, T. C., Wu, C. H., Wu, H. M., & Ko, J. L. (2016). Immunomodulatory proteins FIP-gts and chloroquine induce caspase-independent cell death via autophagy for resensitizing cisplatin-resistant urothelial cancer cells. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 23(13), 1566–1573.
- Hu, Q., Peng, J., Liu, W., He, X., Cui, L., Chen, X., Yang, M., Liu, H., Liu, S., & Wang, H. (2014). Elevated cleaved caspase-3 is associated with shortened overall survival in several cancer types. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 7(8), 5057–5070.
- Huang, Z., Wang, T., Xia, W., Li, Q., Chen, X., Liu, X., Wei, P., Xu, W., & Lv, M. (2020). Oblongifolin C reverses GEM resistance via suppressing autophagy flux in bladder cancer cells. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 20(2), 1431–1440.
- Huang, S. J., Shu, C. W., Fu, T. Y., Lin, Y. C., Ger, L. P., & Liu, P. F. (2017). Caspase-3 expression in tumorigenesis and prognosis of buccal mucosa squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 8(48), 84237–84247.
- Hurst, C. D., Alder, O., Platt, F. M., Droop, A., Stead, L. F., Burns, J. E., Burghel, G. J., Jain, S., Klimczak, L. J., Lindsay, H., Roulson, J. A., Taylor, C. F., Thygesen, H., Cameron, A. J., Ridley, A. J., Mott, H. R., Gordenin, D. A., & Knowles, M. A. (2017). Genomic Subtypes of Non-invasive Bladder Cancer with Distinct Metabolic Profile and Female Gender Bias in KDM6A Mutation Frequency. *Cancer Cell*, 32(5), 701–715.e7.

- Hurst, C., Rosenberg, J., & Knowles, M. (2018). SnapShot: Bladder Cancer. *Cancer Cell*, 34(2), 350–350.e1.
- Inamura K. (2018). Bladder Cancer: New Insights into Its Molecular Pathology. *Cancers*, 10(4), 100.
- İnternet: About Bladder Cancer, American Cancer Society Web: <https://www.cancer.org/cancer/bladder-cancer/about/what-is-bladder-cancer.html>, adresinden 28.12.2020'de alınmıştır
- İnternet: Types of Bladder Cancer, BladderCancer.net, Web: <https://bladdercancer.net/basics/types/>, adresinden 28.12.2020'de alınmıştır
- İnternet: 2016 Yılı Türkiye Kanseri İstatistikleri, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, T.C. Sağlık Bakanlığı, Web: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanser-db/istatistik/Trkiye_Kanser_statistikleri_2016.pdf, adresinden 28.12.2020'de alınmıştır
- İnternet: Bax, National Center for Biotechnology Information, Web: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/581>, adresinden 28.12.2020'de alınmıştır
- İnternet: Urinary Bladder, National Institutes of Health. Web: <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/urinary/components/bladder.html>, adresinden 28.12.2020'de alınmıştır
- Iwanski, G. B., Lee, D. H., En-Gal, S., Doan, N. B., Castor, B., Vogt, M., Toh, M., Bokemeyer, C., Said, J. W., Thoenissen, N. H., & Koeffler, H. P. (2010). Cucurbitacin B, a novel in vivo potentiator of gemcitabine with low toxicity in the treatment of pancreatic cancer. *British Journal of Pharmacology*, 160(4), 998–1007.
- Jacquet, M., Guittaut, M., Fraichard, A., & Despouy, G. (2020). The functions of Atg8-family proteins in autophagy and cancer: linked or unrelated?. *Autophagy*, 1–13. Advance online publication.
- Jain, M. V., Paczulla, A. M., Klonisch, T., Dimgba, F. N., Rao, S. B., Roberg, K., Schweizer, F., Lengerke, C., Davoodpour, P., Palicharla, V. R., Maddika, S., & Łos, M. (2013). Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1), 12–29.
- Ji, Y., Li, L., Ma, Y. X., Li, W. T., Li, L., Zhu, H. Z., Wu, M. H., & Zhou, J. R. (2019). Quercetin inhibits growth of hepatocellular carcinoma by apoptosis induction in part via autophagy stimulation in mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 69, 108–119.
- Jin, H., Ma, J., Xu, J., Li, H., Chang, Y., Zang, N., Tian, Z., Wang, X., Zhao, N., Liu, L., Chen, C., Xie, Q., Lu, Y., Fang, Z., Huang, X., Huang, C., & Huang, H. (2020). Oncogenic role of *MIR516A* in human bladder cancer was mediated by its attenuating PHLPP2 expression and BECN1-dependent autophagy. *Autophagy*, 1–15. Advance online publication.

- Johansen, T., & Lamark, T. (2020). Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *Journal of Molecular Biology*, 432(1), 80–103.
- John, B. A., & Said, N. (2017). Insights from animal models of bladder cancer: recent advances, challenges, and opportunities. *Oncotarget*, 8(34), 57766–57781.
- Jordan, B., & Meeks, J. J. (2019). T1 bladder cancer: current considerations for diagnosis and management. *Nature Reviews. Urology*, 16(1), 23–34.
- Ju YS. (2017). The mutational signatures and molecular alterations of bladder cancer. *Translational Cancer Research*6(4):689-S701.
- Kalai Selvi, S., Vinoth, A., Varadharajan, T., Weng, C. F., & Vijaya Padma, V. (2017). Neferine augments therapeutic efficacy of cisplatin through ROS-mediated non-canonical autophagy in human lung adenocarcinoma (A549 cells). *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 103, 28–40.
- Kamoun, A., de Reyniès, A., Allory, Y., Sjö Dahl, G., Robertson, A. G., Seiler, R., Hoadley, K. A., Groeneveld, C. S., Al-Ahmadie, H., Choi, W., Castro, M., Fontugne, J., Eriksson, P., Mo, Q., Kardos, J., Zlotta, A., Hartmann, A., Dinney, C. P., Bellmunt, J., Powles, T., ... Bladder Cancer Molecular Taxonomy Group (2020). A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *European Urology*, 77(4), 420–433.
- Kang HW, Kim WJ, Yun SJ. (2020). The therapeutic and prognostic implications of molecular biomarkers in urothelial carcinoma. *Translational Cancer Research* 2020;9(10):6609-6623
- Kardos, J., Chai, S., Mose, L. E., Selitsky, S. R., Krishnan, B., Saito, R., Iglesia, M. D., Milowsky, M. I., Parker, J. S., Kim, W. Y., & Vincent, B. G. (2016). Claudin-low bladder tumors are immune infiltrated and actively immune suppressed. *JCI Insight*, 1(3), e85902.
- Kausar, H., Munagala, R., Bansal, S. S., Aqil, F., Vadhanam, M. V., & Gupta, R. C. (2013). Cucurbitacin B potently suppresses non-small-cell lung cancer growth: identification of intracellular thiols as critical targets. *Cancer Letters*, 332(1), 35–45.
- Khan, N., Jajeh, F., Khan, M. I., Mukhtar, E., Shabana, S. M., & Mukhtar, H. (2017). Sestrin-3 modulation is essential for therapeutic efficacy of cucurbitacin B in lung cancer cells. *Carcinogenesis*, 38(2), 184–195.
- Kim, S. H., Kang, J. G., Kim, C. S., Ihm, S. H., Choi, M. G., Yoo, H. J., & Lee, S. J. (2017). Doxorubicin has a synergistic cytotoxicity with cucurbitacin B in anaplastic thyroid carcinoma cells. *Tumour Biology: the Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(2), 1010428317692252.

- Kim, Y. C., Choi, D., Cha, A., Lee, Y. G., Baek, N. I., Rimal, S., Sang, J., Lee, Y., & Lee, S. (2020). Critical enzymes for biosynthesis of cucurbitacin derivatives in watermelon and their biological significance. *Communications Biology*, 3(1), 444.
- Kishimoto, T., Yoshikawa, Y., Yoshikawa, K., & Komeda, S. (2019). Different Effects of Cisplatin and Transplatin on the Higher-Order Structure of DNA and Gene Expression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1), 34.
- Klungsaeng, S., Kukongviriyapan, V., Prawan, A., Kongpetch, S., & Senggunprai, L. (2019). Cucurbitacin B induces mitochondrial-mediated apoptosis pathway in cholangiocarcinoma cells via suppressing focal adhesion kinase signaling. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 392(3), 271–278.
- Kobayashi, T., Owczarek, T. B., McKiernan, J. M., & Abate-Shen, C. (2015). Modelling bladder cancer in mice: opportunities and challenges. *Nature Reviews. Cancer*, 15(1), 42–54.
- Kumar S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death and Differentiation*, 14(1), 32–43.
- Kung, C. P., Budina, A., Balaburski, G., Bergenstock, M. K., & Murphy, M. (2011). Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 21(1), 71–100.
- Lee, D. H., Iwanski, G. B., & Thoennissen, N. H. (2010). Cucurbitacin: ancient compound shedding new light on cancer treatment. *TheScientificWorldJournal*, 10, 413–418.
- Li, J. R., Cheng, C. L., Yang, W. J., Yang, C. R., Ou, Y. C., Wu, M. J., & Ko, J. L. (2014). FIP-gts potentiate autophagic cell death against cisplatin-resistant urothelial cancer cells. *Anticancer Research*, 34(6), 2973–2983.
- Li, F., Guo, H., Yang, Y., Feng, M., Liu, B., Ren, X., & Zhou, H. (2019). Autophagy modulation in bladder cancer development and treatment (Review). *Oncology Reports*, 42(5), 1647–1655.
- Li, J. R., Cheng, C. L., Yang, C. R., Ou, Y. C., Wu, M. J., & Ko, J. L. (2013). Dual inhibitor of phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin NVP-BEZ235 effectively inhibits cisplatin-resistant urothelial cancer cell growth through autophagic flux. *Toxicology Letters*, 220(3), 267–276.
- Li, T., Xu, K., & Liu, Y. (2018). Anticancer effect of salidroside reduces viability through autophagy/PI3K/Akt and MMP-9 signaling pathways in human bladder cancer cells. *Oncology Letters*, 16(3), 3162–3168.
- Li, X., He, S., & Ma, B. (2020). Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular Cancer*, 19(1), 12.

- Liao, H., Xiao, Y., Hu, Y., Xiao, Y., Yin, Z., & Liu, L. (2014). Suppression of Cellular Proliferation and Invasion by HMGB1 Knockdown in Bladder Urothelial Carcinoma Cells. *Oncology Research*, 22(5-6), 235–245.
- Lin, J. F., Lin, Y. C., Tsai, T. F., Chen, H. E., Chou, K. Y., & Hwang, T. I. (2017). Cisplatin induces protective autophagy through activation of BECN1 in human bladder cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 11, 1517–1533.
- Lin, Y. C., Lin, J. F., Wen, S. I., Yang, S. C., Tsai, T. F., Chen, H. E., Chou, K. Y., & Hwang, T. I. (2017). Chloroquine and hydroxychloroquine inhibit bladder cancer cell growth by targeting basal autophagy and enhancing apoptosis. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 33(5), 215–223.
- Liu, G. H., Zhong, Q., Ye, Y. L., Wang, H. B., Hu, L. J., Qin, Z. K., Zeng, M. S., & Zeng, B. H. (2013). Expression of beclin 1 in bladder cancer and its clinical significance. *The International Journal of Biological Markers*, 28(1), 56–62.
- Liu, P., Xiang, Y., Liu, X., Zhang, T., Yang, R., Chen, S., Xu, L., Yu, Q., Zhao, H., Zhang, L., Liu, Y., & Si, Y. (2019). Cucurbitacin B Induces the Lysosomal Degradation of EGFR and Suppresses the CIP2A/PP2A/Akt Signaling Axis in Gefitinib-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(3), 647.
- Liu, S. T., Hui, G., Mathis, C., Chamie, K., Pantuck, A. J., & Drakaki, A. (2018). The Current Status and Future Role of the Phosphoinositide 3 Kinase/AKT Signaling Pathway in Urothelial Cancer: An Old Pathway in the New Immunotherapy Era. *Clinical Genitourinary Cancer*, 16(2), e269–e276.
- Liu, T., Peng, H., Zhang, M., Deng, Y., & Wu, Z. (2010). Cucurbitacin B, a small molecule inhibitor of the Stat3 signaling pathway, enhances the chemosensitivity of laryngeal squamous cell carcinoma cells to cisplatin. *European Journal of Pharmacology*, 641(1), 15–22.
- Liu, T., Zhang, M., Zhang, H., Sun, C., Yang, X., Deng, Y., & Ji, W. (2008). Combined antitumor activity of cucurbitacin B and docetaxel in laryngeal cancer. *European Journal of Pharmacology*, 587(1-3), 78–84.
- Liu, X., Duan, C., Ji, J., Zhang, T., Yuan, X., Zhang, Y., Ma, W., Yang, J., Yang, L., Jiang, Z., Yu, H., & Liu, Y. (2017). Cucurbitacin B induces autophagy and apoptosis by suppressing CIP2A/PP2A/mTORC1 signaling axis in human cisplatin resistant gastric cancer cells. *Oncology Reports*, 38(1), 271–278.
- Liu, X., Jiang, S., Tian, X., & Jiang, Y. (2018). Expression of cleaved caspase-3 predicts good chemotherapy response but poor survival for patients with advanced primary triple-negative breast cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 11(9), 4363–4373.
- Liu, Y. R., Yin, P. N., Silvers, C. R., & Lee, Y. F. (2019). Enhanced metastatic potential in the MB49 urothelial carcinoma model. *Scientific Reports*, 9(1), 7425.

- Lopez, A., Fleming, A., & Rubinsztein, D. C. (2018). Seeing is believing: methods to monitor vertebrate autophagy in vivo. *Open Biology*, 8(10), 180106.
- Lu, Y. Z., Deng, A. M., Li, L. H., Liu, G. Y., & Wu, G. Y. (2014). Prognostic role of phospho-PRAS40 (Thr246) expression in gastric cancer. *Archives of Medical Science: AMS*, 10(1), 149–153.
- Luan, F., He, X., & Zeng, N. (2020). Tetrandrine: a review of its anticancer potentials, clinical settings, pharmacokinetics and drug delivery systems. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(11), 1491–1512.
- Luo, W. W., Zhao, W. W., Lu, J. J., Wang, Y. T., & Chen, X. P. (2018). Cucurbitacin B suppresses metastasis mediated by reactive oxygen species (ROS) via focal adhesion kinase (FAK) in breast cancer MDA-MB-231 cells. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 16(1), 10–19.
- Lv, D., Guo, L., Zhang, T., & Huang, L. (2017). PRAS40 signaling in tumor. *Oncotarget*, 8(40), 69076–69085.
- Lystad, A. H., & Simonsen, A. (2019). Mechanisms and Pathophysiological Roles of the ATG8 Conjugation Machinery. *Cells*, 8(9),
- Ma, J., Qi, J., Li, S., Zhang, C., Wang, H., Shao, L., Yuan, X., & Sha, Q. (2020). Desloratadine, a Novel Antigrowth Reagent for Bladder Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 19, 1533033820926591.
- Ma, J., Zi Jiang, Y., Shi, H., Mi, C., Li, J., Xing Nan, J., Wu, X., Joon Lee, J., & Jin, X. (2014). Cucurbitacin B inhibits the translational expression of hypoxia-inducible factor-1 α . *European Journal of Pharmacology*, 723, 46–54.
- Mani, J., Vallo, S., Rakel, S., Antonietti, P., Gessler, F., Blaheta, R., Bartsch, G., Michaelis, M., Cinatl, J., Haferkamp, A., & Kögel, D. (2015). Chemoresistance is associated with increased cytoprotective autophagy and diminished apoptosis in bladder cancer cells treated with the BH3 mimetic (-)-Gossypol (AT-101). *BioMed Central Cancer*, 15, 224.
- Marostica, L. L., de Barros, A., Oliveira, J., Salgado, B. S., Cassali, G. D., Leite, E. A., Cardoso, V. N., Lang, K. L., Caro, M., Durán, F. J., Schenkel, E. P., de Oliveira, M. C., & Simões, C. (2017). Antitumor effectiveness of a combined therapy with a new cucurbitacin B derivative and paclitaxel on a human lung cancer xenograft model. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 329, 272–281.
- Martens, S., & Fracchiolla, D. (2020). Activation and targeting of ATG8 protein lipidation. *Cell Discovery*, 6, 23.
- Martens, S., Nakamura, S., & Yoshimori, T. (2016). Phospholipids in Autophagosome Formation and Fusion. *Journal of Molecular Biology*, S0022-2836(16)30455-7. Advance online publication.
- Massari, F., Santoni, M., Ciccarese, C., Brunelli, M., Conti, A., Santini, D., Montironi, R., Cascinu, S., & Tortora, G. (2015). Emerging concepts on drug

- resistance in bladder cancer: Implications for future strategies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 96(1), 81–90.
- Matulay, J. T., & Kamat, A. M. (2018). Advances in risk stratification of bladder cancer to guide personalized medicine. *F1000Research*, 7, F1000 Faculty Rev-1137.
- Meeks, J. J., Al-Ahmadie, H., Faltas, B. M., Taylor, J. A., 3rd, Flaig, T. W., DeGraff, D. J., Christensen, E., Woolbright, B. L., McConkey, D. J., & Dyrskj t, L. (2020). Genomic heterogeneity in bladder cancer: challenges and possible solutions to improve outcomes. *Nature Reviews. Urology*, 17(5), 259–270.
- Mishra, P. K., Adameova, A., Hill, J. A., Baines, C. P., Kang, P. M., Downey, J. M., Narula, J., Takahashi, M., Abbate, A., Piristine, H. C., Kar, S., Su, S., Higa, J. K., Kawasaki, N. K., & Matsui, T. (2019). Guidelines for evaluating myocardial cell death. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 317(5), H891–H922.
- Miyake, M., Owari, T., Hori, S., Nakai, Y., & Fujimoto, K. (2018). Emerging biomarkers for the diagnosis and monitoring of urothelial carcinoma. *Research and Reports in Urology*, 10, 251–261.
- Mizushima, N. (2020). The ATG conjugation systems in autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 63, 1-10.
- Mizushima, N., & Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*, 3(6),
- Mossberg, A. K., Hou, Y., Svensson, M., Holmqvist, B., & Svanborg, C. (2010). HAMLET treatment delays bladder cancer development. *The Journal of Urology*, 183(4), 1590–1597.
- Mukhopadhyay, S., Panda, P. K., Sinha, N., Das, D. N., & Bhutia, S. K. (2014). Autophagy and apoptosis: where do they meet?. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 19(4), 555–566.
- Mushtaq, J., Thurairaja, R., Nair, R. (2019). Bladder cancer. *Surgery (Oxford)*, 37(9), 529-537
- Niu, Y., Sun, W., Lu, J. J., Ma, D. L., Leung, C. H., Pei, L., & Chen, X. (2016). PTEN Activation by DNA Damage Induces Protective Autophagy in Response to Cucurbitacin B in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 4313204.
- Obermann, E. C., Meyer, S., Hellge, D., Zaak, D., Filbeck, T., Stoehr, R., Hofstaedter, F., Hartmann, A., & Knuechel, R. (2004). Fluorescence in situ hybridization detects frequent chromosome 9 deletions and aneuploidy in histologically normal urothelium of bladder cancer patients. *Oncology Reports*, 11(4), 745–751.

- Oeyen, E., Hoekx, L., De Wachter, S., Baldewijns, M., Ameye, F., & Mertens, I. (2019). Bladder Cancer Diagnosis and Follow-Up: The Current Status and Possible Role of Extracellular Vesicles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 821.
- Ojha, R., Singh, S. K., Bhattacharyya, S., Dhanda, R. S., Rakha, A., Mandal, A. K., & Jha, V. (2014). Inhibition of grade dependent autophagy in urothelial carcinoma increases cell death under nutritional limiting condition and potentiates the cytotoxicity of chemotherapeutic agent. *The Journal of Urology*, 191(6), 1889–1898.
- Ouyang, D., Zhang, Y., Xu, L., Li, J., Zha, Q., & He, X. (2011). Histone deacetylase inhibitor valproic acid sensitizes B16F10 melanoma cells to cucurbitacin B treatment. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 43(6), 487–495.
- Peng, M., Wang, J., Zhang, D., Jin, H., Li, J., Wu, X. R., & Huang, C. (2018). PHLPP2 stabilization by p27 mediates its inhibition of bladder cancer invasion by promoting autophagic degradation of MMP2 protein. *Oncogene*, 37(43), 5735–5748.
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. (2018). Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 448.
- Platt, F.M., Hurst, C.D., Taylor, C.F., Gregory, W.M., Harnden, P., et al., 2009. Spectrum of phosphatidylinositol 3-kinase pathway gene alterations in bladder cancer. *Clinical Cancer Research* 15, 6008–6017.
- Porter, A. G., & Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 6(2), 99–104.
- Qin, S., Li, J., Si, Y., He, Z., Zhang, T., Wang, D., Liu, X., Guo, Y., Zhang, L., Li, S., Li, Q., & Liu, Y. (2018). Cucurbitacin B induces inhibitory effects via CIP2A/PP2A/Akt pathway in glioblastoma multiforme. *Molecular Carcinogenesis*, 57(6), 687–699.
- Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E. L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G., & Levine, B. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(12), 1809–1820.
- Qu, Y., Cong, P., Lin, C., Deng, Y., Li-Ling, J., & Zhang, M. (2017). Inhibition of paclitaxel resistance and apoptosis induction by cucurbitacin B in ovarian carcinoma cells. *Oncology Letters*, 14(1), 145–152.
- Ren, G., Sha, T., Guo, J., Li, W., Lu, J., & Chen, X. (2015). Cucurbitacin B induces DNA damage and autophagy mediated by reactive oxygen species (ROS) in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of Natural Medicines*, 69(4), 522–530.
- Ringuette-Goulet, C., Bolduc, S., & Pouliot, F. (2018). Modeling human bladder cancer. *World Journal of Urology*, 36(11), 1759–1766.

- Robertson, A. G., Kim, J., Al-Ahmadie, H., Bellmunt, J., Guo, G., Cherniack, A. D., Hinoue, T., Laird, P. W., Hoadley, K. A., Akbani, R., Castro, M., Gibb, E. A., Kanchi, R. S., Gordenin, D. A., Shukla, S. A., Sanchez-Vega, F., Hansel, D. E., Czerniak, B. A., Reuter, V. E., Su, X., ... Lerner, S. P. (2018). Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*, 174(4), 1033.
- Rocha, C. R., Garcia, C. C., Vieira, D. B., Quinet, A., de Andrade-Lima, L. C., Munford, V., Belizário, J. E., & Menck, C. F. (2014). Glutathione depletion sensitizes cisplatin- and temozolomide-resistant glioma cells in vitro and in vivo. *Cell Death & Disease*, 5(10), e1505.
- Ruan, J. L., Hsu, J. W., Browning, R. J., Stride, E., Yildiz, Y. O., Vojnovic, B., & Kiltie, A. E. (2019). Mouse Models of Muscle-invasive Bladder Cancer: Key Considerations for Clinical Translation Based on Molecular Subtypes. *European Urology Oncology*, 2(3), 239–247.
- S Kim, H. J., Gong, M. K., Yoon, C. Y., Kang, J., Yun, M., Cho, N. H., Rha, S. Y., & Choi, Y. D. (2020). Synergistic Antitumor Effects of Combined Treatment with HSP90 Inhibitor and PI3K/mTOR Dual Inhibitor in Cisplatin-Resistant Human Bladder Cancer Cells. *Yonsei Medical Journal*, 61(7), 587–596.
- Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P., Padala, S. A., & Barsouk, A. (2020). Epidemiology of Bladder Cancer. *Medical Sciences (Basel, Switzerland)*, 8(1), 15.
- Sahni, S., Merlot, A. M., Krishan, S., Jansson, P. J., & Richardson, D. R. (2014). Gene of the month: BECN1. *Journal of Clinical Pathology*, 67(8), 656–660.
- Sanli, O., Dobruch, J., Knowles, M. A., Burger, M., Alemozaffar, M., Nielsen, M. E., & Lotan, Y. (2017). Bladder cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, 3, 17022.
- Shang, Y., Guo, X. X., Li, W. W., Rao, W., Chen, M. L., Mu, L. N., & Li, S. J. (2014). Cucurbitacin-B inhibits neuroblastoma cell proliferation through up-regulation of PTEN. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 18(21), 3297–3303.
- Sharma J, Deb B, Kumar P. (2018) Developments in the area of bladder cancer genomics and its importance in the treatment selection. *Journal of Molecular Oncology Research*, 2(3):58-62.
- Shin, S. S., Park, Y. J., Hwang, B., Park, S. L., Han, S. W., Park, S. S., Choi, Y. H., Kim, W. J., & Moon, S. K. (2019). Triacanthine exerts antitumor effects on bladder cancer in vitro and in vivo. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 64, 153069.
- Singh, S. S., Vats, S., Chia, A. Y., Tan, T. Z., Deng, S., Ong, M. S., Arfuso, F., Yap, C. T., Goh, B. C., Sethi, G., Huang, R. Y., Shen, H. M., Manjithaya, R., & Kumar, A. P. (2018). Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene*, 37(9), 1142–1158.

- Sjödahl, G., Eriksson, P., Liedberg, F., & Höglund, M. (2017). Molecular classification of urothelial carcinoma: global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification. *The Journal of Pathology*, 242(1), 113–125.
- Sjödahl, G., Lauss, M., Lövgren, K., Chebil, G., Gudjonsson, S., Veerla, S., Patschan, O., Aine, M., Fernö, M., Ringnér, M., Månsson, W., Liedberg, F., Lindgren, D., & Höglund, M. (2012). A Molecular Taxonomy for Urothelial Carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(12), 3377–3386.
- Smolensky, D., Rathore, K., & Cekanova, M. (2016). Molecular targets in urothelial cancer: detection, treatment, and animal models of bladder cancer. *Drug Design, Development and Therapy*, 10, 3305–3322.
- Stickles, X. B., Marchion, D. C., Bicaku, E., Al Sawah, E., Abbasi, F., Xiong, Y., Bou Zgheib, N., Boac, B. M., Orr, B. C., Judson, P. L., Berry, A., Hakam, A., Wenham, R. M., Apte, S. M., Berglund, A. E., & Lancaster, J. M. (2015). BAD-mediated apoptotic pathway is associated with human cancer development. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(4), 1081–1087.
- Sui, X., Chen, R., Wang, Z., Huang, Z., Kong, N., Zhang, M., Han, W., Lou, F., Yang, J., Zhang, Q., Wang, X., He, C., & Pan, H. (2013). Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death & Disease*, 4(10), e838.
- Sun, C. Y., Zhang, Q. Y., Zheng, G. J., & Feng, B. (2019). Autophagy and its potent modulators from phytochemicals in cancer treatment. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 83(1), 17–26.
- Sun, C., Wang, G., Wrighton, K. H., Lin, H., Songyang, Z., Feng, X. H., & Lin, X. (2016). Regulation of p27^{Kip1} phosphorylation and G1 cell cycle progression by protein phosphatase PPM1G. *American Journal of Cancer Research*, 6(10), 2207–2220.
- Sun, J., Feng, Y., Wang, Y., Ji, Q., Cai, G., Shi, L., Wang, Y., Huang, Y., Zhang, J., & Li, Q. (2019). α -hederin induces autophagic cell death in colorectal cancer cells through reactive oxygen species dependent AMPK/mTOR signaling pathway activation. *International Journal of Oncology*, 54(5), 1601–1612.
- Sun, L., Liu, N., Liu, S. S., Xia, W. Y., Liu, M. Y., Li, L. F., & Gao, J. X. (2015). Beclin-1-independent autophagy mediates programmed cancer cell death through interplays with endoplasmic reticulum and/or mitochondria in colbat chloride-induced hypoxia. *American Journal of Cancer Research*, 5(9), 2626–2642.
- Sun, Y. S., Lv, L. X., Zhao, Z., He, X., You, L., Liu, J. K., & Li, Y. Q. (2014). Cordycepol C induces caspase-independent apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 37(4), 608–617.

- Takeyama, Y., Kato, M., Tamada, S., Azuma, Y., Shimizu, Y., Iguchi, T., Yamasaki, T., Gi, M., Wanibuchi, H., & Nakatani, T. (2020). Myeloid-derived suppressor cells are essential partners for immune checkpoint inhibitors in the treatment of cisplatin-resistant bladder cancer. *Cancer Letters*, 479, 89–99.
- Tan, T. Z., Rouanne, M., Tan, K. T., Huang, R. Y., & Thiery, J. P. (2019). Molecular Subtypes of Urothelial Bladder Cancer: Results from a Meta-cohort Analysis of 2411 Tumors. *European Urology*, 75(3), 423–432.
- Tanabalan, C and Ballaro A. (2019). The physiology and pharmacology of the lower urinary tract. *Surgery (Oxford)*, 37 (7), 365-371.
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), 2503–2518.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature*, 507(7492), 315–322.
- Thoennissen, N. H., Iwanski, G. B., Doan, N. B., Okamoto, R., Lin, P., Abbassi, S., Song, J. H., Yin, D., Toh, M., Xie, W. D., Said, J. W., & Koeffler, H. P. (2009). Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. *Cancer Research*, 69(14), 5876–5884.
- Towers, C. G., Wodetzki, D., & Thorburn, A. (2020). Autophagy and cancer: Modulation of cell death pathways and cancer cell adaptations. *The Journal of Cell Biology*, 219(1), e201909033.
- Vural, A., & Kehrl, J. H. (2014). Autophagy in macrophages: impacting inflammation and bacterial infection. *Scientifica*, 2014, 825463.
- Wakimoto, N., Yin, D., O'Kelly, J., Haritunians, T., Karlan, B., Said, J., Xing, H., & Koeffler, H. P. (2008). Cucurbitacin B has a potent antiproliferative effect on breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Science*, 99(9), 1793–1797.
- Wang, J., & Wu, G. S. (2014). Role of autophagy in cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(24), 17163–17173.
- Wang, Z., Liu, S., Ding, K., Ding, S., Li, C., Lu, J., Gao, D., Zhang, T., & Bi, D. (2016). Silencing Livin induces apoptotic and autophagic cell death, increasing chemotherapeutic sensitivity to cisplatin of renal carcinoma cells. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(11), 15133–15143.
- Wang, N., Feng, Y., Zhu, M., Tsang, C. M., Man, K., Tong, Y., & Tsao, S. W. (2010). Berberine induces autophagic cell death and mitochondrial apoptosis in liver cancer cells: the cellular mechanism. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(6), 1426–1436.

- Washington, M. N., Suh, G., Orozco, A. F., Sutton, M. N., Yang, H., Wang, Y., Mao, W., Millward, S., Ornelas, A., Atkinson, N., Liao, W., Bast, R. C., Jr, & Lu, Z. (2015). ARHI (DIRAS3)-mediated autophagy-associated cell death enhances chemosensitivity to cisplatin in ovarian cancer cell lines and xenografts. *Cell death & Disease*, 6(8), e1836.
- Wu, H. M., Jiang, Z. F., Ding, P. S., Shao, L. J., & Liu, R. Y. (2015). Hypoxia-induced autophagy mediates cisplatin resistance in lung cancer cells. *Scientific Reports*, 5, 12291.
- Wu, M. J., Chang, C. H., Chiu, Y. T., Wen, M. C., Shu, K. H., Li, J. R., Chiu, K. Y., & Chen, Y. T. (2012). Rictor-dependent AKT activation and inhibition of urothelial carcinoma by rapamycin. *Urologic Oncology*, 30(1), 69–77.
- Xie, Y. L., Tao, W. H., Yang, T. X., & Qiao, J. G. (2016). Anticancer effect of cucurbitacin B on MKN-45 cells via inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(4), 2709–2715.
- Xu, J., Chen, Y., Yang, R., Zhou, T., Ke, W., Si, Y., Yang, S., Zhang, T., Liu, X., Zhang, L., Xiang, K., Guo, Y., & Liu, Y. (2020). Cucurbitacin B inhibits gastric cancer progression by suppressing STAT3 activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 684, 108314.
- Yang, F., Qian, X. J., Qin, W., Deng, R., Wu, X. Q., Qin, J., Feng, G. K., & Zhu, X. F. (2013). Dual phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor NVP-BEZ235 has a therapeutic potential and sensitizes cisplatin in nasopharyngeal carcinoma. *PloS One*, 8(3), e59879.
- Yang, T., Liu, J., Yang, M., Huang, N., Zhong, Y., Zeng, T., Wei, R., Wu, Z., Xiao, C., Cao, X., Li, M., Li, L., Han, B., Yu, X., Li, H., & Zou, Q. (2017). Cucurbitacin B exerts anti-cancer activities in human multiple myeloma cells in vitro and in vivo by modulating multiple cellular pathways. *Oncotarget*, 8(4), 5800–5813.
- Yoon, H., Kim, M., Jang, K., Shin, M., Besser, A., Xiao, X., Zhao, D., Wander, S. A., Briegel, K., Morey, L., Minn, A., & Slingerland, J. M. (2019). p27 transcriptionally coregulates cJun to drive programs of tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(14), 7005–7014.
- Yoshida, T., Kates, M., Fujita, K., Bivalacqua, T. J., & McConkey, D. J. (2019). Predictive biomarkers for drug response in bladder cancer. *International Journal of Urology: Official Journal of the Japanese Urological Association*, 26(11), 1044–1053.
- Yu, H., Wu, C. L., Wang, X., Ban, Q., Quan, C., Liu, M., Dong, H., Li, J., Kim, G. Y., Choi, Y. H., Wang, Z., & Jin, C. Y. (2019). SP600125 enhances C-2-induced cell death by the switch from autophagy to apoptosis in bladder cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 38(1), 448.

- Yuan, X., Li, T., Xiao, E., Zhao, H., Li, Y., Fu, S., Gan, L., Wang, Z., Zheng, Q., & Wang, Z. (2014). Licochalcone B inhibits growth of bladder cancer cells by arresting cell cycle progression and inducing apoptosis. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 65, 242–251.
- Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J., & Heintz, N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), 15077–15082.
- Zhang, H. H., Huang, Z. X., Zhong, S. Q., Fei, K. L., & Cao, Y. H. (2020). miR-21 inhibits autophagy and promotes malignant development in the bladder cancer T24 cell line. *International Journal of Oncology*, 56(4), 986–998.
- Zhang, J., Wang, G., Zhou, Y., Chen, Y., Ouyang, L., & Liu, B. (2018). Mechanisms of autophagy and relevant small-molecule compounds for targeted cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 75(10), 1803–1826.
- Zhang, Z. R., Gao, M. X., & Yang, K. (2017). Cucurbitacin B inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human osteosarcoma cells via modulation of the JAK2/STAT3 and MAPK pathways. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(1), 805–812.
- Zheng, Q., Liu, Y., Liu, W., Ma, F., Zhou, Y., Chen, M., Chang, J., Wang, Y., Yang, G., & He, G. (2014). Cucurbitacin B inhibits growth and induces apoptosis through the JAK2/STAT3 and MAPK pathways in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Molecular Medicine Reports*, 10(1), 89–94.
- Zhou, J., Zhao, T., Ma, L., Liang, M., Guo, Y. J., & Zhao, L. M. (2017). Cucurbitacin B and SCH772984 exhibit synergistic anti-pancreatic cancer activities by suppressing EGFR, PI3K/Akt/mTOR, STAT3 and ERK signaling. *Oncotarget*, 8(61), 103167–103181.
- Zhu, J. S., Ouyang, D. Y., Shi, Z. J., Xu, L. H., Zhang, Y. T., & He, X. H. (2012). Cucurbitacin B induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy associated with G actin reduction and persistent activation of cofilin in Jurkat cells. *Pharmacology*, 89(5-6).





EK-1.Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

Evrak Tarih ve Sayısı: 19/04/2018-E.64566



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



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Ece KONAÇ
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Ece KONAÇ, Yener KURMAN, Sinan SÖZEN, Cenk Yücel BİLEN, Güldal ESENDAĞLI, Venhar GÜRBÜZ'den oluşan G.Ü.ET-18.028 kod numaralı ve "*Mesane Kanseriinde Kukurbitasin B ve Sisplatin'in Anti-proliferatif Etkilerinin Hücre Ölüm Yolaklarında Araştırılması*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-18.028 and entitled "*Investigation of Anti-proliferative Effects of Cucurbitacin B and Cisplatin on the Cell Death Pathways in Bladder Cancer*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Doç. Dr. Mürşide Ayşe DEMİREL
Kurul Başkan Yardımcısı

Hayvan Türü : Mouse C57BL/6
Hayvan Sayısı :40

Ek:1 Liste

19/04/2018 Genel Evrak Sorumlusu

Esengül BOŞNAK

EK-1. (devam) Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ	
TOPLANTI TARİHİ :06/04/2018	TOPLANTI SAYISI : 04
ADI-SOYADI	İMZA
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)	
Uzm.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	
Prof.Dr.Tuncay PEKER	
Prof.Dr.Fatma AKAR	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	
Doç.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ	
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL	
Doç.Dr.Emre BARIŞ	
Doç.Dr.İpek SÜNTAR	
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR	
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	

EK-2.Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Katılım Sertifikası



**XIX. DENEY HAYVANLARI
UYGULAMA VE ETİK KURSU**
23-31 Mayıs 2016
KATILIM SERTİFİKASI

Sayın,

Yener KURMAN

Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından, 23-31 Mayıs 2016 tarihleri arasında düzenlenen “Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kurs XIX” a katılarak, Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.

Prof. Dr. Süleyman BÜYÜKBERBER
REKTÖR

Prof. Dr. Leyla AÇIK
ETİK KURUL BAŞKANI

Doç. Dr. Turgay TEKİNAY
MERKEZ MÜDÜRÜ

Sertifika no: 2016/19-13

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : KURMAN Yener
Uyruğu : T.C.

Eğitim Derecesi

	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi Sağlık Bil. Ens. Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD.	Devam ediyor
Yüksek lisans	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.	2015
Lisans	Ankara Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2009

İş Deneyimi Yıl

Çalıştığı Yer

Görev

2015-Devam Ediyor	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi
2012-2015	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi
2011-2012	Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dili

İngilizce

YAYINLAR

ULUSLARARASI HAKEMLİ DERGİLERDE YAYIMLANAN MAKALELER

1. Kurman, Y., Kiliccioglu, I., Dikmen, A. U., Esendagli, G., Bilen, C. Y., Sozen, S., & Konac, E. (2020). Cucurbitacin B and cisplatin induce the cell death pathways in MB49 mouse bladder cancer model. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 245(9), 805–814.

2. Konac, E., Kurman, Y., & Baltaci, S. (2020). Contrast effects of autophagy in the treatment of bladder cancer. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 1535370220959336.

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

Kurman, Y. (2018). Parkinson Hastalığı ve İlişkili Olduğu Genler. *Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 6(1), 231-239.

Ulusal bilimsel etkinliklere ait kitaplarda yayınlanan bildiri özeti

Kurman Y, Gezen Ak D, Dursun E, Apaydın H, Alaylıoğlu M, Gündüz A, Bilgiç B, Kızıltan G, Hanağası H, Ertan S, Yılmaz S, “Erken ve geç başlangıçlı Parkinson hastalarında Alfa-sinüklein geni polimorfizmlerinin ve haplotiplerinin incelenmesi, XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 26-29 Ekim, Ölüdeniz-Fethiye, 2015.

Sözlü Bildiriler

1.Kurman Y., Gezen Ak D, Dursun E, Apaydın H, Alaylıoğlu M, Gündüz A, Bilgiç B, Kızıltan G, Hanağası H, Ertan S, Yılmaz S, “Parkinson hastalığı ile alfa-sinüklein geni polimorfizmlerinin ilişkisinin araştırılması”, 13. Ulusal Sinirbilim Kongresi, 30 Nisan - 3 Mayıs 2015 / Selçuk Üniversitesi, Konya, (Sözel Bildiri).

2.Kurman, Y., Kiliccioglu, I., Dikmen, A. U., Esendagli, G., Bilen, C. Y., Sozen, S., & Konac, E. (2020). Mesane Kanseriinde Kukurbitasin B Ve Sisplatinin’in Anti-Proliferatif Etkilerinin Hücre Ölüm Yolaklarında Araştırılması, XVI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 27 – 30 Ekim 2019 Güvercinlik/Bodrum (Sözel Bildiri).



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..