



**CELAL BAYAR**  
ÜNİVERSİTESİ

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ**  
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

**'SERVİKAL KANSERDE HEDEF TEDAVİ: SRC TİROZİN  
KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ'**

**UZMANLIK TEZİ**  
Dr. Esat ÇALIK

Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Tefik GÜVENAL

Manisa, 2015

## ÖNSÖZ

Meslek hayatımın en önemli dönemlerinden biri olan uzmanlık eğitimim süresince desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen eski anabilim dalı başkanı hocamız sayın Prof. Dr. Faik Mümtaz KOYUNCU ve şu anki anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Naci Kemal KUŞÇU'ya emekleri için teşekkür ederim.

Çalışmamın her aşamasıyla sabırla ilgilenen, beni yönlendirip destekleyen sayın danışman hocam Prof. Dr. Tevfik GÜVENAL'a, asistanlık süresi boyunca tecrübe ve bilgilerini bizlere aktaran sayın hocalarım Prof. Dr. Semra Oruç KOLTAN, Prof. Dr. Hasan Tayfun ÖZÇAKIR, Prof. Dr. Yeşim BÜLBÜL, Doc. Dr. Yıldız UYAR, Doc. Dr. Aslı GÖKER, Doc. Dr. Burcu Artunç ÜLKÜMEN' e ve tezimin hazırlanış aşamasında yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' ndan Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ' a şükranlarımı sunarım.

Tezimin hazırlanışında olduğu gibi uzmanlık eğitimimde de büyük emeği olan, kendisinden çok şey öğrendiğim Uzm. Dr. Pınar Solmaz HASDEMİR' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tüm yoğunluklarına rağmen büyük emekler ile tezimin yapılmasını sağlayan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı' ndan Yrd. Doc. Dr. Burcu Erbaykent TEPEDELEN ve yüksek lisans öğrencisi İsmail DEĞERLİ' ye en içten teşekkürlerimi sunarım. Yazım aşamasındaki yardımlarından dolayı Uzm. Dr. Burçin PEHLİVANOĞLU' na ayrıca teşekkür ederim.

Hastanedeki yokluğunu her zaman hissettiğim, kendisi ile çalışmaktan büyük onur duyduğum değerli dostum Op. Dr. Mustafa Melih ERKAN' a, manevi kardeşlerim olarak gördüğüm başta Dr. Sedat İrmak ZARARCI olmak üzere diğer tüm asistan arkadaşlarıma ve tüm klinik çalışanlarımıza çok teşekkür ederim.

Hayatımda olduğu gibi tezimin de düzenlenmesinde çok emeği geçen, zor zamanlarımda yüzünü görmem ile dertlerimi unuttuğum sevgili eşim Dr. Müge ÇALIK' a, büyük fedakarlıklar ile yardımlarını esirgemeyen tüm aileme ve varolması ile hayatımızı anlamlandıran biricik oğlum Efe ÇALIK'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

## KISALTMA LİSTESİ

**a.** : arteria

**AIF:** Apoptosis Inducing Factor

**Apaf:** apoptotik proteaz aktivite edici faktör

**ATP:** Adenozin trifosfatın

**BT:** Bilgisayarlı tomografi

**Ca:** Kalsiyum

**CAD:** kaspazla aktiveleşen deoksiribonukleaz

**CDKs:** siklin-bağımlı kinaz

**CIN:** cervical intraepithelial neoplasia

**cm:** santimetre

**DNA:** Deoksiribonükleik asit

**DSÖ:** Dünya Sağlık Örgütü

**ECC:** Endoservikal kanal küretajı

**EM:** Elektron Mikroskobu

**FADD:** Fas adaptor ölüm bölgesi

**FAK:** Fokal adezyon kinazı

**FIGO:** Federation of Gynecology and Obstetrics

**GF:** Growth Faktör

**GOF:** Gain of function

**HPV:** Human papilloma virus

**IAP:** Inhibitors of Apoptosis

**L:** Ligand

**Lig:** ligamentum

**Mg:** Magnezyum

**Mrg:** Manyetik Rezonans Görüntüleme

**NCI:** Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü

**OK:** Oral kontraseptif

**Pap Testi:** Papanicolau testi

**PET:** Pozitron Emisyon Tomografisi

**RIP:** Receptör Interacting Protein

**RTK:** Reseptör tirozin kinazlar

**SH:** Src-homology

**SIL:** Squamous intraepithelial lesion

**SKB:** skuamokolumnar bileşke

**TK:** Tirozin kinazlar

**TKİ:** Tirozin kinaz inhibitörleri

**TNFR:** Tümör Nekroz faktör reseptörü

**Usg:** Ultrasonografi

**v. :** vena

## ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL 1: Hücre bölünme döngüsü .....	4
ŞEKİL 2: FAS sinyal iletim yoluyla apoptozis .....	8
ŞEKİL 3: Bcl2/ Bax yoluyla apoptozis .....	11
ŞEKİL 4: Serviksde orjinal ve yeni SCB ve Transformasyon zonun şematik görünümü .....	12
ŞEKİL 5: Kadınlarda en sık görülen ilk 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızlarının dağılımları .....	14
ŞEKİL 6: HPV karsinogenezi .....	19
ŞEKİL 7: Servikal lezyonların kansere ilerlemesi .....	20
ŞEKİL 8: CCL-62 hücre hattında bosutinib uygulamasının zaman ve konsantrasyona bağlı hücre canlılığı üzerindeki etkisi. ....	50
ŞEKİL 9: A. Bosutinibin CCL-62 hücre hattında GraphPad yazılım programı ile % canlılık değerlerine karşı logaritmik konsantrasyonlarından elde edilen proliferasyon eğrisi. B. CCL-62 hücre hattında bosutinib uygulamasının GraphPad yazılım programı ile elde edilen IC50 değerleri .....	51
ŞEKİL 10: A. CCL-62 hücrelerinde 24 saat süre ile CPT-11 ve Bosutinib uygulamasının DNA hasarı belirteci H2AX ve ATM fosforilasyonuna ( $\gamma$ H2AX(Ser139) ve pATM(Ser1981)) etkisi .....	52
ŞEKİL 11: CCL-62 hücrelerinde 24 saat süre ile Bosutinib uygulamasının Kaspaz-3 seviyesine etkisi. ....	54
ŞEKİL 12: CCL-62 hücrelerinde 24 saat süre ile Bosutinib uygulaması sonucu artan Kaspaz-3 aktivasyonunun kolorimetrik olarak belirlenmesi .....	55
ŞEKİL 13: CCL-62 hücrelerinde 24 saat süre ile 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M ve 20 $\mu$ M Bosutinib uygulaması sonucu DNA hasarı ve apoptozda rol oynayan proteinlerin seviyelerindeki değişimler. ....	55
ŞEKİL 14: CCL-62 hücrelerinde 24 saat süre ile 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M ve 20 $\mu$ M Bosutinib uygulamasının apoptotik hücre oranına etkisinin Annexin V-FITC (yeşil), PI (kırmızı) ve DAPI(mavi) boyaması ile flöresan mikroskopunda analizlenmesi sonucu elde edilen görüntüler .....	56

## **TABLO LİSTESİ**

TABLO 1: 2012 yılında Dünyada serviks kanseri insidensini ve mortalitesi .....	13
TABLO 2: Genital HPV sınıflaması .....	16
TABLO 3: Src / Abl inhibitörlerinin klinik kullanım özellikleri .....	31
TABLO 4: Bosutinib ile solid malignitelerde klinik çalışmalar.....	33
TABLO 5: Ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları .....	46
TABLO 6: Depolama jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları.....	47

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
KISALTMA LİSTESİ.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ .....	iv
TABLO LİSTESİ.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
I.GİRİŞ.....	1
II. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Kanser Biyolojisi .....	3
2.1.1. Hücre döngüsü ve kontrol mekanizmaları .....	3
2.1.2. Apoptozis .....	6
2.2.Serviks Kanseri .....	11
2.2.1.Serviks anatomi ve histolojisi.....	11
2.2.2.Epidemiyoloji .....	12
2.2.3.Risk faktörleri .....	14
2.2.4. HPV ve serviks kanseri ile ilişkisi .....	16
2.2.5. Serviks Kanseri Tarama Yöntemleri .....	20
2.2.5.1. Servikovajinal Sitoloji .....	20
2.2.5.2. HPV Testi .....	21
2.2.6. Serviks Kanseri Tanı Ve Evreleme .....	21
2.2.7. Serviks Kanseri Tedavisi .....	22
2.3. Tirozin Kinazlar, Tirozin Kinaz İnhibitörleri Ve Hedef Tedavideki Yerleri.....	26
2.3.1.Tirozin kinazlar .....	26
2.3.2 Tirozin Kinazların Farmakolojik İnhibisyonu .....	28
2.3.3 Tirozin Kinazların Farmakolojik İnhibitörleri .....	29
2.3.4.Bosutinib .....	32
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. GEREÇ.....	34
3.2. YÖNTEM .....	39
3.2.1. Hücrelerin Bakımı Ve Pasajlanması.....	39

3.2.2. Hücrelerin Dondurulması Ve Çözdürülmesi.....	40
3.2.3. Hücre Sayımı .....	40
3.2.4 Sitotoksosite analizleri (MTT).....	40
3.2.5. İmmünofloresan.....	41
3.2.6. Biovision kiti ile kolorimetrik kaspaz-3 analizi.....	44
3.2.7 İmmünoblotlama (Western-Blot).....	45
IV.BULGULAR.....	50
V. TARTIŞMA.....	57
VI. SONUÇ .....	64
VII. ÖZET .....	65
VIII. İNGİLİZCE ÖZET .....	67
IX. KAYNAKLAR .....	69

## I.GİRİŞ

Kanser, Deoksiribonükleik asit (DNA) hasarı sonucu hücrelerin kontrolsüz veya anormal bir şekilde büyümesi ve çoğalmasıdır. İnsan ölümlerinin önemli bir bölümünün nedenini oluşturmakta olan kanser; hücre çoğalması, apoptozis (programlı hücre ölümü), farklılaşma, yaşlılık ve bunların kendi iç dengelerinde bozulmasıyla, genetik ve epigenetik değişikliklerle uyarılan çok aşamalı moleküler bir süreçtir.

Serviks kanseri dünya genelinde kadınlarda meme kanserinden sonra 4. sırada gelmektedir. Her yıl 500.000' den fazla hasta yeni tanı almakta ve bu hastalıktan 250.000 üzerinde kadın hayatını kaybetmektedir (1), ölümlerin yaklaşık %80'i gelişmemiş ülkelerde oluşmaktadır. Türkiye'de 2009 yılı Sağlık Bakanlığı verilerine göre, kadınlarda en sık görülen kanserler arasında serviks kanseri, 10. sırada yer almaktadır (2). Serviks kanserinin prognozunu belirleyen en önemli faktör tümörün evresidir. Hastalarının evreleri ilerledikçe tedaviye yanıt azalmakta, mortalite oranları artmaktadır (3). Hastalığın tedavisi cerrahi ve/veya kemoradyoterapidir. Cerrahi tedavi erken evre olan Evre I ve IIA hastalarda bir tedavi seçeneği olup, ileri evre hastalarda genellikle primer tedavi olarak uygulanmamaktadır. Radyoterapi ise hastalığın her evresinde uygulanabilmekte ve etkinliğini artırmak için aynı anda kemoterapi ile birlikte uygulanmaktadır (3, 4).

İleri evre servikal kanser olgularında tedavinin zor ve mortalitenin yüksek olması yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesini gerektirmektedir. Bu tedaviler radyoterapinin etkinliğini artırmak yanında daha etkili ilaç tedavilerinin geliştirilmesi şeklindedir. Kontrolsüz büyümenin olduğu kanser hücrelerinde özellikle hücrelerin bölünme siklusundaki hedeflere yönelik tedaviler, bazı kanser türlerinde etkili olduğunun görülmesi ile ilgi çekmeye başlamıştır. Hedefe yönelik tedaviler, kanser hücrelerine özgü olan yolaklar üzerine moleküler düzeyde etki ederek hücre

büyümesi, hücre siklusu kontrolü, apoptozis ve anjiyogenez üzerine etki etmektedirler. Böylece yapılan tedavilerde, sadece kanser hücreleri hedef alınarak tedavinin etkinliği yanında normal dokulardaki toksisiteyi de minimal düzeye indirmek amaçlanmaktadır.

Hücre sel proliferasyon, diferansiyasyon, hücrenin canlılığı ve hücre hareketi gibi önemli regülatuar fonksiyonlarda rol alan tirozin kinazların karsinogenez sürecinde sürekli ve kontrolsüz uyarımı söz konusudur (5). Hedef tedavide kullanılan ajanlardan bir grubu oluşturan tirozin kinaz inhibitörlerinin, tirozin kinaz reseptörlerini çeşitli mekanizmalar ile inhibisyonu, kanserin tedavisinde umut verici sonuçlar alınmasını sağlamıştır (6).

Tirozin Kinaz inhibitörlerinden biri olan Bosutinib, bir 4-anilo-3-kinolin karbonitril olup hem Src hem de Abl tirozin kinazları inhibe edebilen küçük moleküllü inhibitördür. Bosutinibin, göğüs kanseri hücre hatlarında kanser hücrelerinin proliferasyonunu, invazyonunu ve migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (7). Bosutinib, Gıda ve ilaç idaresi (Food Drug Administration; FDA) tarafından 2012 de, tedaviye dirençli veya intolerans gelişmiş yetişkin kronik miyeloid lösemi (kml) hastalarında kullanımı için onaylanmıştır. Bosutinibin benzer şekilde başka solid tümörlerde de faz I ve II çalışmaları devam etmesi, bu ilacın hedefe yönelik tedavide üzerinde daha çok durulacağını göstermektedir.

Bu çalışmada, bosutinib'in serviks hücre kültürlerinde (HeLa kontaminatı) epitelyal hücre dizilerine (CCL-62) uygulanmasıyla, farklı büyüme profillerinin gözlemlenmesi, ayrıca kanserleşme sürecindeki önemli mekanizmalar olan apoptotik yolların incelenmesi amaçlanmıştır.

## II. GENEL BİLGİLER

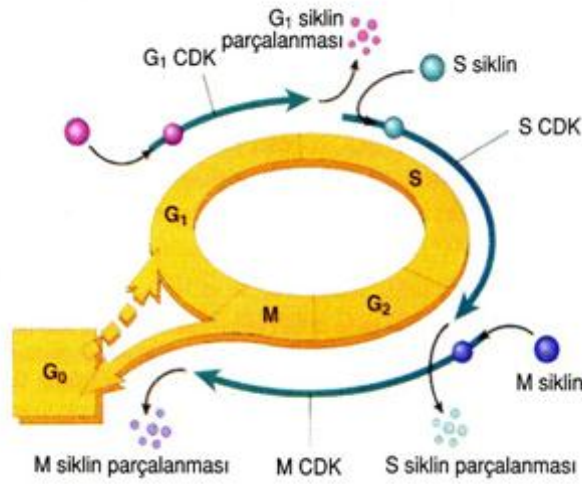
### 2.1. Kanser Biyolojisi

#### 2.1.1. Hücre döngüsü ve kontrol mekanizmaları

Normal dokularda hücreler, organizmanın ihtiyaçlarına göre çoğalarak sayılarını artırıp ya da hücre çoğalmasını azaltarak ve ölüm hızını artırarak vücudun dengesini sağlarlar. Hücrelerin replikasyonu ile çoğalması bir dizi biyokimyasal olay sonucu gerçekleşerek hem iç hem de dış büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Bazı onkogen adı verilen hücre siklusuna ait proteinler hücre siklusu süresince orantılı bir şekilde aktifleşip ve inaktifleşerek hücre siklusunu düzenler.

Hücre siklusu, Şekil 1'de de gösterildiği gibi hücrenin bölünmesine kadar 5 basamaktan oluşur:

1. G0 fazında, hücreler genellikle spesifik bir işlevi görmek üzere programlanırlar.
2. G1 fazında, spesifik hücre fonksiyonları için gereken proteinler ve RNA sentezlenir.
3. S fazında hücre içindeki DNA'nın miktarı ikiye katlanır.
4. G2 fazında DNA sentezi durur, protein ve RNA sentezi devam eder.
5. M fazında (mitozis) genetik materyal oluşan iki yeni hücre oluşur.



**ŞEKİL 1.** Hücre bölünme döngüsü (8)

Mitozdan G1 evresine geçen hücreler ya bölünmeye devam etmekte ya da bölünmeleri durmaktadır. Şekil 1 de hücre bölünme döngüsünde görüldüğü gibi, G1 ve S evresi arasındaki G0 evresi ise, farklılaşmasını tamamlamış hücrelerin dinlenme evresidir. Bölünmesi duran ve tüm biyokimyasal olayların aktif olarak sürdüğü hücrelerin geçtiği, G0 evresindeki hücre tekrar bölüneceği zaman döngüye G1 evresinden katılmaktadır. Büyüme faktörleri, sitokinler ve tümör virüsleri gibi mitojenik iletiler, hücrenin S evresine geçiş hazırlıkları yaptığı G1 evresine girmesini sağlar. Hücre döngüsünün kontrol noktaları G1, G2 evrelerinde ve M evresinin son aşamalarında bulunmaktadır (8, 9).

Hücre döngüsünün her aşaması siklinler olarak bilinen bir dizi protein ailesi tarafından düzenlenmekte ve bir grup siklinin görevini tamamlamasından sonra, diğer grup aktif hale gelmektedir (8, 10, 11). Hücre bölünmesini sağlayan mekanizmanın motoru, hücrenin metabolik aktivitelerini ve hücre bölünmesini düzenleyen, hücre döngüsü evrelerini kontrol eden siklin-bağımlı kinazlardan (CDKs) oluşmaktadır (10, 12). Siklinler, bağlandıkları bu inaktif CDK moleküllerini aktive etmektedirler (8, 9-12). Siklinlerin salgısının mekanizmanın kusursuz sağlanması için düzenli olması gerekir. Örneğin büyümeyi uyaran sinyal, hücrede D siklin ailesinin düzeyini artırmakta ve uygun CDKs aktive olmaktadır. Bu

nedenle D siklin salınımının kontrolünün bozulduğu bir mutasyon, hücreyi S fazına sokmakta ve neoplastik transformasyon gelişmektedir (9-10, 12-15).

Ekstrasellüler ileti moleküllerinin (mitogenler) kendi reseptörlerine bağlanmasıyla aktiflenen protein kinazlar, sitoplazmadaki sinyal ileti moleküllerini (Ras ve Jak) ve transkripsiyon faktörlerini (Jun, Fos, NF-AT, NF $\kappa$ B, Myc) fosforilleyen kinazları (proteinkinaz C ve ERK) uyarmaktadır. Böylelikle genlerin uyarılması için çeşitli transkripsiyon faktörleri, fosforillenerek aktifleşmekte ve çekirdeğe taşınarak ilişkili genleri uyarmaktadır. Transkripsiyonel düzenlemeyi sağlayan E2F, pRb (retinoblastoma proteini, tümör baskılayıcı gen ürünü ve hücre döngüsünü düzenleyicidir) ile bağlı konumdadır ve pRb tarafından inhibe edilmektedir. G1 evresinden S evresine geçişi sağlayan restriksiyon noktasının aşılması için E2F gereklidir. Protein kinazların etkisiyle (Siklin DCCK4, Siklin D-CKK 6 kompleksleri ile) E2F bağlı Rb fosforilasyonu sonucu, E2F serbest hale geçirilmekte, hücre döngüsünün en önemli kontrol noktası olan G1 fazından S fazına geçiş engeli aşılmakta ve hücre DNA sentez fazına girmektedir. E2F transkripsiyon faktörünün aktiflenmesi sonucu DNA replikasyonu için gerekli proteinler, Deoksiribonükleotid ve düzenleyici proteinlerden (siklinler ve protein kinazlar-CKK) bazıları sentez edilmektedir (16, 10). Hücre bölünme evresi öncesinde, DNA hasarının engellendiği veya tamir edildiği aşamalar yer almaktadır. Bu döngünün evreleri, büyüme faktörleri, sitokinler, onkogenler, siklinler, CKK gibi proteinler ve MPF (Maturation Promoting Factor) ile birlikte düzenlenmekte, evrelerin herhangi birinde aksaklık (DNA hasarı) olduğunda, tümör baskılayıcı genler döngüyü hemen durdurmaktadır. Sentezlenen DNA hasarlı veya replike edilmemişse döngü M evresine girmeden G2 evresinde durdurulmaktadır. G1 evresinde, saptanan DNA hasarı orta derecede ise tümör baskılayıcı gen (p53) tarafından p21 proteininin sentezlenmesi sağlanmaktadır. Siklin CKK kompleksi inhibe edilerek döngü G1 veya G2 evresinde durdurulmakta veya askıya alınmaktadır.

Eğer DNA hasarı çok büyük ise, p53 hücrenin apoptoze girmesine sebep olmaktadır (10, 12, 17).

### **2.1.2. Apoptozis**

Programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptozis, fizyolojik olarak hücrenin ölmesi yani kısacası hücrenin intiharıdır (18). Canlıların organizmalarındaki hücreler doğanın bir gereği olarak işlevlerini tamamladıktan sonra ölürlür. Bu hücrelerin ölümleri iki şekilde gerçekleşmektedir. Bunlardan birisi olan apoptozisin diğer bir hücre ölüm şekli olan nekrozdan farkı, nekrozun fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelmesidir (18, 19). İnsan vücudunda apoptozisin örnekleri olarak, lenfositlerin timustaki klonal seleksiyonunda ve inflamatuvar reaksiyon sonrasında ortamdan uzaklaştırılması, embriyonik gelişim esnasında, deride keratinositlerin yüzeye doğru göç edip epiderminin stratum korneum'u oluşturmaları, barsak kriptlerindeki epitel hücrelerinin döngüsü verilebilir. Ayrıca menstruasyon esnasında uterus duvarında gerçekleşen epitel doku dökülmesinde ve gözde lensin oluşumunda da apoptozis gözlenir (18-20).

Apoptozis hücreye gelen ölümcül uyarı sonrası üç aşamada gerçekleşir. İlk aşamada hücre ve hücrenin çekirdeği yoğunlaşırken sonraki aşamada hücre tomurcuklanmasını takiben apoptotik cisimler oluşur. Son aşamada ise bu cisimler fagosite edilir. Bu değişimler en iyi elektron mikroskoplarında (EM) izlenebilir (19, 20). Apoptozise gidecek hücreler komşu hücrelerden ayrılarak yüzey organellerini kaybederler. Apoptozisin en önemli özgün yönü DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. DNA'yı parçalayan bir Ca/Mg bağımlı endonükleazdır. Ayrıca, DNase I ve II'de DNA parçalanmasından sorumludur. (21, 22). Daha sonraki evrede hücre içindeki bir takım değişiklikler sonrası hücre zarında büzülme ve bunun takibinde hücrede parçalanma görülür. Bu yapılara apoptotik cisim adı

verilir. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin'in erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır. Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar (20-23).

Hücreler iki yolla ile apoptozise giderler. Bunlardan biri, hücre dışı sinyaller aracılığı ile Fas ve TNF gibi sinyal proteinlerinin hedef hücredeki reseptörlere bağlanarak oluşan sitoplazmik yoldur. Diğeri ise hücre içi sinyaller ile kaspazların ve Bcl-2 nin görev yaptığı mitokondrial yoldur.

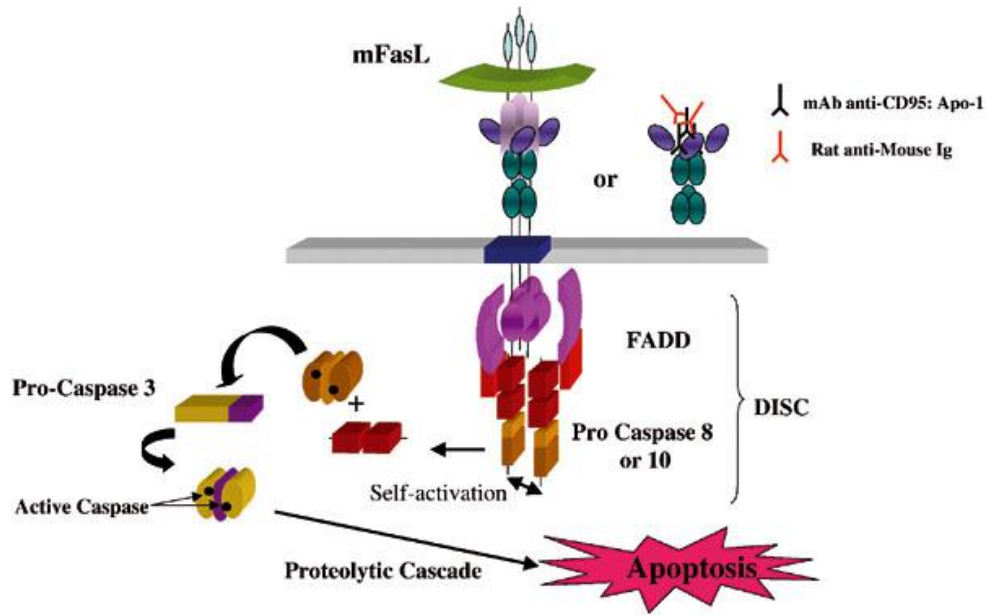
### **2.1.2.1. Sitoplazmik Yol İle Apoptozis**

İnsan vücudu hücrelerinde Fas ve TNF gibi sinyal proteinleri hedef hücrelerin zarlarında bulunan reseptörlere bağlanarak hücreyi apoptozise götürmesidir.

#### **2.1.2.1.1. Fas-Fas Ligandı veya CD95 Yolu**

Tümör nekroz faktörü ailesinden olan Fas (CD95) bir hücre yüzey reseptörüdür. Apoptozun salgıdan bağımsız mekanizması, bu reseptörün aktivasyonu ile ilişkilidir. Fas ligandı (FasL), TNF ailesinin bir üyesidir. Özellikle sitotoksik T hücreleri ve NK hücreleri üzerinde bulunur (20). Ligand reseptör bağlanması sonucu apoptotik işlem başlar. Bu mekanizma, bir immün tepki sonunda aktive olmuş T hücrelerinin uzaklaştırılması, virüs infekte hedef hücrelerin ortadan kaldırılması, tümör hücrelerinin öldürülmesi ve birçok patolojik durumdaki hücrelerin uzaklaştırılmasında önemli rol oynar. Fas ve TNFR-1 in sitoplazmik uzantısı, bir ölüm alanını (Death Domain) içerir. Fas'ın sitoplazmik bölümü FADD (Fas Associating protein with a Death Domain protein) ve RIP (Receptör Interacting Protein) ile etkileşimdedir. Ölüm alanlarını içeren bu TRADD ve RIP proteinleri, prokaspaz-8'in aktivasyonu ile apoptozu doğrudan uyarırlar. Aktive olan kaspaz - 8 daha sonra diğeri uygulayıcı kaspazları aktive eder (20-22). Son olarak

sonlandırıcı kaspazlardan kaspaz 3 aktifleşir, sitoplazmik inaktif ICAD/CAD (deoksiribonükleaz inhibitörünü/kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz) kompleksine bağlanır. Bunun sonucunda CAD linker DNA'ya bağlanıp o bölgeyi keser, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması, nükleer laminin A yıkımıyla birlikte nükleer zarf yırtılıp nükleus dağılır (21). Şekil 2 de FAS sinyal iletim yoluyla apoptozis gösterilmiştir.



**ŞEKİL 2:** FAS sinyal iletim yoluyla apoptozis (21)

#### 2.1.2.1.2. Tümör Nekroz Faktör (TNF) Sinyal İletim Yolu

Sinyal iletimi yapan ve bir sitokin olan TNF alfa proteini, hücre zarında bulunan Tümör Nekroz faktör reseptörü 1 (TNFR-1) ile kompleks oluşturduktan sonra reseptörün sitozole uzanan ölüm bölgesine olan TRADD (TNFR' e bağlı ölüm bölgesi) proteini bağlanır. TRADD diğer kısmı ile de FADD (Fas adaptör ölüm bölgesi) adaptör bölgesine bağlanır. Bu bağlantılar sonucu kaspaz 8 aktifleşir, o da kaspaz 3 ü aktifler. Sonrasında Fas sinyal iletim yolundaki gibi bir dizi olay sonucu hücre apoptoza gider (21).

### **2.1.2.2. Mitokondrial Yol İle Apoptozis**

Mitokondri aracılığıyla apoptozda kaspazlar ve Bcl-2 proteinleri görev yapar. Kaspaz gen ailesi üyeleri hücreleri apoptoza götüren proteinleri kodlar. Sistein proteaz ailesinden olan kaspazların aktif merkezinde sistein yer alır ve sitoplâzma içinde inaktif prekürsörler olarak bulunur. Bir proteaz aktivasyon dizisi başlatarak sitoplazmik proteinlerin yıkımında rol almaktadır, bu sırada nukleazlar da aktive olarak DNA fragmentasyonu ve RNA degradasyonu gerçekleşmektedir.

#### **2.1.2.2.1. Kaspazlar**

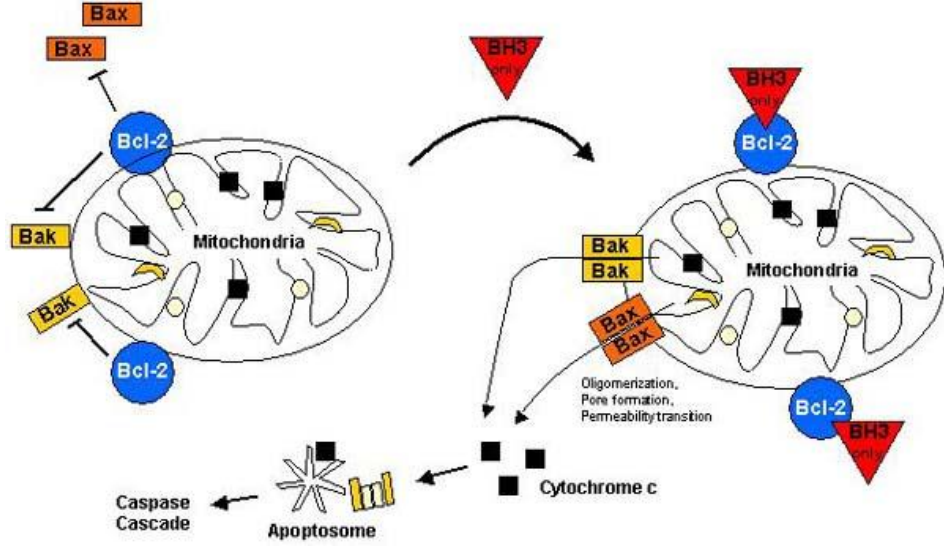
Sitokrom c' nin sitoplâzma içine salınması ile apoptozun son basamaklarından sorumlu enzim sistemi olan kaspazlar aktive olur. Günümüzde sitozolde bulunan 14 kaspaz tanımlanmıştır. Bunlar, sitokin üretimine katkıda bulunanlar (kaspaz 1, 4, 5, 13), proteolizisin "başlatıcıları" (kaspaz 2, 8, 9, 10) ya da "sonlandırıcı" (kaspaz 3, 6, 7) olarak sınıflandırılırlar (21-24). Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanırlar ve efektör kaspazları aktive ederler. Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin (IAP) efektör kaspazları inhibe ederek apoptozu engellediği gösterilmiştir. Ayrıca IAP (Inhibitors of Apoptosis) ailesinin kaspazlardan ayrı olarak, transkripsiyon faktörlerinin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolünde de yer alarak apoptozu inhibe ettiği bilinmektedir (21). Bu inhibitörler malign hücrelerde aşırı olarak gözlenirler. Kaspazlar, proteinleri yalnızca aspartik asit bulunan bölgelerden keser, bu nedenle cysteine-aspartic-acid-proteases adını almışlardır. Böylece kaspazların kısıtlı proteolizisi nedeniyle, hücrede lizis şekillenmez ve apoptotik cisimcikler oluşur (24, 25).

#### **2.1.2.2.2. Bcl-2 / Bax**

Apoptozun regülasyonu Bcl-2/Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu proteinlerden Bcl-2, Bcl-XL ve Mcl-1 apoptozu engellerken; Bax, Bad,

Bid, Bak, Bcl-xs apoptozu uyarır. Bcl-2 / Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondri ve çekirdek zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de yer alırlar (20-24). Bcl-2, bir protoonkogendir ve ürettiği proteinler mitokondrinin sitoplazmaya dönük dış zarı üzerinde ve endoplazmik retikulumun iyon alışverişini düzenler ve zarın parçalanmasına karşı koruyucu etki gösterirler (21-23). Bu proteinlerin her biri Bcl-2 Homoloji bölgesi (BH1,BH2,BH3,BH4) içerirler. Bcl-2 ailesi ayrıca reaktif oksijen düzeylerinin apoptoz üzerindeki etkilerini pro-oksidan gibi davranarak kontrol eder.

Bax proteinleri sitoplâzma da apoptotik sinyalin alınmasından sonra mitokondri zarının "permeabilite geçiş poru" na doğru yönelirler ve buraya bağlanırlar (20-23). Bu bağlanma, seçici iyon permeabilitesini azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplâzma ya geçerler. AIF, doğrudan kromatin kondansasyonunun ve nükleer fragmantasyonun meydana geldiği çekirdeğe doğru yönelir. Sitoplâzmadaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom c, bir sitoplâzma proteini olan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktivite edici faktör-1) 'in aktive eder. Sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanması prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks "apoptosom" olarak isimlendirilir (22-25). Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır. Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanır. Bu yüzden apoptozda enerji gereksinimi vardır. Şekil 3 de Bcl/Bax yoluyla apoptozis gösterilmiştir.

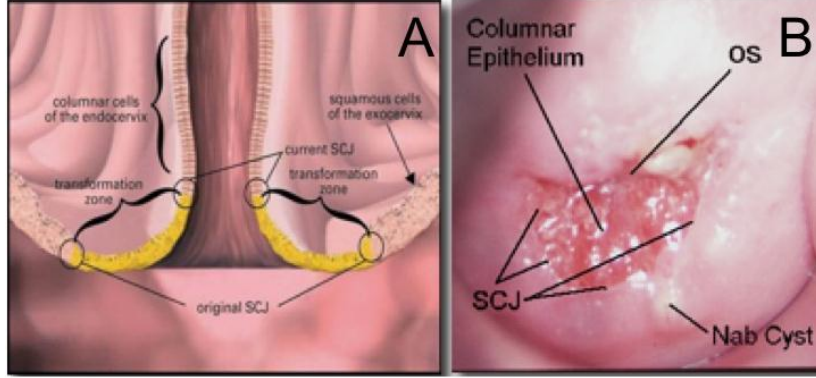


**ŞEKİL 3.** Bcl2/ Bax yoluyla apopitozis (23)

## 2.2.Serviks Kanseri

### 2.2.1.Serviks anatomi ve histolojisi

Serviks, uterusun vajinaya açılan 2 cm uzunluğunda olan ektoserviks ve endoservikal kanaldan oluşan bir parçasıdır. Serviksin ektoserviksi çok katlı yassı epitel (skuamoz), endoservikal kanal ise kolumnar ya da glandüler epitelyum ile döşelidir. Bu iki epitel tabakasının birleşim yerine skuomakolumnar bileşke (SKB) denilmektedir. Şekil 4' de skuomakolumnar bileşke gösterilmektedir. SKB, intrauterin yaşamda oluşmakta olup yaşamın sonraki dönemlerinde yeri değişmektedir. Puberte döneminde bu bileşke daha dışta olup kolumnar epitel dış etkenlere açıktır. Travma, hormonal faktörler, PH değişiklikleri, enfeksiyonlar ve gibi uyarılara yanıt olarak kolumnar epitel skuamoz metaplazi ile dönüşür. Dönüşüm sonrası yeni bir bileşke oluşur ve bu bileşkeye ise yeni ya da fizyolojik SKB denmektedir. Orijinal SKB ile fizyolojik SKB arasındaki bu sürekli değişim bölgesine transformasyon zonu denir. Serviksin prekanseröz lezyonlarının %90'ının bu bölgeden oluştuğu düşünülmektedir (26, 27).



**ŞEKİL 4.** Serviksde orjinal ve yeni SCB ve Transformasyon zonun şematik görünümü (A), Normal bir servikte yeni SCJ yeri ve Transformasyon zonu (Nab Cyst lerinin olduğu bölge) görünümü (B)

### 2.2.2.Epidemiyoloji

Serviks kanseri dünyada meme kanserinden sonra 4. sırada gelmektedir (1). Yılda 500.000' nin üzerinde hasta yeni tanı almakta ve serviks kanseri nedeniyle 250.000 üzerinde kadın hayatını kaybetmektedir (1,2). Serviks kanserine bağlı ölümlerin %80' i gelişmekte olan ülkelerde olmaktadır ve yaşa göre standardize edilmiş değerlere bakıldığında yüksek riskli bölgeler olan, doğu afrikada (42. 7), Güney ve orta afrikada (31. 5 ve 30. 6, sırasıyla) yaklaşık 100.000'de 30 civarında iken, Avustralya- Yeni Zellanda' da (5. 5), Batı Asya' da (4.4); 100.000' de 2 kadın'a kadar azalmaktadır (1). Tablo 1' de 2012 yılındaki serviks kanserinin bölgelere göre insidansı ve mortalitesi görülmektedir. Serviks kanserine ilerleyişte displastik lezyonların yavaş seyretmesi ve yine bu lezyonların erken tanınması, 1960'lı yıllardan sonra pap testinin yaygın kullanımı ile serviks kanserinde gelişmiş ülkelerde %70 oranında azalma sağlanmıştır (1, 2).

**TABLO 2.** 2012 yılında Dünyada serviks kanseri insidansi ve mortalitesi (1)

<b>Tahmini Sayı(Binde)</b>	<b>İnsidans</b>	<b>Mortalite</b>
Dünya	528	266
Gelişmiş Bölgeler	83	35
Gelişmekte Olan Bölgeler	445	230
Avrupa (EURO)	67	28
Amerika Birleşik Devletleri	13	7
Çin	62	30
İndia	123	67
Avrupa Birliği	34	13

Türkiye’de 2009 yılı Sağlık Bakanlığı verilerine göre serviks kanseri, şekil 5’ deki grafikte de görüldüğü gibi kadınlarda bütün yaş grupları göz önüne alındığında en çok görülen kanserler arasında 10.sırada yer almaktadır (2)

Hastalığın görülme yaşı, 40 yaşından sonra giderek artmaktadır (2).Gelişmekte olan ülkelerde hastaların %85’ inin geliş anında evresi FIGO evrelemesine göre evre III ve IV’ tür (28). Türkiye’de ise tanı alan hastaların tanı anında tümör, %52,1’ si servikte lokalize, %37,3 ‘ü bölgesel yayılım göstermiş, %10,6 ‘sı ize uzak metastaz yapmıştır (2).



**ŞEKİL 5.** Kadınlarda en sık görülen ilk 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızlarının dağılımları (Birleşik Veri Tabanı, 2009)(Dünya standart nüfusu, 100.000 kişide) (2)

### 2.2.3.Risk faktörleri

#### 2.2.3.1. HPV Enfeksiyonu ve Cinsel Davranışlar

Serviks kanserinde en önemli risk faktörü onkojenik tiplerle oluşan HPV enfeksiyonudur. Kanser gelişiminde HPV' nin mutlaka var olması gerektiği, diğer risk faktörlerinin ya virüsle karşılaşma oranlarını arttırdığı ya da viral persistansı ve karsinojenik süreci hızlandırdığı için önemli olduğu bilinmektedir (29-32). HPV enfeksiyonu ve dolayısıyla serviks kanser gelişmesinde cinsel davranışlar önem kazanmaktadır. Bunlar, erken yaşta başlayan cinsel aktivite, cinsel partner sayısının fazla olması (yaşam boyu 6'dan fazla olması), ya da cinsel partneri fazla olan erkekler ile cinsel birliktelik gibi durumlardır.

#### 2.2.3.2. Sigara

Hem aktif hem de pasif sigara içiciliği serviks kanseri riskini artırır. Sigara içenlerde içmeyenlere oranla servikal kanserin malignleşme riski daha yüksek bulunmuştur. Bu risk içilen sigaranın miktarı ile doğru

orantılıdır. Serviks kanseri tiplerinde sigara kullanımının skuamöz hücreli kanser oranında belirli bir artış ile ilişkilidir, ancak adenokarsinom ile ilişkisi bulunamamıştır. Sigaranın bu etkisinin içeriğindeki zararlı maddeler olan hidrokarbon, fenol gibi zararlı, kanserojen maddelerin servikal mukusta yüksek oranda bulunmasından dolayı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu maddeler o bölgede bulunan immunitede rol oynayan langerhans hücrelerinin miktarını azaltıp fonksiyonunu bozmakta, böylece HPV'nin vücuttan temizlenememektedir (32-34).

### **2.2.3.3. Oral Kontraseptifler**

Oral kontraseptiflerin( OK) servikal kanser riskini artırmaları konusunda çeşitli teoriler mevcuttur. Örnek olarak OK kullanan kadınların bariyer yöntemi kullanımının az olması verilebilir. OK kullanımına bağlı kolumnar epitelin eversiyonu hızlanmakta ve immatür metaplastik epitel böylece karsinojenlerle karşı karşıya kalmaktadır. OK' ler kan folat düzeyini azaltarak epitel hücrelerinde megaloblastik değişikliklere yol açmakta ve muhtemelen buna bağlı CIN ve invaziv kanser gelişimi ortaya çıkmaktadır (34). OK içindeki hormonlar bazı viral onko proteinlerin sentezini artırıcı rol oynamaktadırlar. Beta östradiol E6 ve E7 bölgelerinin transkripsiyonunu 7-8 kat artırmaktadır. Nitekim bir antiprogesteron olan RU 486 nın bu viral proteinlerin indüksiyonunu durduğu gösterilmiştir (35).

### **2.2.3.4. Diğer Faktörler**

Menarş yaşı, menopoz yaşı veya menstruel siklus karakterinin serviks kanseri riskini etkilediğine dair çok az kanıt vardır. Ancak çok sayıda doğum yapmakla artmış risk arasında bağlantı olduğunu bildiren yayınlar mevcuttur. Paritenin etkisini açıklamaya yönelik olarak doğum travması ve gebelikteki hormon düzeyleri öne sürülmüştür.

Intrauterin diestilstilbestrol maruziyeti, hormon replasman tedavisi, immun yetmezlik diğer risk faktörleridir (36). Bunların yanı sıra folat,

karoten ve C vitamininden fakir diyet de serviks kanseri risk faktörleri içinde sayılabilir. Demografik faktörler içerisinde ileri yaşa ek olarak ırk (siyah), Asya, Afrika ve Latin Amerika yerleşimi, düşük sosyoekonomik durum ve düşük eğitim düzeyi serviks kanseri ile ilişkilendirilmiştir.

#### 2.2.4. HPV ve serviks kanseri ile ilişkisi

HPV, cinsel yolla bulaşan, çift sarmallı, dairesel, 8000 baz çifti içeren, zarfsız bir DNA virüsü olup, türe özgüdür. Günümüzde yaklaşık 120 civarında HPV tipi tanımlanmıştır (37). Onkojenik özelliklerine göre düşük riskli, orta riskli ve yüksek riskli olarak 3 şekilde gruplandırılmaktadır. HPV tip 16, en onkojenik tip olarak düşünülürken tip 18 ise ikinci sırada bulunmaktadır (38). Yapılan çalışmalarda tüm dünyadaki servikal kanserlerin %70'inden HPV Tip 16 ve 18'in sorumlu olduğu düşünülmekle birlikte toplam sekiz HPV tipinin (16, 18, 31, 33, 45, 52, 58, 35) %95 pozitif vakadan sorumlu olduğu belirlenmiştir. Tablo 2' de genital HPV tiplerinin sınıflaması verilmiştir (39).

**TABLO 3.** Genital HPV sınıflaması (39)

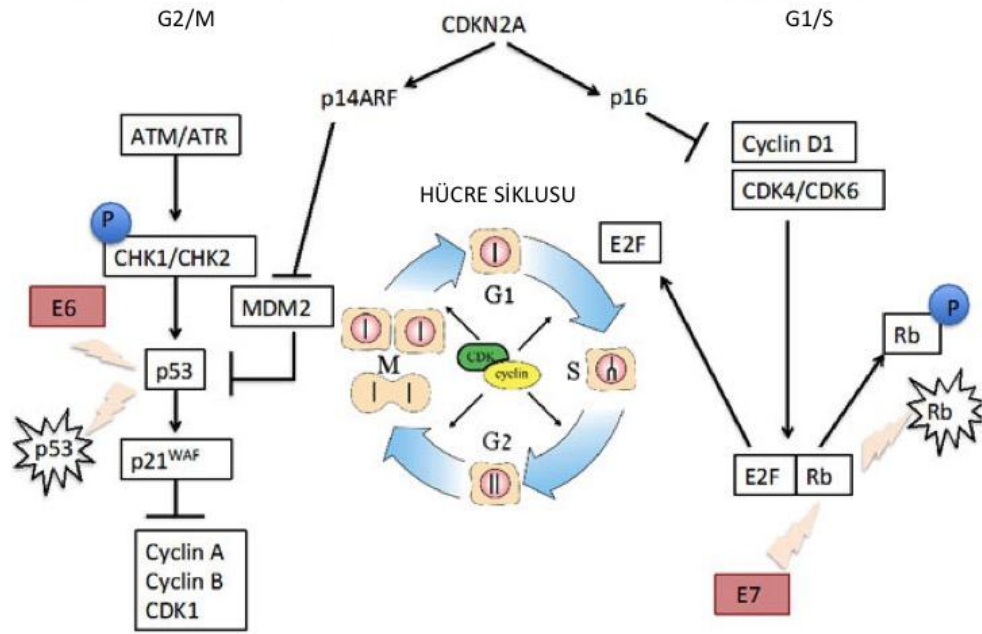
Sınıflama	HPV Tipleri
Yüksek riskli veya karsinojenik	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59
Olası karsinojenik	26, 53, 66, 68, 73, 82
Düşük riskli	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81, 89

Viral genom hayat siklusundaki gen ekspresyon sırasına göre fonksiyonel olarak erken (E: Early) bölge, geç bölge (L: Late) ve uzun kontrol bölgesi (long control region; LCR) olmak üzere üç bölgeye bölünür. Viral genomun erken bölgesi, viral DNA replikasyonunu başlatan, infeksiyon ve entegrasyonda major rol oynayan proteinleri kodlamaktadır. E1, viral genomun devamı ve replikasyonunu, E2 transkripsiyonunu düzenleyen proteinleri, E5 epidermal büyüme faktörünü uyararak hücre büyümesini artırırken, p21 tümör süpresör genini baskılayarak hücrenin kontrol sistemini bozar (41-43). Son yıllardaki çalışmalarda E5 'in DNA hasarı yaratarak apoptozisi engellediği gösterilmiştir. Virüsün entegrasyonu sırasında E5'inde içinde bulunduğu genomun büyük parçası silinir. Bu yüzden E5' in geç dönem karsinogenezde önemli bir rolü olmadığı düşünülmektedir.

E6 ve E7 proteinleri viral DNA'nın replikasyonuna zemin hazırlarlar. E1 ve E2 viral DNA replikasyonunun başlangıcından sorumludur ancak bunun için hücrenin enzimlerine ihtiyaç duyarlar. Bu enzimatik proteinler de hücrenin S fazında aktif olarak sentezlenir. Bu yüzden HPV virüsü gerekli olan hücre gen bölgelerini aktive etmek için E7 proteinini kullanır. E6 hücrede p53 proteinine bağlanır. p53 tümör süpresör proteini olup hücre bölünmesi üzerinde negatif regülatör fonksiyonu vardır. Bu fonksiyonu hücrenin G0/G1 fazından S fazına geçişi kontrol ederek yerine getirir. Ayrıca p53 apoptozisi indükleyebilir. Böylece p53, düzeltilebilecek kromozomal hasarı olan hücrelerde hücre döngüsünü durdurarak DNA tamiri için gerekli olan onarımın yapılmasını sağlar, ayrıca ciddi kromozomal defekti olanlarda apoptozisi indükler. E6 p53'ün yıkımını hızlandırır. E6 bu etkisiyle kromozomal onarım yapılmadan hücrelerin bölünmesine, kromozomal defektli hücrelerin birikmesine ve apoptotik etkinin ortadan kalkmasına katkıda bulunur. Kromozomal onarımın yapılamaması genetik instabiliteye neden olarak malign transformasyon sürecine katkıda bulunur.

E7 ise aktif retinoblastoma genini inaktive eder (44,45). Rb proteini DNA hasarına bağlı olarak hücre döngüsünü durdurur veya apoptozisi indükler. Rb proteininin fosforile olmayan formu E2F transkripsiyon faktorüne bağlanarak, inaktive eder. E2F DNA sentezini ve siklin fonksiyonunu kontrol eder. E7 E2F/Rb kompleksine bağlanarak E2F'in kompleksten ayrılmasını ve siklin A'nın hücre siklusunu uyarmasını sağlar. Böylece E2F'in hücre döngüsünü uyarıcı özelliği Rb'nin baskısından kurtarılmış olur. Ayrıca E7, Rb proteininin yıkılmasına neden olur.

Ayrıca E6 ve E7 proteinleri birçok faktörle etkileşerek immün yanıtın oluşmasını önlerler (46-48). Antikor üretimi enfeksiyonun yayılımını ve tekrarlamasını önlemede önemlidir. Viral klirensi sağlayan ise hücreyel immünitedir (49). Viral replikasyonun geç döneminde kodlanan geç genlerden L1 geni major kapsid proteinini ve L2 geni minor kapsid proteinini kodlar. Her iki geç bölge genleri prekanseröz ve malign hücrelerde eksprese edilmezler. Ancak bu genler viral aşı yapımında son derece önemlidir (50). Şekil 6 'da HPV'nin karsinogenez süreci verilmiştir.

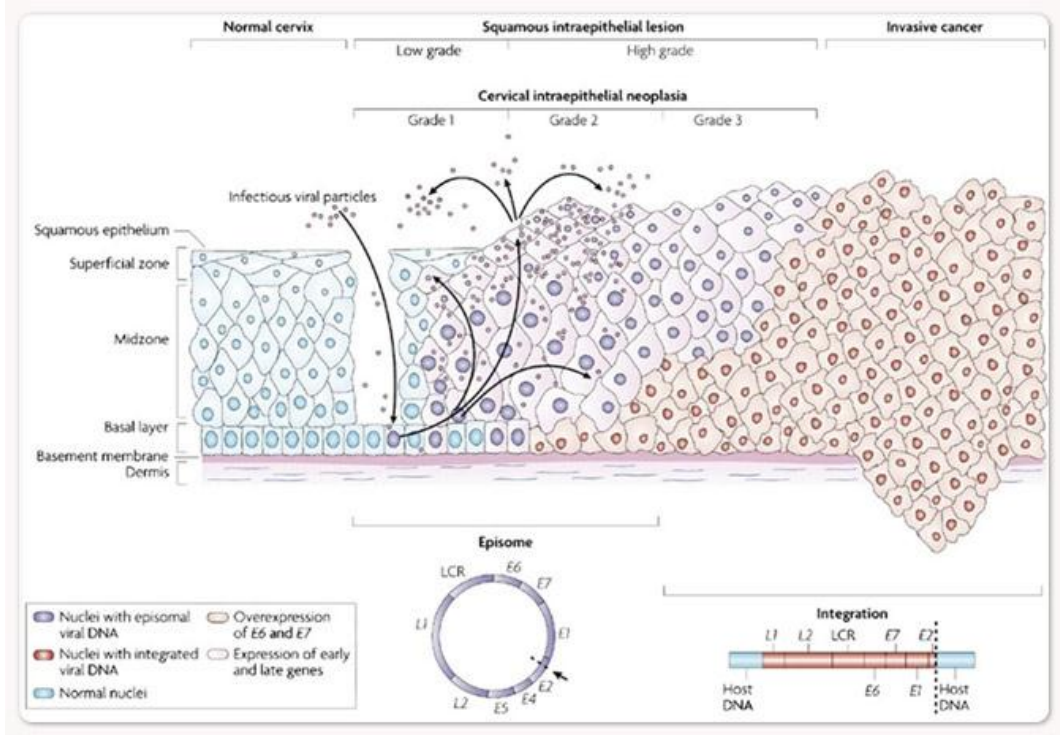


**ŞEKİL 6.** HPV karsinogenezi (47)

HPV ile enfekte olan kişinin immun yanıtına ve HPV tipine bağlı olarak yaklaşık 10-18 ay içerisinde HPV vücuttan eradike edilir (51). Eğer kişinin vücudu HPV' den temizlendiyse sürecin sonunda kişinin CIN 3 ya da servikal kansere ilerleme riski, HPV ile hiç karşılaşmayan kişi ile aynıdır (52). HPV ile enfekte olan ve tedavi edilmeyen kadınların yaklaşık %1-2 kadarında serviks kanseri gelişmektedir (53). Kansere ilerleyiş için genellikle 10-15 yıl gerekir ve bu dönemde sitolojik bulgu olarak skuamöz intraepitelyal lezyon (squamous intraepithelial lesion; SIL) veya histopatolojik bulgu olarak servikal intraepitelyal neoplazi (cervical intraepithelial neoplasia; CIN) diye tanımlanan prekanseröz lezyonlar gelişir. Şekil 7'de servikal lezyonların kansere ilerlemesi gösterilmiştir.

Prekanseröz lezyonlar epiteldeki atipik değişikliklere göre sitolojik olarak düşük dereceli (low grade SIL; LSIL) ve yüksek dereceli (high grade SIL; HSIL) skuamöz intraepitelyal lezyonlar olarak tanımlanır. Histolojik sınıflandırmada CIN 1 LSIL'e, CIN2 ve CIN3, HSIL'e dahildir. Hafif displazik lezyonlar CIN 1, orta displazi CIN2, ağır displazi ve

karsinoma in situ CIN3'e karşılık gelir (54). Histoloji ve HPV ilişkisi göz önüne alındığında ise skuamöz hücreli kanserlerin %95'inde, adenokarsinomların da %90'unda HPV DNA pozitif bulunmuştur. Skuamöz hücreli kanserlerden daha çok HPV 16 sorumludur (55).



**ŞEKİL 7.** Servikal lezyonların kansere ilerlemesi

## 2.2.5. Serviks Kanseri Tarama Yöntemleri

### 2.2.5.1. Servikovajinal Sitoloji

Taramada yaklaşık 60 yıldan beri kullanılan test, George Papanicolaou tarafından geliştirilmiş olan ve sitolojik değerlendirme yapan Pap testidir. Pap testi maliyeti düşük ve etkin olan bir testtir. Serviksten ve etrafından alınan örnekler lam üzerine yayılıp, fikse edildikten sonra laboratuvarında incelenmesine dayanır. 1950'den beri servikal kanser insidansını %79, mortaliteyi %70 oranında azaltmıştır. Konvansiyonel ve sıvı bazlı (Thinprep) olarak yapılmaktadır.. Birçok

çalışmada sıvı bazlı teknik sayesinde daha çok tanısal servikal hücrenin toplandığı ve örnekten hazırlanan preparatlarda hücre kümeleşmesi, kan ve yangısal değişikliklere bağlı artefaktların daha az olduğu gösterilmiştir. Böylece daha iyi örnek hazırlanmakta ve daha iyi yorum yapılması sağlanmaktadır (56).

#### **2.2.5.2. HPV Testi**

Pap testinin sensitivitesinin %50-80' dir. Bu testin, yalancı negatiflik oranının fazla olması ve değerlendirmesi için sitolog veya patolog gerektirmesi nedeniyle kapsama oranları çok artmamaktadır. Bu nedenle son yıllarda HPV testi ile tarama geliştirilmiştir. 2014 yılından itibaren ülkemizde serviks kanseri sadece HPV testi ile yapılmaktadır.

HPV testleri, hybrid capture, PCR, amplifikasyon ve genotip tayini yöntemleri ile yapılmaktadır. Hybrid capture yönteminde yüksek riskli olan 13 HPV tipinin varlığı araştırılmaktayken PCR yönteminde ise bunlara ek olarak tip 66'nın varlığına da bakılmaktadır. HPV pozitif olan olgulardan refleks sitoloji yapılır. Sitoloji ile birlikte yapılması yanlış negatiflik oranını azaltarak taramanın etkinliğini artırmaktadır. Anormal sitoloji ve HPV pozitif gelenlerde CIN III ve kanser gelişme riski artar. HPV negatif gelen kadınlarda tekrar tarama 5 yıl sonra yapılabilir.

#### **2.2.5.3 Diğer**

Serviks kanseri taraması ayrıca muayene sırasında asetik asetik uygulanıp çıplak gözle, servikografi ya da speküloskopi ile de yapılabilir. Muayene sırasında ayrıca lugol kullanılıp lugol tutan ya da tutmayan alanlar araştırılabilir.

#### **2.2.6. Serviks Kanserinde Tanı ve Evreleme**

Serviks kanserlerinde tanı, pozitif taraması olan hastaların değerlendirilmesi sonucu yapılan kolposkopik biyopsiler ya da eksizyonel işlemler (konizasyon, LEEP gibi işlemler ile) sonucu

konmaktadır. Gross olarak muayene sırasında saptanan lezyonlardan yapılan biyopsiler ile de tanı konulabilir.

Serviks kanserinin en sık iki histolojik alt tipi skuamöz hücreli karsinom (%85-90) ve adenokarsinom (%10-15)' dur. Serviks nadir olarak mikst servikal karsinomların, sarkomların ve malign lenfomaların yerleşim yeri olabilir. Bu tümörlerin prognozları daha kötü seyretmektedir (57).

Tanısı konulan serviks kanseri hastaların evrelemesi klinik olarak, pelvik muayene ( gerekirse anestezi altında muayene) ve görüntüleme yöntemleri ile yapılır. Sadece evre 1'in alt evreleri olgularda tümörün boyutu ve mikroskopik yayılım patolojik olarak evrelenir (58).

### **2.2.7. Serviks Kanseri Tedavisi**

Serviks kanserinin tedavisinde hem primer lezyon hem de potansiyel yayılma alanları tedavi edilmelidir. Tedavi seçenekleri arasında cerrahi tedavi, radyoterapi ve kemoterapi yer almaktadır. Serviks kanserinde tedavinden fayda evrelere göre değişiklik göstermektedir. Radyoterapi kanserli hastalara tüm evrelerde uygulanabilir. Cerrahi tedavi ise sadece erken evre olan Evre I ve IIA olan hastalara uygulanabilir (59). Erken evrelerde cerrahi ve radyoterapinin 5 yıllık sağ kalım oranları birbirine benzerdir (3, 4). Evre IIB ve III kanseri olanlar, cisplatin temelli kemoterapi ile birlikte veya tek başına radyoterapi ile tedavi edilirler. Evre IV kanserli kadınlar genellikle palyatif radyoterapi ve/veya kemoterapi ile belirtileri ölçüsünde tedavi edilirler (59).

#### **2.2.7.1.Cerrahi Tedavi**

Evre I ve IIA serviks kanserleri cerrahi ile tedavi edilebilir (60). Küratif cerrahi de, primer tümör dokusu ve tümör dokusunun tüm uzantıları birlikte çıkarılır. Palyatif cerahi ise radyoterapinin başarısız olduğu ya da komplikasyonları (rektovaginal ve vezikovaginal fistül) nedeni ile

yapılmadığı durumda semptomları ortadan kaldırmak için yapılan cerrahidir (3). Overin metastatik lezyonları nadir olduğu için, özellikle genç kadınlarda ooferektomi yapılmayabilir (3, 4, 61). Radikal histerektomi görülen komplikasyonlar üreter darlığı, mesane disfonksiyonu, kabızlık, yara açılması, lenfosit ve lenfödemdir. Ayrıca vezikovajinal fistül, üreterovajinal fistül, mesane atonisi, bağırsak obstruksiyonu, tromboflebit, pelvik enfeksiyon ve kanamada gözlenebilir (60). Cerrahi tedavi sırasında en fazla mortaliteye neden olan komplikasyon pulmoner embolidir (61).

Evre IA1 serviks kanserleri, lenf nodu tutulumu için düşük risk taşır, bu yüzden tedavi sonrası prognoz da mükemmeldir. Evre I tümörler içerisinde Evre IA1 lezyonlar sadece konizasyon ile etkin olarak tedavi edilebilmektedir. Ancak total intrafasyal histerektomi (tip 1 histerektomi) abdominal, vajinal, yada laparoskopik yaklaşım aracılığıyla doğurganlığını tamamlamış kadınlarda tercih edilir (3,61).

Evre IA2 serviks kanserlerinde ise konservatif tedavinin güvenliği henüz kanıtlamadığı için bu evrede genellikle modifiye radikal histerektomi ve pelvik lenfadenektomi tercih edilmektedir. Ancak fertilitenin korunması istenen olgularda radikal trakelektomi ve lenfadenektomi tedavisi de uygulanabilir. Yine bu operasyon sırasında gebelik süresince servikal yetmezliği engellemek amacıyla servikal serklaj konulabilir (3, 60, 61).

Evre IB ve IIA tümörü bulunanlar da cerrahi tedavi ve radyoterapiden fayda sağlamaktadırlar. Burada hastanın menopoz durumu, yaş, eşlik eden medikal hastalık, tümörün histolojisi ve çapı göz önünde bulundurularak karar verilir. Genellikle Evre IB ve IIA' ya kadar olan tümörlerde çoğunlukla, over fonksiyonunu korumak isteyen ve radyoterapi sonrası cinsel ilişki fonksiyonunun değişme kaygısı duyan vücut kitle indeksi düşük olan hastalarda radikal histerektomi tercih edilir.

Evre IV A gibi uzak metastaz olmaksızın mesane ve barsaklara yayılımı olan durumlarda pelvik ekzantrasyon yapılabilmektedir. Bu işlemde mesane, rektum varsa uterus ve çevre dokuların çıkarılması amaçlanmaktadır.

#### **2.2.7.2. Radyoterapi**

Serviks kanserlerinin hastanın yaşı, kilosu ve tıbbi durumuna bakılmaksızın tüm evrelerinde kullanılacak primer tedavi yöntemi olup ileri evre servikal kanser tedavisinin temelini oluşturur (3, 4). Erken evre serviks kanserlerinde de cerrahi tedavinin alternatifi olmaktadır. Ayrıca radyoterapi primer küratif tedavi haricinde vaginal kanama ve kemik ağrıları gibi semptomları düzeltmek içinde kullanılabilir. Ancak tedavi süresinin uzunluğu radyoterapinin dezavantajlarından (3). Radyoterapi hem intrakaviter olarak brakiterapi hem de external beam radyasyon yolla uygulanabilmektedir (4). Ancak tedavi süresinin uzunluğu radyoterapinin dezavantajlarından (3).

Radyoterapi sonrası gelişen komplikasyonlar arasında vaginal kısılma ve fibrozis seksüel disfonksiyon görülme olasılığı, tıbbi veya cerrahi girişim gerektirecek düzeyde kronik mesane ve bağırsak problemleri, rektovaginal ve vezikovaginal fistül gelişimi sayılabilir (3,60).

Kanserin evresine göre radyoterapinin etkinliği değişmektedir (4). İleri evre serviks kanserlerinin (Evre IIB ve IV) büyük çoğunluğu kötü prognoza sahiptir. Yine bu evre kanserlerin 5 yıllık sağ kalımı %50' den azdır. İleri evre serviks kanserinde platin–temelli kemoterapi ile birlikte radyoterapi uygulanabilir. Bu rejimler sağ kalımı arttırmaktadır.

Evre IVB gibi uzak metastazın bulunduğu olgular oldukça kötü prognoza sahiptir ve yapılan radyasyon tedavisi vajinal kanama ve ağrıyı kontrol etmek için kullanılır. Yine palyasyon amacıyla bu evredeki hastalara sistemik kemoterapi verilebilir.

### 2.2.7.3.Kemoterapi ve Hedefe Yönelik Tedavi

Klasik kemoterapik ilaçlar 1940' lı yıllarda kullanılmaya başlanmış olup günümüzde de halen birçok kanser türünde sistematik tedavisinde bel kemiğini oluşturmaktadır. Ancak kanserin mekanizması aydınlatıldıkça, kansere neden olan bu mekanizmaları ve kilit molekülleri hedefleyen hedefe yönelik tedaviler kanser tedavisi prensiplerinde ve pratiğinde önemli gelişmelere neden olmuştur.

Kemoterapinin serviks kanserinin primer tedavisinde ise faydaları sınırlıdır (3, 4). Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından serviks kanseri tedavisi için radyoterapi gereken hastalarda tedaviye cisplatin temelli kemoterapinin de eklenmesinin uygun olacağı bildirilmiştir (61). Bu sebepten serviks kanser için de, kimi kanser gruplarında olduğu gibi, araştırmacılar yeni hedefe yönelik tedavilerin üzerinde durmaya başlamışlardır.

Hedefe yönelik tedaviler, kanser hücrelerine özgü olan yollar üzerine moleküler düzeyde etki ederek hücre büyümesi, hücre siklusu kontrolü, apoptozis ve anjiyogenez üzerine etki ederler. Böylece yapılan tedavilerde sadece kanser hücreleri hedef alınarak tedavinin etkinliği yanında normal dokulardaki toksisiteyi de minimal düzeye indirir. Hedef tedavi olarak kullanılabilen ilaçlar arasında monoklonal antikolar, küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörleri, anjiyogenez inhibitörleri, proteozom inhibitörleri, histon deasetilaz inhibitörleri, gen tedavileri ve aşılardan sayılabilir.

Kanser hücrelerinin nasıl bir yol izleyeceğini öncelikle genomik eksiklikler belirler. Çevredeki diğer hücreler ile ve çevresel faktörlerle etkileşimi ise buna katkıda bulunur. Bu etkileşim hücrelerin membranlarındaki reseptörler ve hücre içindeki ikincil mesaj molekülleri (sinyal ileti molekülleri) yoluyla olur. İkincil mesaj molekülleri farklı kinaz sistemlerini aktive ederler ve sonuçta farklı gen ekspresyonlarına neden olarak hücre büyümesi proliferasyonu, sağ kalımı gibi temel fonksiyonlar üzerine etki ederler.

## **2.3. Tirozin Kinazlar, Tirozin Kinaz İnhibitörleri Ve Hedef Tedavideki Yerleri**

Sinyal iletimi yollarını ve sinyal proteinlerini hedef alan onkojenik mutasyonlara sık olarak rastlanmaktadır. Sinyal iletiminde meydana gelen değişimler hücrenin çoğalma ve/veya yaşama işlevlerinin kontrolünü ortadan kaldırır. Böylelikle, onkojenik sinyal iletimi tümör gelişimi ile invazyon/metastaz sürecinde etkin rol oynamaktadır. Sinyal iletiminde rol oynayan protein kinaz ailesinde yer alan tirozin kinazların inhibisyonu, çeşitli solid tümörlerin hedefe yönelik tedavisinde etkili olabilmektedir.

### **2.3.1.Tirozin kinazlar**

İnsan genomunda yaklaşık 30000' nin üzerindeki genin %20'si sinyal iletimde görev alan proteinleri kodlamaktadır (5). Bu proteinler arasında hücre membranında yerleşen reseptörler, G-proteinler ve sinyal ileten enzimler yer almaktadır.

Tirozin kinazlar (TK), adenosin trifosfatın (ATP) yapısında bulunan fosfat atomunun polipeptitlerdeki tirozin rezidülerine transfer edilmesinde rol oynarlar. İnsanlarda en az 90 TK ve 43 TK benzeri gen bulunmaktadır. Bunlar hücre proliferasyonu, diferansiyasyon, hücrenin canlılığı ve hücre hareketi gibi önemli regülatuar fonksiyonlarda rol alırlar. TK' ler başlıca reseptör yapıda olanlar ve reseptör yapıda olmayanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Reseptör yapıda olan TK' ler, bir adet N-terminal ekstraselüler ligand bağlanma bölgesi, bir adet basit yapıda transmembran bölgesinde sabit olan alfa heliks ve bir adet katalitik bölgeyi içinde bulunduran sitozolik C-terminal yapısına sahip transmembran glikoproteinlerdir. Reseptör yapıda olmayan TK' ler de ise transmembran yapılar yoktur. Bunlar sitozol, nükleus ve plazma membranının iç kısımları gibi çeşitli hücre içi lokalizasyonlarda bulunurlar (62, 63).

Membranda yerleşim gösteren proteinlere reseptör tirozin kinazlar (RTK) denilmektedir. RTK süper ailesinde 58 transmembran protein bulunmaktadır. Bu reseptörler arasında insülin reseptörü, büyüme faktörleri (EGF, VEGF, PDGF, FGF, NGF) reseptörleri ve efrin reseptörleri (EphA, EphB) yer almaktadır (63). Reseptör yapıdaki TK' ler ekstraselüler alana ligandın bağlanması ile aktive olurlar. Sonuçta reseptör oligomerleri oluşur, stoplazmik membrana bitişik olan bölgenin inhibitör etkinliği ortadan kalkar ve kinaz aktivasyon bölgesindeki regülatuar tirozin molekülünün otofosforilasyonu gerçekleşir. Bu değişiklikler neticesinde kritik aminoasit rezidülerinin yeniden düzenlenmesi gerçekleşerek artmış katalitik aktivite meydana gelir. Daha sonra otofosforilasyon, sinyal proteinlerini hücre membranına toplayıp çoklu sinyal yollarını aktive ederek sinyal proteinleri için bağlanma bölgeleri oluşturur. Adaptör proteinlerin ortak yapısal özelliği SH2 (Src-homology-2) bölgeleri içermeleridir. Bu proteinler, SH2 bölgeleri aracılığıyla reseptöre bağlanarak, RTK ile sitoplazmadaki efektör proteinleri arasında köprü görevi yapmaktadır. RTK aktivasyonunun sonlandırılmasından fosfataz grubu proteinler sorumludur. Buna göre, fizyolojik koşullarda sinyal iletimi tersinir özellik taşır ve RTK aracılı iletim kontrol altında tutulur. Karsinogenez sürecinde, sürekli ve kontrolsüz RTK aktivitesi söz konusudur (5).

Sitoplazmik protein kinazlar arasında Src, Abl, fokal adezyon kinazı (FAK) ve "Janus Family Kinases (JAK)" proteinleri yer almaktadır (5). İstirahat halindeki hücrelerde bu proteinler sitoplazmada inaktif halde bulunurlar. Büyüme faktörleri veya sitokinler ile hücrenin uyarılmasından sonra aktif hale gelen bu proteinler, sitoplazmadaki veya nükleustaki hedeflerine yönelirler. Sitoplazmik tirozin kinazların sürekli aktivasyonu ve onkojenik sinyal iletimi, transformasyon, tümör büyümesi, motilite ve invazyon artışı ile anjiyogenez gibi malign fenotipe özgü hücresel olayları hızlandırır (64, 65).

Protein kinazlar dört mekanizma aracılığıyla onkojenik transformasyona yol açabilir :

1. Protoonkogenin retroviral transdüksiyonu,
2. Genomik rearanjmanlar,
3. "Gain of function (GOF)" mutasyonlar,
4. Protein kinazın aşırı sentezlenmesi (5).

### **2.3.2 Tirozin Kinazların Farmakolojik İnhibisyonu**

TK'lar farmakolojik olarak çeşitli mekanizmalarla inhibe edilebilmektedir. Bunlar;

1. Küçük moleküller, ATP veya substratların bağlanma bölgesine müdahalesiyle kinazların katalitik aktivitesini direk olarak inhibe edebilirler. Bu inhibitörlerin bazıları 'suisid substratları' olarak görev yaparak enzimin geri dönüşümsüz olarak inaktivasyonuna yol açarlar (66).

2. TK dimerizasyonunun blokajı ile TK füzyonu inhibe edilebilmektedir.

3. Reseptör TK ve onun ligandlarına karşı antikorlar ligand nötralizasyonu, ligand bağlanmasının engellenmesi, reseptör internalizasyonu ve belki de antikor ilişkili sitotoksiste aracılığıyla TK sinyalizasyonunu engellerler (6).

4. Bazı TK'lerin stabilitesi, ısı şok proteinlerine (Hsp90 vb.) bağlanması ile regüle edilmektedir. Bu ısı şok proteinlerinin inhibitörleri BCR-ABL ve HER-2'nin bağlanmasına engel olarak bu TK'lerin bozulmasına yol açabilmektedir (6).

### 2.3.3 Tirozin Kinazların Farmakolojik İnhibitörleri

Tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) çeşitli malignitelerde hedeflenmiş tedavi yaklaşımında etki edebilmektedir. Bu maddelerin genellikle temel etki mekanizmaları TK' nin katalitik bağlanma bölgesinde yarışmalı ATP inhibisyonu olmasına rağmen her birinin hedeflediği kinaz spektrumunu, farmakokinetikleri ve yan etki profilleri birbirinden farklılık gösterir (67).

TKİ' ler, reseptör TK ve onun ligandlarına karşı geliştirilmiş 'humanize edilmiş antikör TKİ (AbTKİ)' ler ve 'küçük molekülü TKİ (KMTKİ)' ler olarak iki ana gruba ayrılırlar. AbTKİ' ler, ekstraselüler yerleşimli büyüme faktörü reseptörlerini hedef alarak kanser hücresine spesifik olan antijenlere bağlanacak şekilde dizayn edilmişlerdir. Böylece reseptöre bağlanan antikörler ilgili ligandın bağlanmasına engel olarak TK' nın dimerizasyon ve aktivasyonunu engeller ya da reseptör down regulasyonunu indüklerler (68). Ayrıca bu antikörler hedeflenen tümör hücrelerine karşı immun yanıtın oluşmasını da uyarabilirler. AbTKİ' ye EBF2 reseptörüne bağlanan trastuzumab iyi bir örnektir. Diğer taraftan KMTKİ' ler ise hem reseptör hem de reseptör yapıda olmayan tirozin kinazları inhibe ederler. Bu TKİ' ler intraselüler kinaz bölgesinin aktivitesini bloke ederler. Bunlar kinaz bölgelerinin fosforilasyonunu direk olarak inhibe edebilir ya da ilave olarak devam eden sinyal kaskadındaki substratın fosforilasyonunu da inhibe ederler. Substrat fosforilasyonu normalde hem ATP hem de substratın aktif bir kinaza bağlanması ile oluşur.

KMTKİ' ler substrat fosforilasyonunu 3 temel mekanizma ile bloke ederler. Tip1 inhibitörler (sunitinib, sorafenib) aktif olan kinazın ATP cebine bağlanmak için ATP ile yarışır. Bu grup, günümüzde en fazla kullanılan gruptur ve insan genomundaki yaklaşık 500' den fazla kinazın ATP ceblerinin yapısı oldukça benzer olduğundan selektiviteleri düşüktür. Bu nedenle birden fazla kinazı inhibe edebilirler. Tip 2 inhibitörler (imatinib ve nilotinib), ATP cebi ve sadece kinaz inaktif

olduğunda bulunan komşu kısım olmak üzere kinaz üzerindeki iki ayrı bölgeye bağlanırlar. Bunlar genellikle tip 1 inhibitörlerden daha potent ve daha selektiftirler ancak yine de üçten fazla kinaz türünü inhibe edebilirler.

Tip 3 inhibitörler (ekstraselüler kinaz yolağı inhibitörleri prototipi) ise substrat tanıma bölgesi (substratın kinaza bağlanmasını bloke eden) gibi ATP cebinden uzak bir bölgeye bağlanırlar. Bu grup potansiyel olarak en selektif grup olmalarına rağmen, üretilmeleri oldukça zor olduğundan ve tahmin edildiğinden daha az etkili olduklarından, geliştirilen TKİ'ler içinde oldukça küçük bir grubu temsil ederler.

Sonuç olarak KMTKİ'ler yapısal olarak AbTKİ'lerden daha az selektiftirler ve günümüzde bazıları bilinen ancak çoğu bilinmeyen birden fazla kinazı inhibe edebilirler (68).

Bosutinib, oral kullanılabilen bir 4-anilo-3-kinolin karbonitril olup, hem Src hem de Abl tirozin kinazları inhibe edebilen küçük moleküllü inhibitördür. Böylece imatinibden 200 kat daha fazla Bcr-Abl inhibisyonu yapabilir. Bosutinib, göğüs kanseri hücre hatlarında protein kinazların mitojen aktivasyonunu ve fosforilasyonunu inhibe ederek hücrelerin proliferasyonunu, invazyonunu ve migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (7). Yine kolorektal kanserlerde bosutinib B catenini destekleyerek E-cadherine daha yüksek afiniteli bağlanma sağlar. Böylece kolorektal hücrelerin motilitesini azaltır (69). Benzer şekilde HT 29 ksenograft modellerinde bosutinib ile yavaş büyüme gösterilmiştir (70). Bosutinib' in hematolojik malignitelerde klinik olarak etkinliği gösterilmiş olmakla beraber, 4 Eylül 2012 tarihinde Gıda ve ilaç idaresi (FDA) tarafından tedaviye dirençli veya intolerans gelişmiş yetişkin kronik miyeloid lösemi (kml) hastalarında kullanımı için onaylanmıştır. Tablo 3' de tirozin kinaz inhibitörlerinin klinik kullanımlarıyla ilgili bilgiler verilmiştir.

**Tablo 3 : Src / Abl inhibitörlerinin klinik kullanım özellikleri (70)**

Bileşim	Yapısı	Hedef reseptör	Kullanım	Klinik çalışma	Toksisite
<b>Bosutinib (SKI-606)</b>	4-Anilino-3-kinolin karbonitril	Src Bcr-Abl	Günlük 400mg oral	Faz I ve II solid tümörler, FazIII hematolojik maligniteler	Bulantı,Kusma, İshal, Anoreksi, Pansitopeni
<b>Saracatinib (AZD0530)</b>	4-Anilino kinazolin	Src Bcr-Abl	Günlük 175–250 mg oral	Faz I ve II monoterapi ve kombinasyon; solid tümörler; Hasta çalışması henüz yok	Lökopeni, nötropeni, artralji, döküntü, böbrek yetmezliği
<b>Dasatinib (BMS35485)</b>	2-(Amino pirimidinil) tiazol-5-karboksamid	Src Bcr-Abl c-Kit PDGFR cFMS EphA2 SFKs	Günlük 2kez 70mg ya da 120 mg oral	Faz I ve II monoterapi ve kombinasyon; Faz III Hematolojik maligniteler	Nötropeni, trombositopeni, plevral efüzyon, döküntü, gastrointestinal yan etkiler
<b>Ponatinib (AP24534)</b>	İmadazo piridazinler	Src Bcr-Abl	Belirsiz	Faz I KML ve Diğer hematolojik maligniteler	Trombositopeni, Başağrısı, bulantı, artralji, yorgunluk, anemi, döküntü, myalji, pankreatit
<b>KX2–391</b>	Küçük molekülü inhibitör	Selektif Src, substrat bağlayan cep inhibitör	Günlük 2 kez 40 mg oral	Faz I ileri evre Solid tümörler; Faz II dirençli prostat kanseri	Ast, Alt yüksekliği lökopeni, yorgunluk
<b>XL-228</b>	tescilli	SFKs IGF-1R AuroraA Bcr-Abl	Belirsiz	Faz I İleri evre solid tümörler Lenfoma KML	Belirsiz
<b>TG100435/ TG100855</b>	3-Amino benzol (1,2,4) tinazin	Src Bcr-Abl	NA	Sadece preklinik	NA
<b>DCC2036</b>	tescilli	Abl SFKs Lyn ve Hck içeren	Belirsiz	Faz I Lösemi, Solid tümörlerde klinik çalışma yok	Belirsiz

#### **2.3.4.Bosutinib**

Solid organ tümörlerinde de faz I, II çalışmaları devam etmektedir. Bu çalışmalar tablo 4' de gösterilmiştir.

Bosutinib' in bilinen yan etkileri ishal, bulantı, kusma, karın ağrısı, döküntü, ateş ve yorgunluk olup bu yan etkilerinden dolayı hastalar tarafından tolere edilebilmeleri zorlaşır. Labaratuvar bulgularında trombositopeni ve anemi yapabilir. İlacın ciddi yan etkilerinde myelosupresyon, hepatotoksitite ve anafilaktik şok sayılabilir.

Bosutinib, sitokrom P- 450 tarafından karaciğerde metabolize edilir. Bu ilaç diğer tirozin kinaz inhibitörleri olan dasatinib, imatinib, nilotinib ve ponatinib gibi CYP3A4'ün substratıdır. Bu enzimi inhibe eden maddeler ilacın vücutta birikimini ve etkisini artırırken, yine bu enzimi indüklenmesini sağlayan maddeler ilacın vücuttaki miktarını azaltıp, ilacın etkinliğini azaltırlar.

**Tablo 4:** Bosutinib ile solid malignitelerde klinik çalışmalar

<b>Monoterapi ve kombinasyonlu çalışma</b>	<b>Biomarkers</b>	<b>Sonuç</b>
<b>FAZ I</b>		
<b>Gemsitabin ile birlikte daha önce hiçbir sistemik tedavi almamış rezeke pankreatik kanser hastalarında(n33); ClinicalTrials.gov Identifier, NCT01025570</b>	NA	Çalışma sonlandırıldı.
<b>Kapesitabin ile birlikte tüm solid organ maligniteleri (n152);ClinicalTrials.gov Identifier, NCT00959946</b>	NA	Çalışma sonlandırıldı
<b>FAZ II</b>		
<b>Monoterapi meme kanseri hastalarında (n=75); ClinicalTrials.gov Identifier, NCT00319254</b>	NA	Tamamlandı
<b>Eksemestan ile birlikte eksemestana karşı monoterapi HR+ Meme kanser hastalarında (n=234); ClinicalTrials.gov Identifier, NCT00793546</b>	NA	Başladı, tamamlanmadı
<b>Letrozol ile birlikte letrozole karşı monoterapi meme kanseri hastalarında patients (n=250); ClinicalTrials.gov Identifier, NCT00880009</b>	NA	Çalışma sonlandırıldı
<b>FAZ III</b>		
<b>Hastalarda çalışılmış bir faz III çalışması bulunmamaktadır.</b>		

\*<http://www.ClinicalTrials.gov>, web sitesinden alınmıştır

### III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü Fonu tarafından 2014-142 nolu proje ile desteklenmiş olup, 27.08.2014 tarihinde Celal Bayar Üniversitesi 20478486-301 nolu Yerel Etik Kurul onayını almıştır. Çalışma ile ilgili araştırmalar Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarlarında yapılmıştır.

#### 3.1. GEREÇ

##### 3.1.1. Hücre Kültürlerinin hazırlanması için gereçler

Denemeler ATCC'den temin edilen 3 adet yüzeye bağımlı serviks kanseri hücre hattı ile gerçekleştirildi.

1. LNCaP (insan serviks karsinomu lenf nodu metastazı hücre hattı; CRL-1740™)
2. PC-3 (insan serviks karsinomu kemik metastazı hücre hattı; CRL-1435™)
3. DU145 (insan serviks karsinomu beyin metastazı hücre hattı; HTB-81™)

- Sınıf II güvenlik kabini (Esco, Holanda)
- CO<sub>2</sub>'li inkübatör (Sanyo-MCO-18AIC, Japonya)
- Floresan ekli invörted ışık mikroskobu (Leica DMIL, Almanya)
- Soğutmalı santrifüj (Sigma- B6916, ABD)
- pH metre (Hanna- HI221, Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (Wisd-MSH20A, Almanya)
- 100 x20 mm'lik kültür kapları (Greiner Bio-One CELLSTAR, Almanya)
- 60 x 15 mm hücre kültür kapları (Greiner Bio-One CELLSTAR, Almanya)

- 6 kuyucuklu kültür kapları (Greiner Bio-One CELLSTAR, Almanya)

- 2.5- 5- 10 ve 25 ml hacimli steril pipetler (Orange, İtalya)
- Pastör fırınında steril edilmiş pastör pipetleri
- 15 ml ve 50 ml'lik falkon tüpleri (Jet Biofil, İtalya)
- 1-10, 20-200 ve 100-1000 µl otomatik pipetler (Brand-TransferpetteS, Almanya)

TransferpetteS, Almanya)

- Pipet uçları (VWR, ABD)
- Eppendorf tüpler (Grainer-Almanya)
- Hücre ortamı; DMEM F12(Gibco- 31330, ABD)
- Hücre ortamı; RPMI 1640 (Gibco- 52400, ABD)
- Fötal dana serumu (FBS) (Gibco- 10270, ABD)
- Tripsin-EDTA (Gibco- 3103382, ABD)
- Aktif karbon (Merck, K34348983520)
- Penisilin/Streptomisin (Gibco- 15140, ABD)
- L-glutamin (Gibco- 25030, ABD)
- İrinotekan (Hydrochloride trihydrate, CPT-11, P5E561)
- Kamptotesin (Sigma, C9911)
- Doksorubisin (Adriblastina, Carlo Erba,7126176)
- Etoposit (VP16) (Sigma, E1383)
- Hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Merck,M1086002500,ABD)
- Wortmannin (Sigma- W1628, Almanya)
- LY294002 (Sigma- L9908, Almanya)
- DMSO (Merck- K33960212-504, ABD)
- Hemositometre (Neubauer)
- % 0.4 Tripan mavisi solüsyonu (Sigma- T6146, ABD),
- Fosfat tamponu (Phosphate Buffered Saline / PBS)

### **3.1.2 İmmünofloresan Çalışmaları için gereçler**

- 22x22 mm No: 1 lamel (Marienfeld- 0101050, Germany)

- % 4 Paraformaldehit (AppliChem- A3813, Almanya) pH:7.8 / % 100 soğuk methanol (Merck- 1552608034, ABD)
- % 0.2 triton X-100 (Sigma- T8787, Almanya) içeren PBS
- % 1BSA (USB- 10857, ABD) içeren PBS
- HM- boş vektör (Invitrogen, ABD)
- HM-NKX3.1 ekspresyon konstraktı
- % 70 ve 100 EtOH (Merck- K41414186 038, ABD)
- DMSO (Merck- K33960212 504, ABD)
- R1881 (Sigma, R0908)
- İrinotekan (Hydrochloride trihydrate, CPT-11, P5E561)
- Kamptotesin (Sigma,C9911)
- Doksorubisin (Adriplastina,Carlo Erba,7126176)
- Etoposit (VP16) (Sigma, E1383)
- Hidro jen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Merck, M1086002500)
- Anti-XPress antikoru(Invitrogen P/N 46-0528)
- Anti-siklin D1 antikoru (Santa Cruz- sc20044, Almanya)
- Anti-γ-H2AXantikoru (Milipore,05-636)
- NKX3.1 antikoru (Dr. Fahri Saatçioğlu Lab., Oslo Üniversitesi)
- Anti-mouse IgG (Invitrogen Molecular Probes, Alexa Fluor 594) (Invitrogen- A11005, ABD)
- Anti-mouse IgG (Invitrogen Molecular Probes Alexa Fluor 488) (Invitrogen- A11001, ABD)
- Anti-rabbit IgG (Invitrogen Molecular Probes Alexa Fluor 594) (Invitrogen- A11012, ABD)
- Anti-rabbit IgG (Invitrogen Molecular Probes Alexa Fluor 488) (Invitrogen- A11008, ABD)
- 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solüsyonu
- Flöresan mikroskop (Leica DMIL, Almanya)
- Santrifüj (Eppendorf 5415D ve 5415R, ABD)
- 1-10, 20-200 ve 100-1000 µl otomatik pipetler (Brand-TransferpetteS, Almanya)

- Pipet uçları (VWR, ABD)
- Eppendorf tüpler (Grainer-Almanya)

### 3.1.3.İmmünoblotlama (Western-Blot) için Gereçler

- Modifiye RIPA tamponu:
- Proteaz inhibitör kokteyli (Roche-04693159001, Almanya)
- Fosfataz inhibitör kokteyli (Roche-04906837001, Almanya)
- NaF 100X (100mM), (Merck- B815549 606, ABD)
- NaVO<sub>3</sub> 100X (200mM) (Fluka- 72060, Almanya)
- PMSF 100X (100 mM) (Fluka- 93482, Almanya)
- BCA kiti (Sigma- 088K6138, Almanya)
- Kuars küvet (Hellma- 105.202QS, Almanya)
- İzopropanol (Merck- K35707095 607, ABD)
- Metanol (Merck, K34212908503)
- % 30 akrilamid karışımı için
- 4X SDS-PAGE ayırma jel tamponu
- 4X SDS-PAGE depolama jel tamponu
- Amonyum persülfat sol (% 10) (Sigma- A9164, Almanya)
- TEMED (Sigma- T9281, Almanya)
- 1L hacim için SDS-PAGE jel 10X yürütme tamponu (1X olarak kullanılır)
- 4X yükleme tamponu
- 40 mM trizma baz (pH 8.0) (Sigma- T6066, Almanya)
- 0.4 mM EDTA (Sigma- K5134, Almanya)
- % 4 SDS (Sigma- L4390, Almanya)
- % 20 gliserol (Sigma- G5150, Almanya)
- Brom fenol mavisi 200 µl (Merck- L54971322525, ABD)
- 1L hacim için SDS-PAGE jel 10X transfer tamponu
- Beta-mercaptoetanol (Sigma, M3148)
- 10 X TBS (pH 7.6), toplam hacim 1L

- Yağsız süt tozu (Saliler, Almanya)
- BSA (USB- 10857, ABD)
- Anti-rabbit IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham-NA934, ABD)
  - Anti-mouse IgG horse radish peroxidase (HRP) (Amersham-NA931, ABD)
- Anti- $\beta$ -Actin antikor (Sigma-A5316, Almanya)
- Anti- $\gamma$ H2AX antikor (Milipore, 05-636)
- NKX3.1 antikor (Dr. Fahri Saatçioğlu Lab., Oslo Üniversitesi)
- GAPDH antikor (Ambion, AM4300)
- AR antikor (Milipore, 06-680)
- p-p53<sup>(S20)</sup> (Santa Cruz-sc18079 , Almanya)
- p53 antikor (Abcam, ab2433 ve Santa Cruz-sc6243)
- Anti-Siklin D1 antikor (Santa Cruz- sc20044, Almanya)
- Anti-DNA-PKcs antikor (Santa Cruz- sc17787, Almanya)
- Anti-pATM<sup>(S1981)</sup> antikor (Santa Cruz- sc13138, Almanya)
- Anti-ATM antikor (Santa Cruz- sc13138, Almanya)
- pATM<sup>(S1981)</sup> antikor (Abcam, ab81292)
- p-H2AX<sup>(S139)</sup> antikor (Abcam, ab11174)
- p-NBS1 antikor (Milipore, Upstate, 05-663)
- NBS1 antikor (Milipore, Upstate, 05-616)
- Anti-RAD50 antikor (Santa Cruz- sc5298, Almanya)
- Anti-Ku70 (Santa Cruz- sc11757, Almanya)
- Anti-pChk2<sup>(T68)</sup> (Santa Cruz- sc135653, Almanya)
- Anti-Chk2 antikor (Santa Cruz- sc59737, Almanya)
- ECL PLUS kiti (GE Healthcare Amersham Western Blot detection system, RPN2132, ABD )
  - Hücre kazıyıcı (Cell Scraper- TPP 9903, İsviçre)
  - Soğutmalı santrifüj, + 4 °C için (Sigma- B6916, Almanya)
  - Sonikatör (Bandelin Sonopuls UW 2070)
  - Santrifüj (Eppendorf, 5415D ve 5415R, ABD)

- Blok ısıtıcı (Grant- QBA2, İngiltere)
- Spektrofotometre (Amersham- Ultraspec 1100 pro., ABD)
- Yürütme aparatı (C.B.S. Scientific- MGV202, ABD)
- Transfer aparatı (C.B.S. Scientific- EBX700, ABD)
- Whatman kağıtları
- Polyvinylidene fluoride (PVDF) transfer membranı (Roche- 03010040001, Almanya)
- Çalkalayıcı (Heidolph- ROTAMAX 120, Almanya)
- Pozlamanın gerçekleştiği kaset (Amersham Hypercassette, RPN 11643)
- Film (Kodak, 8143059)
- Asetat kağıtları
- Developer (Kimetsan- Fast X-Ray Developer Sol., Türkiye)
- Fikser (Kimetsan- Fast X-Ray Fikser Sol., Türkiye)
- 5 ml steril enjektör (Ayset, Türkiye)
- 1-10, 20-200 ve 100-1000 µl otomatik pipetler (Brand- TransferpetteS, Almanya)
- Pipet uçları (VWR, ABD)
- Eppendorf tüpler (Grainer, Almanya)

## 3.2. YÖNTEM

### 3.2.1. Hücrelerin Bakımı Ve Pasajlanması

Hücrelerin besin gereksinimlerini karşılamak amacıyla ortam olarak % 5-10 FBS, % 1 L-glutamin, % 1 penisilin/streptomisin içeren DMEM F12 (PC-3 ve DU145 hücre hatları için) veya RPMI 1640 (LNCaP hücre hattı için) kullanıldı. Hücreler yüzeyi tamamen kapladığı zamana kadar rutin olarak beslendi. Bu işlem için yüzeye bağımlı hücrelerin ortamı pastör pipeti yardımıyla çekildi ve hücrelerin üzerine taze ortam eklenerek 2 günde bir ortam değiştirildi. Hücreler, 100 x 20 mm'lik veya 60 x 15 mm'lik hücre kültür kaplarında 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde

büyütüldü. Hücreler tüm yüzeyi kaplayacak kadar çoğaldıklarında pasajlandılar.

### **3.2.2. Hücrelerin Dondurulması Ve Çözdürülmesi**

Hücreler pasajlandıktan sonra hücre kültür kabına aktarılmadan,%30 FBS içeren taze hücre ortamında bulunan hücreler üzerine %5 DMSO eklendive 1ml hacimde kriyotüplere aktarılarak -86°C derin dondurucuya kaldırıldı.

Çözdürülecek olan hücreler -86°C derin dondurucudan çıkarılır çıkarılmaz 37 °C su banyosunda çözülene kadar (yaklaşık 1-2 dk) bekletildi. Ardından hücre kültür kabındaki 37 °C'ye ısıtılmış 8 ml ortam üzerine dikkatlice pipetleme yaptıktan sonra ilave edildi.

### **3.2.3. Hücre Sayımı**

Hücre süspansiyonunun yoğunluğunun belirlenmesi için hücre sayımı yapıldı. Hücreler pasajlanırken, yeni kültüre istenen miktarda hücre alabilmek amacıyla hemositometrede sayıldı. Sayım için hücre süspansiyonundan 10 µl alınıp tripan mavisıyla 100 µl'ye tamamlandı. Karışım pipetle homojenize edildi. Hemositometre üzerine bir lamel koyuldu ve sayılacak hücre süspansiyonu bu ikisi arasına pipetle kenardan vererek yayıldı.

Hemositometre üzerinde yer alan 9 büyük kare içindeki hücre miktarı sayıldı. Mililitredeki hücre sayısını (hücre sayısı/ml) belirlemek için aşağıdaki formülden yararlanıldı:

$$\text{Hücre sayısı/ml} = \frac{\text{Sayılan hücre miktarı} \times \text{Dilüsyon oranı}}{9} (10) \times 10^4$$

### **3.2.4 Sitotoksisite analizleri (MTT)**

Sitotoksisite analizleri için kolorimetrik bir yöntem olan MTT (3- [ 4,5-dimethylthiazol- 2- yl]- 2,5- diphenyl- tetrazolium bromide ) oluşumu ölçüldü. Hücre çoğalması; steril olarak PBS tamponunda hazırlanan

5mg/mL MTT stok solüsyonun, kullanımdan az önce 1:10 oranında üretme ortamı ile dilüe edilip, 0,5mg/ml oranında hücreler üzerine eklenmesi ile saptandı. 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 4 saat süreli inkübasyonun ardından MTT içeren ortam atılıp, oluşan mavi formazan kristallerinin 200µL %100 DMSO içerisinde çözülmesi sağlandı. Oluşan mavi formazan miktarı 570-690 referans aralıklarında mikropilaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. Projemiz kapsamında MTT ile sitotoksikite denemeleri tirozin kinaz inhibitörü olan bosutinibin uygulama süresi ve dozlarına bağlı olarak gözlenecek sitotoksik veya anti-proliferatif etkinin, bu etkilerin gözlemlendiği optimum konsantrasyon değerlerinin (IC<sub>50</sub> değerlerinin) belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi. Sitotoksikite denemesi CCL-62 serviks kanseri hücre hattında 24, 48 ve 72 saat süreyle gerçekleştirildi. % Hücre canlılığı, madde uygulanan hücrelerin absorbansı / kontrol hücrelerinin absorbansı olarak hesaplandı. Sonuçlar Microsoft Excel (XP) ve GraphPad yazılımı aracılığıyla grafiksel olarak değerlendirildi, her bir maddenin IC<sub>50</sub> değeri (hücre proliferasyonunun %50 oranında inhibe eden konsantrasyon değeri) hesaplandı.

### **3.2.5. İmmünofloresan**

Hücre kültürüyle iç içe bir yöntem olarak uygulanan immünofloresan yönteminde amaç hücreleri hazır hale getirdikten sonra araştırılan proteini özgül antikorlarla bağlayarak floresan ışık altında mikroskopik inceleme yapmaktır.

#### **3.2.5.1 Hücrelerin Hazırlanması**

- % 70 EtOH'de bekletilen lamellerin steril kabin içinde kağıt mendil üzerine konularak kuruması beklendi ve ardından lameller 6 kuyucuklu kültür kaplarına düzgün bir şekilde yerleştirildi. Hücreler; içlerinde lamel bulunan kültür kaplarına 3 ml ortam içerisinde % 50-60 yoğunlukta olacak şekilde pasajlandı ve 37°C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi.

- Hücreler madde uygulamaları ve/veya transfeksiyonlar yapıp deney tasarımına uygun şekilde kültür edildi.

### **3.2.5.2 Fiksasyon**

- Ortam uzaklaştırılıp 1 ml PBS ile bir kez yıkama yapıldı.
- 1 ml % 4 paraformaldehit eklenerek hücreler oda sıcaklığında 1 saat fikse edildi.
- 1 ml PBS ile 1 kez yıkama yapıldı.
- Oda sıcaklığında ve karıştırıcı üzerinde % 0.2 triton x-100 içeren PBS ile 5 dakika inkübasyon yapılarak hücreler geçirgen hale getirildi.
- 1 ml PBS ile bir kez yıkama yapıldı.

### **3.2.5.3 Antikor işaretleme**

- % 1 BSA içeren PBS ile 5 dakika oda sıcaklığında bloklama yapıldı ve bloklama solüsyonu uzaklaştırıldı.
- Kullanım konsantrasyonları optimize edilmiş primer antikorlar % 1 BSA içeren PBS içerisinde seyreltilerek her lamele 50 µl hacimde damlatıldı ve lamellerin üzeri parafilm ile kapatılarak 37°C' de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- Parafilmiler uzaklaştırılarak 4 defa PBS yıkaması yapıldı.
- % 1 BSA içeren PBS içerisinde seyreltilen sekonder antikorlar her lamele 50 µl hacimde damlatıldı ve lamellerin üzeri parafilm ile kapatılarak 37 °C' de 20 dk inkübasyona bırakıldı.
- Parafilmiler uzaklaştırılarak 4 defa PBS yıkaması yapıldı.
- Lameller üzerine 1 ml % 70 EtOH eklendi ve oda sıcaklığında 2 dk bekletildi.
- Lameller üzerine 1 ml % 100 EtOH eklendi ve 1-2 dk bekletildi.

### **3.2.5.4. DAPI İle Boyama**

- % 100 etanol içindeki hücreler buradan çıkarılarak kağıt mendiller üzerine konuldu ve kuruması beklendi.

- Hücrelerin lamel üzerinde tutunduğu yüzeye 10 µl DAPI (0.25 µg/ml) damlatıldı ve ters çevrilerek lamaların üzerine kapatıldı.
- Flöresan mikroskobu ile inceleme yapılmıştır.

### 3.2.5.5.DNA çift zincir kırıklarının incelenmesi

Memeli hücrelerinde DNA hasarı ajanı ile oluşturulan çift zincir kırıklarına karşı gerçekleşen erken yanıtlardan birisi ise histon H2AX'de bulunan (S/T)Q motifinin fosforilasyonudur. Madde uygulamalarına bağlı olarak gelişen çift sarmal DNA hasarı kırıkları H2AX molekülünün fosforilasyonu ile sonuçlanmakta ve fosforile olan H2AX molekülü DNA hasarı onarım komplekslerinde diğer (ATM, RAD50, Mre11 ve NBS1 gibi) faktörlerle bir araya gelerek onarım odakları oluşturmaktadır. Fosforillenen H2AX molekülleri  $\gamma$ H2AX<sup>(Ser139)</sup> olarak adlandırılmaktadır ve özgül antikolar yoluyla ayrı ayrı nükleer odaklar şeklinde belirlenebilmektedir. Her bir odak tek bir DNA çift zincir kırığını temsil ettiği için odakların sıklığı çift zincir kırığı miktarı veya diğer bir deyişle DNA hasarı miktarı ile orantılı olmaktadır. Aynı zamanda  $\gamma$ H2AX<sup>(Ser139)</sup> odaklarının kaybedilme hızı DNA onarımı hızı ile bağlantılıdır. Dolayısıyla tirozin kinaz inhibitörlerinden bosutinibin, DNA hasarındaki rolü öncelikli olarak H2AX fosforilasyonu ile sorgulanmaya çalışıldı.

Bu amaçla CCL-62 hücrelerine 24 saat süreyle 5µM, 10µM ve 20µM konsantrasyonlarında bosutinib uygulandı. Ardından DNA hasarı oluşumu uygun primer antikolar ile işaretlenerek florokrom takılı sekonder antikolar aracılığı ile belirlendi ve floresan mikroskobu ile incelenerek görüntüleme yapıldı. DNA hasarı oluşumu için pozitif kontrol olarak topoizomera-1 inhibisyonu aracılığıyla DNA çift zincir kırıklarına yol açan CPT-11 (İrinotekan) kullanıldı.

Elde edilen bu bulguları kantitatif veri haline dönüştürebilmek amacıyla "Image J" analiz programı kullanılarak hücre başı ortalama odak miktarı hesaplanarak grafiğe aktarıldı

### **3.2.5.6. Kaspaz 3 aktivasyonunu floresan mikroskobu ile araştırılması**

Bosutinibin CCL-62 hücrelerinde kaspazlar aracılığıyla apoptozu tetikleyip tetiklemediğini sorgulamak amacıyla ilk olarak kaspaz-3 primer antikoru ile işaretleme yapılarak her bir hücredeki kaspaz-3 seviyesi floresan mikroskobu ile incelenerek görüntülendi. Kaspaz aktivasyonu için pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanıldı.

### **3.2.5.7. Annexin V-FITC kiti uygulanması ve analizi**

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Annexin- V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir ve floresan mikroskobunda inceleme yapılarak apoptotik hücreler saptanmış olur. Buradan yola çıkarak son olarak bosutinib uygulanmış CCL-62 hücrelerinde Annexin-V işaretleme yapılarak apoptotik hücreler saptanmaya çalışıldı. Bununla birlikte hücreler aynı anda DNA'yı boyayan Propidyum İyodür ve hücre çekirdeklerini boyayan DAPI boyası ile de boyanarak tüm hücreler görünür hale getirildi.

### **3.2.6. Biovision kiti ile kolorimetrik kaspaz-3 analizi**

İmmüno Floresan mikroskobisine ek olarak CCL-62 hücrelerindeki kaspaz-3 aktivasyonunu belirlemek amacıyla Biovision kiti ile kolorimetrik kaspaz-3 analizi gerçekleştirildi. 450 nm'de yapılan kolorimetrik okuma sonucunda kontrol ve madde uygulanmış hücrelerin absorbanları karşılaştırılarak kaspaz-3 aktivasyonuna ilişkin kat değişiklikleri belirlendi ve grafiğe geçirildi.

### **3.2.7 İmmüno blotlama (Western-Blot)**

#### **3.2.7.1 Protein İzolasyonu**

Hem immüno blot hem de immüno çöktürme deneylerinde kullanılmak üzere hücrelerden RIPA modified tamponu kullanarak protein izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla hücreler ortam içerisindeyken hücre kazıyıcı yardımıyla kazınarak 2ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı. 1500rpm'de 5dk santrifüj edilerek ortam uzaklaştırıldı. Hücre yoğunluğuna uygun miktarda proteaz ve fosfataz inhibitörleri içeren RIPA modified buffer eklenerek süspanse edilen hücreler buz üzerinde 45 dk bekletildi. Ardından %25 güçle, %50 aralıkla 20 sn sonikasyon yapıldı ve 12.000 g'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatant yeni bir ependorf tüpüne alındı ve protein lizati -86°C' ye kaldırıldı.

#### **3.2.7.2 Protein Miktarının Belirlenmesi**

Elde edilen lizatlardaki protein miktarı BCA protein miktarı ölçüm kiti kullanılarak aşağıdaki protokole göre belirlendi.

- Eppendorf tüplere dağıtılan 149'ar µl RIPA tamponu üzerine 1'er µl protein lizati örneği eklendi.
- BCA çalışma reaktifi; her örnek başına 75 µl QA, 75 µl QB ve 3 µl QC olacak şekilde bütün örnekler için toplam bir karışım hazırlanarak vortekslenildi ve her örnek başına 150 µl olacak şekilde eppendorf tüplere dağıtıldı. Kör olarak protein lizati bulunmayan RIPA tamponu kullanıldı.
- Tüpler vortekslenip kısa santrifüjden sonra 60 °C'de ısıtıcı blokta 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde kısa bir santrifüjden sonra örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenerek spektrofotometrede 562 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı.

- Elde edilen absorbands değerleri referans değer ile normalize edilerek protein miktarları  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$  olarak belirlendi.

### 3.2.7.3 Proteinlerin SDS-PAGE İle Ayrılması

- Camlar sırasıyla su-etanol-izopropanol ile silindive birleştirilen iki cam arasına %6-15'lik ayırma jeli (5-10 ml) döküldü. Jelin düzgün bir şekilde donabilmesi için üzerine izopropanol döküldü.
- Donan ayırma jelinin üzerindeki izopropanol uzaklaştırdıktan sonra depolama jeli (5 ml) dökülüp tarak yerleştirildi.
- Kullanımdan önce gerekli hacimde 4×yükleme tamponu içerisine %10 oranında beta-merkaptöetanol eklendi ve kısa bir santrifüj yapıldı.
- Protein lizatlarından 50-100  $\mu\text{g}$  miktara karşılık gelen hacim üzerine su ve 4×yükleme tamponu (7,5  $\mu\text{l}$ ) eklenerek toplam hacim 30  $\mu\text{l}$ 'ye tamamlandı.
- Hazırlanan protein örnekleri 95° C' de 5 dakika denatüre edildi.
- Denatürasyonun hemen ardından örnekler buz üzerine alındı ve jele yüklemeyden önce kısa bir santrifüj yapıldı.
- Kuyucuklara yüklenen örnekler uygun voltajda (80 V) ve jelin en sonuna gelene dek (3-4 saat) yürütüldü.

**TABLO 5.** Ayırma jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları

Ayırma jeli (10 ml)	%6	%8	%10	%12	%15
dH2O	5,4 ml	4,7 ml	4,1 ml	3,4 ml	2,4 ml
%30 acrylamide mix	2,0	2,7	3,3	4	5
4X ayırma jeli tamponu	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
%10 APS	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,008	0,006	0,004	0,004	0,004

**TABLO 6.** Depolama jeli bileşenlerinin farklı yüzde değerleri için oranları

<b>Depolama jeli</b>	<b>10 ml</b>	<b>5 ml</b>	<b>2,5 ml</b>
dH <sub>2</sub> O (ml)	5,7	2,85	1,425
%30 acrylamide mix (ml)	1,7	0,85	0,425
4x depolama jel tamponu (ml)	2,5	1,25	0,625
%10 APS (ml)	0,1	0,05	0,025
TEMED (ml)	0,010	0,005	0,005

#### **3.2.7.4. Membrana Transfer**

- Western-blot sandviç aparatının içine sırasıyla bir sünger, 2 adet Whatman kağıdı, proteinlerin yürüdüğü jel, PVDF membran, 2 adet Whatman kağıdı ve bir sünger yerleştirilerek aparat hazır hale getirildi.
- PVDF membran aparat içine yerleştirilmeden önce metanol içinde ıslatıldı.
- Oluşturulan sandviç aparatı, jeldeki proteinlerin membrana transfer edilebilmesi amacıyla transfer tankına yerleştirildi.
- Transfer aparatının içerisine 1X transfer tamponu döküldü ve aparatın kenarlarına soğutucu bloklar yerleştirildi. Gece boyu +4°C'de 90 mA' de transfere bırakıldı.

#### **3.2.7.5 Primer Antikor İle İşaretleme**

- Transfer tankından çıkarılan membran 2 sefer TBS-T ile çalkalandıktan sonra TBS-T'de hazırlanan % 5 süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat bloklama yapıldı.

- Bloklamadan sonra membran TBS-T ile 2 sefer çalkalandı ve daha önce kullanım oranı optimize edilmiş primer antikör solüsyonunda, oda sıcaklığında ve karıştırıcı üzerinde 1 saat boyunca yavaşça karıştırılarak inkübe edildi. Primer antikörsolüsyonu olarak % 0.5 süt tozu içeren TBS-T veya %5 BSA içeren TBS-T kullanıldı.

- Membran 2 sefer çalkalama, 1 sefer 15 dk ve 3 sefer de 5 dk olacak şekilde TBS-T ile yıkandı.

### **3.2.7.6 Sekonder Antikör İle İşaretleme**

- Membran daha önce kullanım oranı 1/5000 veya 1/10.000 olarak optimize edilmiş HRP bağlı tavşan (rabbit) veya fare (mouse) sekonder antikörleri ile oda sıcaklığında 1 saat yavaşça karıştırılarak inkübe edildi. Sekonder antikörsolüsyonu olarak % 0.5 süt tozu içeren TBS-T veya %5 BSA içeren TBS-T kullanıldı.

- Membran 2 sefer çalkalama, 1 sefer 15 dk ve 3 sefer de 5 dk olacak şekilde TBS-T ile yıkandı.

### **3.2.7.7 Bantların görüntülenmesi**

- Karanlık odada membran üzerine hazırlanan ECL-plus kiti solüsyonu (A:B solüsyonu 40:1 oranında 2 veya 3 ml olarak hazırlanmıştır) döküldü ve solüsyonun membran üzerine tamamen yayılması için, membran yavaşça karıştırılarak 5 dakika inkübe edildi.

- Kasetin içinde iki asetat kağıdı arasına yerleştirilen membran üzerine film konularak farklı sürelerde pozlama gerçekleştirildi.

- Filmler 2 dakika developer ve 5 dakika fikser solüsyonlarından geçirilerek bantların film üzerinde görüntülenmesi sağlandı.

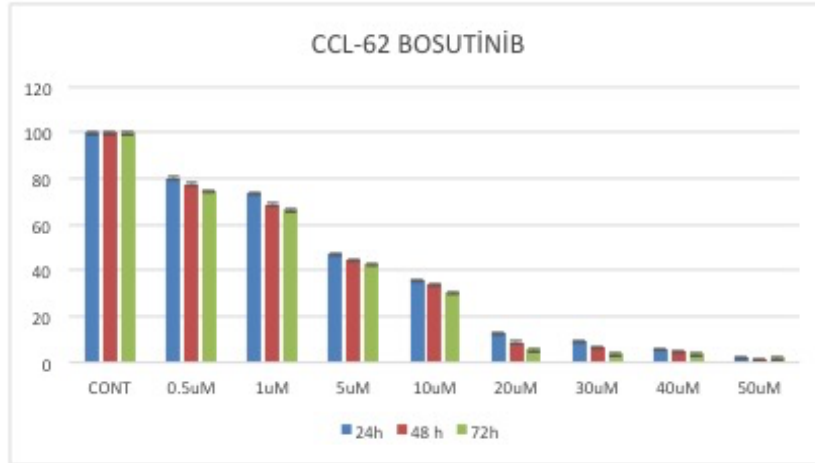
CCL-62 hücre hattında bosutinibin DNA hasarı ve apoptoz yolağındaki etkinliği western-blot uygulaması ile sorgulanmaya çalışıldı. Bu amaç doğrultusunda hücre hattına 24 saat süreyle madde

uygulamasý yapýlarak protein izolasyonlarý gerçekleřtirildi ve SDS-PAGE jellerinde yürütüldü. Maddeler, IC<sub>50</sub> deęerlerine yakın konsantrasyon aralýklarýnda olacak řekilde 5, 10 ve 20µM deęerlerinde hücrelere uygulandı ve doz baęımlý etkinlikleri incelendi. Elde edilen verileri kantitatif hale getirmek için Image J yazılımý kullanýlarak incelenen proteinlerdeki ekspresyon deęiřiklikleri β-Aktin seviyelerine göre normalize edilerek kat deęiřiklikleri hesaplandı ve grafięe geçirildi. DNA hasarýndaki artýřý belirlemek için γH2AX<sup>(Ser139)</sup>, pATM<sup>(Ser1981)</sup> ve pP53<sup>(ser15)</sup> seviyeleri incelendi. Apoptoz aktivasyonu için ise PARP, Kaspaz 9 ve Kaspaz 3 kırıpması incelendi.

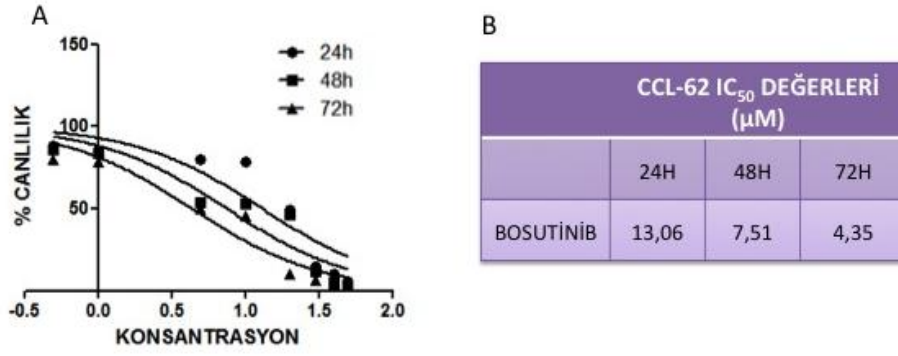
#### IV. BULGULAR

##### 1. Tirozin kinaz inhibitörü “Bosutinib”, CCL-62 serviks kanseri hücre hattında anti-proliferatif etki göstermektedir.

.Tirozin kinaz inhibitörü olan bosutinibin uygulama süresi ve dozlarına bağlı olarak gözlenecek sitotoksik veya anti-proliferatif etkinin, bu etkilerin gözleendiği optimum konsantrasyon değerlerinin ( $IC_{50}$  değerlerinin) belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen MTT analizi sonucunda bir tirozin kinaz inhibitörü olan bosutinibin serviks kanseri hücre hattı CCL-62'nin proliferasyonunu önemli derece baskıladığı gözleendi ve önemli bir anti-proliferatif ajan olarak rol oynayabileceği sonucuna varıldı. Bu hücre hattı için bosutinibin  $IC_{50}$  değerleri 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla 13,1 $\mu$ M, 7,5 $\mu$ M ve 4,4 $\mu$ M olarak belirlendi (Şekil 8 ve Şekil 9). Bu aşamadan sonraki denemelere  $IC_{50}$  değerlerini içeren konsantrasyon aralıklarında devam edildi.



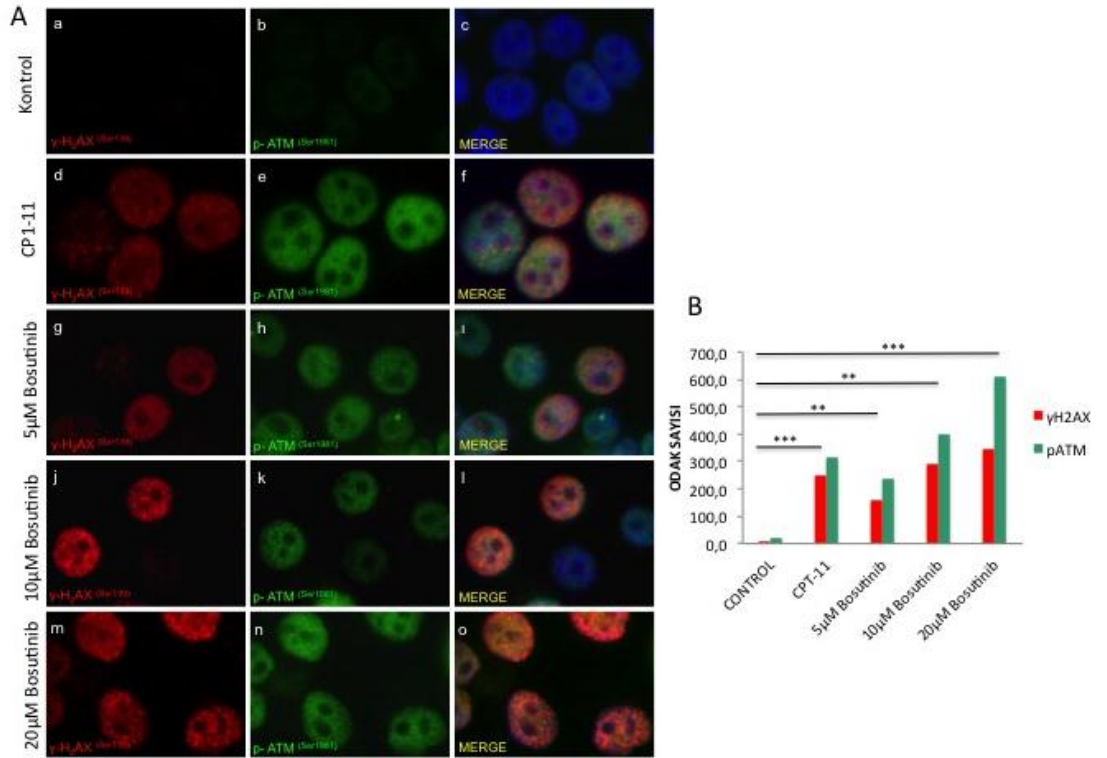
**ŞEKİL 8.** CCL-62 hücre hattında bosutinib uygulamasının zaman ve konsantrasyona bağlı hücre canlılığı üzerindeki etkisi.



**ŞEKİL 9. A.** Bosutinibin CCL-62 hücre hattında % canlılık değerlerine karşı logaritmik konsantrasyonlarından elde edilen proliferasyon eğrisi. **B.** CCL-62 hücre hattında bosutinib uygulamasında elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri.

## 2. Bosutinib, CCL-62 serviks kanseri hücre hattında DNA çift zincir kırıkları aracılığıyla DNA hasarına yol açmaktadır.

Şekil 10' da görüldüğü gibi CCL-62 serviks kanseri hücre hatlarında bosutinibin pozitif kontrol olarak kullanılan CPT-11 aracılığıyla  $\gamma$ H2AX<sup>(Ser139)</sup> ve pATM<sup>(Ser1981)</sup> odaklarının önemli derecede arttığı gözlemlendi. Bununla birlikte CCL-62 hücrelerinde Bosutinibin doz bağımlı olarak DNA hasarının artmasına yol açtığı ve 20µM uygulamasında neredeyse tüm hücrelerin etkilendiği belirlendi (Şekil 10 A). Elde edilen bu bulguları kantitatif veri haline dönüştürebilmek amacıyla "İmage J" analiz programı kullanılarak hücre başı ortalama odak miktarı hesaplanarak grafiğe aktarıldı ve doz bağımlı olarak odak sayılarının arttığı gözlemlendi (Şekil 10 B).



**ŞEKİL 10 A.** CCL-62 hücrelerinde 24 saat süre ile CPT-11 ve Bosutinib uygulamasının DNA hasarı belirteci H2AX ve ATM fosforilasyonuna ( $\gamma$ H2AX(ser139) ve pATM(Ser1981)) etkisi. **a,b,c.** Madde uygulanmamış kontrol hücreleri. **d,e,f.** 20  $\mu$ g/mL CPT-11 uygulanmış hücreler. **g,h,i.** 5 $\mu$ M Bosutinib uygulanmış hücreler. **j,k,l.** 10 $\mu$ M Bosutinib uygulanmış hücreler. **m,n,o.** 20 $\mu$ M Bosutinib uygulanmış hücreler. pATM(Ser1981); FITC (yeşil),  $\gamma$ H2AX(ser139); ALEXA 594 (kırmızı) ve hücre nükleusları DAPI(mavi) ile işaretlenmiştir. Bütün imajlar aynı büyütme ve aynı pozlama ayarlarında çekilmiştir. **B.** “Image J” analiz programı kullanılarak  $\gamma$ H2AX(Ser139) ve pATM(Ser1981) odak oluşumlarının analizlenerek ortalama değerlerden oluşturulan histogram grafikleri. \* işaretleri t-test istatistiksel analizi sonucunda elde edilen anlamlılık (p) değerlerini göstermektedir. \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\* $p \leq 0,0001$ .

### **3. Bosutinib, CCL-62 serviks kanseri hücre hattında Kaspaz 3 aktivasyonunu tetiklemektedir.**

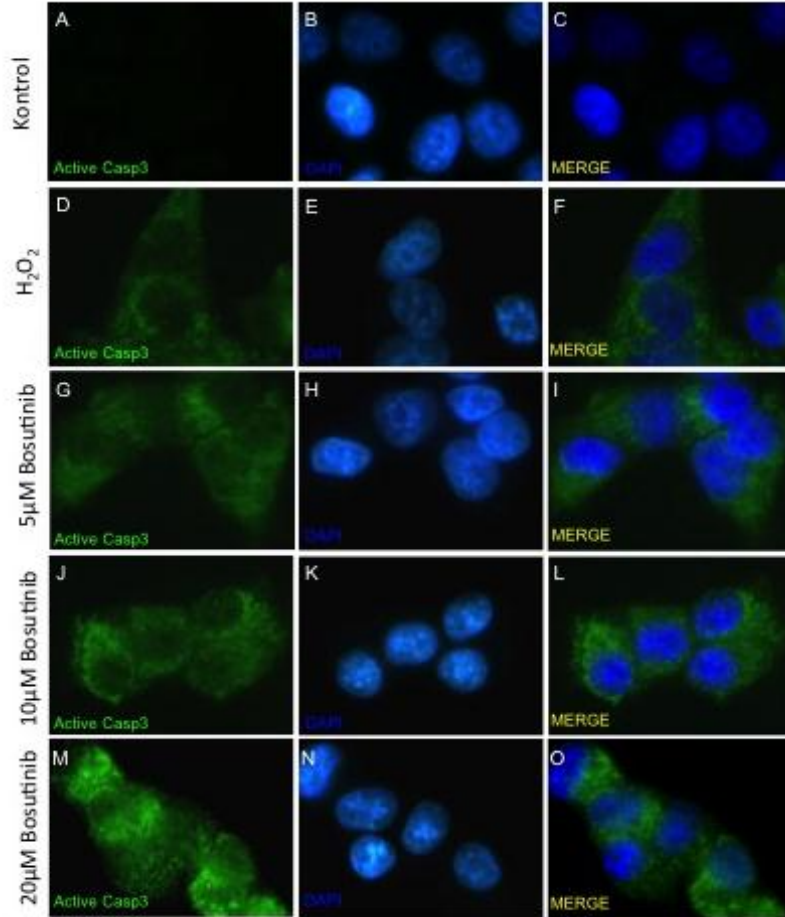
Bosutinibin CCL-62 hücrelerinde kaspazlar aracılığıyla apoptozu tetikleyip tetiklemediğini sorgulamak amacıyla ilk olarak kaspaz-3 primer antikoru ile işaretleme yapılarak her bir hücredeki kaspaz-3 seviyesi floresan mikroskobu ile incelenerek görüntülediği yöntemde kontrol hücrelerinde hiç kaspaz-3 ekspresyonu gözlenmezken, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve bosutinib uygulaması ile birlikte kaspaz-3 seviyesinin arttığı gözlemlendi. Bununla birlikte 10µM ve 20µM bosutinib uygulamalarının pozitif kontrolden daha yüksek oranda kaspaz-3 ekspresyonuna yol açtığı belirlendi (Şekil 11).

İmmüno-flöresan mikroskopisine ek olarak CCL-62 hücrelerindeki kaspaz-3 aktivasyonunu belirlemek amacıyla Biovision kiti ile kolorimetrik kaspaz-3 analizinde 450 nm'de yapılan kolorimetrik okuma sonucunda bosutinib uygulamasının pozitif kontrol olarak kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e oranla daha yüksek oranda kaspaz-3 aktivasyonunu tetiklediği ve hücreleri apoptozu sürüklediği belirlendi (Şekil 12).

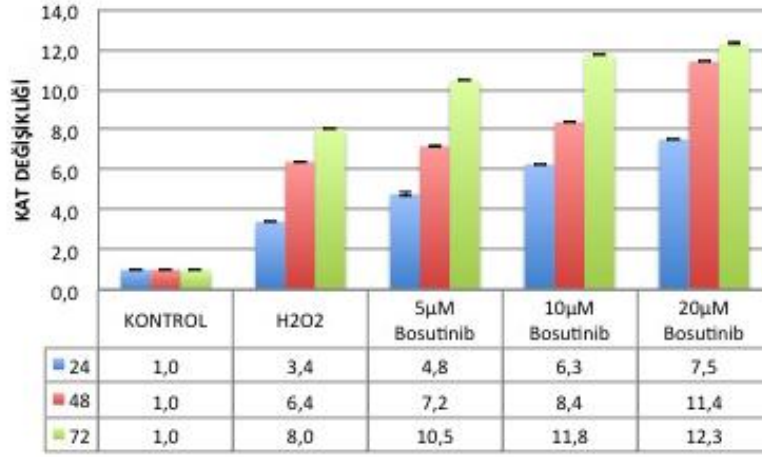
### **4. Bosutinib, CCL-62 serviks kanseri hücre hattında DNA hasarı ve apoptoz yolağı ile ilişkili proteinlerin seviyelerini değiştirmektedir.**

Şekil 13'de elde edilen değişiklikler incelendiğinde diğer sonuçlar ile uyumlu olarak CCL-62 hücre hattında bosutinib uygulamasının hem DNA hasarına yol açtığı hem de apoptozu tetiklediği saptandı. DNA hasarındaki artışı belirlemek için  $\gamma$  H2AX<sup>(Ser139)</sup>, pATM<sup>(Ser1981)</sup> ve pP53<sup>(Ser15)</sup> seviyeleri incelendi ve doz bağımlı olarak tüm proteinlerin ekspresyonunun arttığı gözlemlendi. 20µM bosutinib uygulamasında kontrole kıyasla  $\gamma$  H2AX<sup>(Ser139)</sup>, pATM<sup>(Ser1981)</sup> ve pP53<sup>(Ser15)</sup> proteinleri için sırasıyla 10, 4 ve 6,5 katlık artışlar elde edildi. Apoptoz aktivasyonu için ise PARP, Kaspaz 9 ve Kaspaz 3 kırılması incelendi. Bosutinib uygulaması ile artan apoptozun, PARP proteininin parçalanarak seviyesinin yaklaşık 12 kat azalmasına ve dolayısıyla aktif PARP

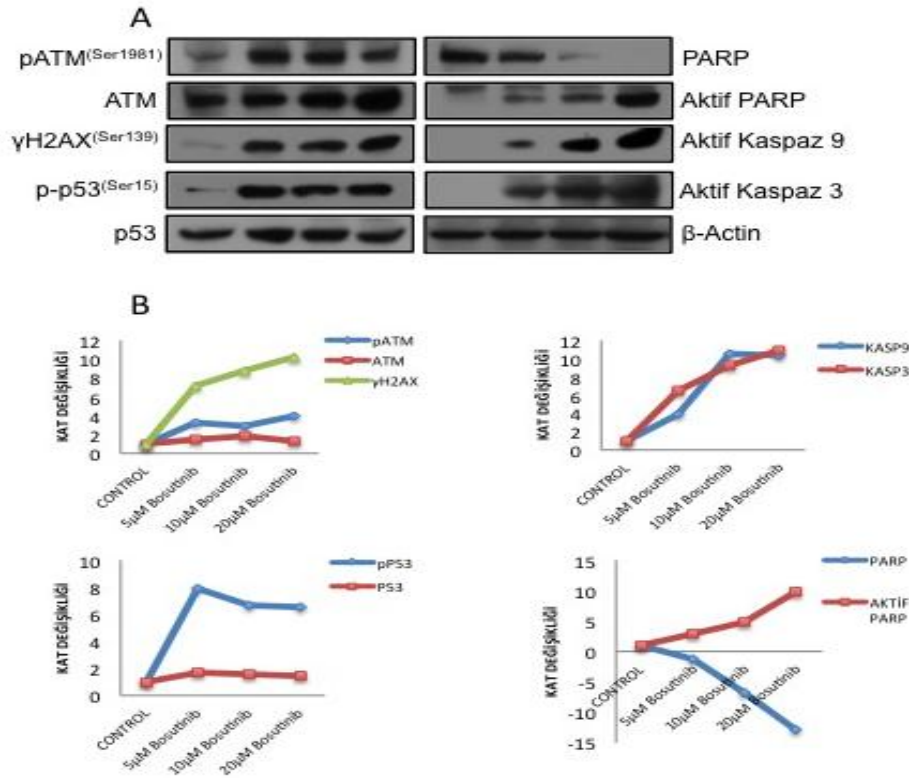
seviyesinin yaklaşık 10 kat artmasına yol açtığı gözlemlendi. Kontrol oranla bosutinib uygulanmış hücrelerde kaspaz 9 ve 3 seviyelerinin de yaklaşık olarak 10 kat artması ile CCL-62 hücrelerinin bosutinib aracılığıyla apoptoza sürüklendiği sonucuna varıldı.



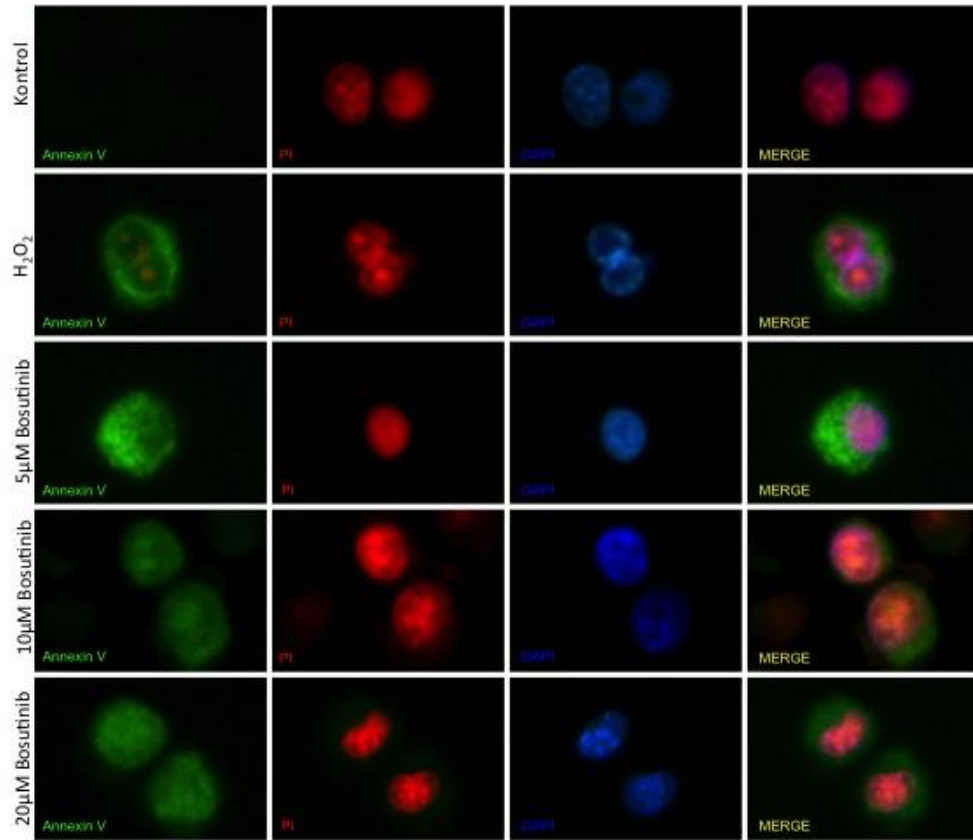
**ŞEKİL 11.** CCL-62 hücrelerinde 24 saat süre ile Bosutinib uygulamasının Kaspaz-3 seviyesine etkisi. A,B,C. Madde uygulanmamış kontrol hücreleri. D,E,F 250 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> uygulanmış hücreler. G,H,I. 5 μM Bosutinib uygulanmış hücreler. J,K,L. 10 μM Bosutinib uygulanmış hücreler. M,N,O. 20 μM Bosutinib uygulanmış hücreler. Kaspaz-3; FITC (yeşil) ve hücre nükleusları DAPI (mavi) ile işaretlenmiştir. Bütün imajlar aynı büyütme ve aynı pozlama ayarlarında çekilmiştir.



**ŞEKİL 12.** CCL-62 hücrelerinde 24 saat süre ile Bosutinib uygulaması sonucu artan Kaspaz-3 aktivasyonunun kolorimetrik olarak belirlenmesi. Kontrol hücrelerine göre hesaplanan kat değişiklikleri grafik altındaki tabloda gösterilmektedir.



**ŞEKİL 13.** CCL-62 hücrelerinde 24 saat süre ile 5μM, 10μM ve 20μM Bosutinib uygulaması sonucu DNA hasarı ve apoptozda rol oynayan proteinlerin seviyelerindeki değişimler. A. pATM(Ser1981), ATM, γH2AX(ser139), pP53(Ser15), P53, PARP, KASPAZ-9 ve KASPAZ-3 ekspresyon değişiklikleri. β-Aktin ekspresyon seviyeleri eşit yüklemeyi belirtmek için kullanılmıştır. B. β-Aktin seviyelerine göre normalize edilen ekspresyon kat değişikliklerinin grafikleri.



**ŞEKİL 14.** CCL-62 hücrelerinde 24 saat süre ile 5µM, 10µM ve 20µM Bosutinib uygulamasının apoptotik hücre oranına etkisinin Annexin V-FITC (yeşil), PI (kırmızı) ve DAPI(mavi) boyaması ile flöresan mikroskobunda analizlenmesi sonucu elde edilen görüntüler.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile doz bağımlı bosutinib uygulamalarında ise hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanarak görüntülenen apoptotik hücre fraksiyonlarının arttığı belirlendi.

Sonuç olarak elde edilen tüm veriler bir bütün olarak değerlendirildiğinde CCL-62 hücre hattına bosutinib uygulamasının doz bağımlı olarak DNA hasarı oranını arttırdığı ve hücrelerdeki apoptozu indüklediği sonucuna varıldı.

## V. TARTIŞMA

Çalışmamızda epitelyal orjine sahip servikal karsinoma hücre hattı olan CCL-62 (HeLa Contaminantı) hücre dizisi kullanılmıştır. Bu hücrelere tirozin kinaz inhibitörlerinden, Src-Abl tirozin kinazları inhibe edebilen küçük molekülü bir inhibitör olan Bosutinib verilmiştir.

Günümüzde insan ölümlerinin önemli bir kısmını oluşturan kanserlerin mekanizmalarının aydınlatılarak kilit molekülleri hedefleyen hedefe yönelik tedaviler kanser tedavisi prensiplerinde ve pratiğinde önemli gelişmelere neden olmuştur. Hedef tedavide kullanılan tirozin kinazlardan biri olan bosutinib kanser tedavisinde araştırmacıların dikkatini çekmeyi başarmıştır. Literatürde bosutinib ile ilgili yapılan çalışmaların sonucu ilk etapta kronik myeloid lösemi üzerine odaklanılmıştır. Bununla birlikte yoğun çalışmalar sonuç getirmiş 2012 yılında bosutinib, Gıda ve ilaç idaresi (FDA) tarafından tedaviye dirençli veya intolerans gelişmiş yetişkin kronik miyeloid lösemi (kml) hastalarında kullanımı için onaylanmıştır. Araştırmacılar bununla yetinmeyip tirozin kinaz inhibitörlerini solid tümörlerde de denemeye başlamışlardır. Bosutinibin, solid tümörlerin tedavisindeki rolünün araştırıldığı çalışmalardan biri olarak 2006 yılında Colluccia ve arkadaşlarının yaptığı kolorektal kanserler üzerinde yaptıkları çalışma gösterilebilir. Bu çalışmada, bosutinibin B catenini destekleyerek E-cadherine daha yüksek afiniteli bağlanma sağladığı ve böylece kolorektal hücrelerin motilitesini azatlığı gösterilmiştir (69). Bir diğer çalışma örneği de 2007 yılında Jellal ve arkadaşlarının yaptıkları meme kanseri hücre hatlarındaki çalışmadır. Bu çalışmada da, bosutinibin göğüs kanseri hücre hatlarında protein kinazların mitojen aktivasyonunu ve fosforilasyonunu inhibe ederek hücrelerin proliferasyonunu, invazyonunu ve migrasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (70). Rothschild ve arkadaşları 2010 yılında Src' nin akciğer kanserlerinde aşırı eksprese olduğu ve/veya hiperaktif olduğu göstermiştir. Buna

göre ilk sonuçlar dasatinib ve bosutinib gibi Src inhibitörlerinin akciğer ca'da antikanser aktivite için olumlu sonuçlar sağladığı yönündedir (71).

Bosutinib'in Bcr-Abl pozitif üç ayrı kronik myelositer lösemi (KML) hücre dizisinde antiproliferatif etki gösterdiği ve IC<sub>50</sub> değerlerinin üç hücre dizisi arasında 5 nM ve 20 nM arasında farklılık gösterdiği bildirilmiştir (72). 2007 yılında yayınlanan bir çalışmada, bosutinibin meme kanseri hücrelerinde in vitro ve in vivo ortamda invazyon, büyüme ve metastazı engellediği saptanmıştır (73). Rabhani ve arkadaşları prostat ca olgularında, bosutinib'in Src aktivasyonunu, hücre proliferasyonunu, migrasyonu ve invazyonu in vitro olarak azalttığını; in vivo olarak deneysel iskelet metastazı alanında tümör hacminde anlamlı (%50) azalma sağladığını göstermişlerdir (74). Serviks kanseri hücrelerinde bosutinib ve EGFR reseptör inhibitörü etkilerini karşılaştıran çalışmada, bosutinibin çalışılan her iki hücre dizisinde anlamlı hücre proliferasyon inhibisyonu yaptığı bildirilmiştir (75). Çalışmamızda, Bosutinibin, sitotoksik veya anti-proliferatif etkisinin gözlemlendiği optimum konsantrasyon değerlerinin (IC<sub>50</sub> değerlerinin) belirlenmesi için yapılan MTT analizi sonucunda serviks kanseri hücre hattı CCL-62'nin proliferasyonunu önemli derece baskıladığı gözlenmiş ve önemli bir anti-proliferatif ajan olarak rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır. Bu bulgumuz, daha önce yapılmış çalışmalarda bildirilen ve bosutinibin antiproliferatif etkisi olduğu yönündeki bu sonuçlarla uyumludur. Bununla birlikte; meme kanseri hücrelerinde yapılan bir çalışmada 48 saatlik dönemde bosutinibin, hücre proliferasyonu ve sağ kalımını etkilemediği ancak invazyon oranını azalttığı yönünde bir sonuç da bildirilmiştir (76). Yazarlar bu sonucu, hücre proliferasyonunun, Src yolağı dışında hücre içi diğer yollarla da ilgili olmasına atfetmişlerdir.

Çalışmamızda HeLa (CCL-62) hücre hattı için bosutinibin IC<sub>50</sub> değerleri 24, 48 ve 72 saat için sırasıyla 13,1µM, 7,5µM ve 4,4µM olarak belirlenmiştir. Yasmeen ve arkadaşlarının iki farklı serviks kanser hücre dizisi (HeLa ve SiHa) kullandığı çalışmada, bosutinibin 48. Saatte

10 µM konsantrasyonda her iki hücre dizisinde anlamlı hücre proliferasyon inhibisyonu yaptığı bildirilmiştir (75). Bu değer, bizim elde ettiğimiz 48. Saat IC50 değeri (13,1µM ) ile benzerdir. Yazarlar, söz konusu çalışmada bosutinibin antif proliferatif etkinliğini EGFR inhibitörü gefitinib ile de karşılaştırmışlar ve iki ajanın da hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini, bosutinib' in daha düşük dozda G0-G1 hücre siklusu arresti ve S ve G2-M redüksiyonu yaptığını saptamışlardır.

Memeli hücrelerinde DNA hasarı ajanı ile oluşturulan çift zincir kırıklarına karşı gerçekleşen erken yanıtlardan birisi histon H2AX' de bulunan (S/T)Q motifinin fosforilasyonudur. Serimizde bosutinibin, DNA hasarındaki rolü öncelikli olarak H2AX fosforilasyonu ile sorgulanmaya çalışılmış ve bu amaçla CCL-62 hücrelerine 24 saat süreyle 5µM, 10µM ve 20µM konsantrasyonlarında bosutinib uygulanmıştır. CCL-62 hücrelerinde Bosutinibin doz bağımlı olarak DNA hasarının artmasına yol açtığı ve 20µM uygulamasında neredeyse tüm hücrelerin etkilendiği belirlenmiştir. Bosutinib, CCL-62 serviks kanseri hücre hattında DNA çift zincir kırıkları aracılığıyla DNA hasarına yol açmaktadır.

Elde ettiğimiz diğer bir önemli bulgu bosutinibin, CCL-62 serviks kanseri hücre hattında Kaspaz 3 aktivasyonunu tetiklemesidir. Çalışmamızda, Kaspaz aktivasyonu için pozitif kontrol olarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kullanılmıştır. Bosutinibin, 10µM ve 20µM uygulamalarının pozitif kontrol olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>' ye göre daha yüksek oranda kaspaz-3 ekspresyonuna yol açtığı ve hücreleri apoptoza götürdüğü belirlenmiştir. Kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında, bosutinib uygulanmış hücrelerde kaspaz 9 ve 3 seviyelerinin yaklaşık 10 kat arttığı gözlenmiştir. Hebbard ve arkadaşları transgenik farelerde meme kanserinde bosutinibin etkisini araştırmışlar, ilacın hastalığın hem erken hiperplastik aşamalarını hem de aşikar tümör büyüme aşamalarını baskılayıcı etki gösterdiğini saptamışlardır. Ayrıca bosutinib' in kanser gelişimini tümör hücrelerinin displastik diferansiasyonunu indükleyerek ve vasküler

organizasyonunu değiştirerek durdurduğunu; bu yanıtların agresif meme kanseri belirleyicisi olan EZH2 Polycomb group histone H3K27 methyl transferase'ı downregüle ettiğini bildirmişlerdir (77).

Çalışmamızda bunların yanı sıra apoptoz ilişkili bir etki olarak; bosutinibin CCL-62 serviks kanseri hücre dizisinde DNA hasarı ve apoptoz yolağı ile ilişkili proteinlerin seviyelerini değiştirdiği saptanmıştır. Bunun için DNA hasarı ve apoptoz yolağındaki etkinliği western-blot uygulaması ile çalışılmıştır. Bosutinib IC<sub>50</sub> değerlerine yakın konsantrasyon aralıklarında olacak şekilde 5, 10 ve 20µM değerlerinde hücrelere uygulanmış ve doz bağımlı etkinlikleri incelenmiştir. Bosutinib uygulaması ile artan apoptozun, PARP proteininin parçalanarak seviyesinin yaklaşık 12 kat azalmasına ve dolayısıyla aktif PARP seviyesinin yaklaşık 10 kat artmasına yol açtığı gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda saptadığımız bu önemli bulgular bosutinib'in apoptoz kontrol mekanizmaları üzerindeki etkilerinin altını çizmektedir. Neoplastik hücrelerdeki DNA hasarı bu hücrelerin apoptoza ve/veya direkt olarak hücre ölümüne ilerlemesine katkıda bulunabilir. Chk1 (checkpoint kinaz 1) DNA hasarı yanıtını ve hücre döngüsü kontrol noktası yanıtını koordine eden bir proteindir (78). Dai ve arkadaşları insan multipl myelom hücrelerinde in vivo ve in vitro olarak Src inhibisyonunun, Chk1 (checkpoint kinaz 1)-inhibitörü ile indüklenmiş apoptozu arttırdığını ortaya koymuşlardır (79). Src inhibitörlerinin bu etkiyi RAS/MEK/ERK yolağı ile etkileşerek yaptığı belirtilmiştir. Nguyen ve arkadaşları, bosutinibin, imatinib dirençli KML ya da Ph (+) ALL hücre dizilerinde Mcl-1 inhibisyonu, p34 defosforilasyonu, BimEL up-regülasyonu ve DNA hasarı ile ilişkili apoptozu belirgin düzeyde arttırdığını ve mekanizmanın ERK1/2 yolağı üzerinden etkili olduğunu saptamışlardır (80).

Kaspaz 3 ve 9, "cysteine-aspartic acid protease (caspase)" ailesinin üyesi olup diğer kaspazlar ile etkileşim içerisinde apoptozda rol

oynayan enzimlerdendir. Diğer kaspazlar gibi hücre içerisinde inaktif zimojen olarak bulunmakta ve hücreye apoptoz sinyali geldiğinde aktive hale gelerek diğer kaspazlarla etkileşime girmektedirler. Dolayısıyla; hücrelerde kaspaz aktivitesi artışı apoptoz göstergesi olarak kullanılmaktadır. Farklı kanser türlerinde kaspaz bağımlı apoptoz yoluyla etki eden anti-kanser ilaçlar araştırılmakta ve geliştirilmektedir (81,82). Bir diğer Src inhibitörü olan dasatinib'in valproik asit ile sinerjistik etki göstererek akut myeloid lösemi hücrelerinde G1 hücre arresti yanı sıra PARP, kaspaz 3, 7 ve 9 aktivasyonu yoluyla kaspaz bağımlı apoptozu uyardığı gösterilmiştir (83). Benzer şekilde; insan nöroblastoma hücrelerinde 3 ayrı Src kinaz inhibitörü (SI 34, SI 35 ve SI 83) etkisi araştırılmış ve kaspaz 3 aktivite testi SI 34'ün apoptozu indüklediğini göstermiştir.

PARP ("Poly ADP ribose polymerase") DNA tamiri ve apoptoz başta olmak üzere çeşitli biyolojik görevleri olan bir protein ailesidir. Normalde nükleusta bulunur. Özellikle PARP-1 DNA'daki tek sarmal kırıklarının tamirinde rol oynamaktadır. DNA hasarı olan bir hücrede PARP aktive olarak hücrede ATP baskılanması sonucu nekroza neden olabilir veya PAR üretimi yoluyla mitokondriden apoptoz indükleyici faktörün salınmasını ve apoptozun uyarılmasını sağlayabilir (84). Çalışmamızda Bosutinib uygulaması ile artan apoptozun, PARP proteininin parçalanarak seviyesinin yaklaşık 12 kat azalmasına ve dolayısıyla aktif PARP seviyesinin yaklaşık 10 kat artmasına yol açtığı ve bu hücrelerde kaspaz 9 ve 3 seviyelerinin de yaklaşık olarak 10 kat artması ile CCL-62 hücrelerinin bosutinib aracılığıyla apoptozu sürüklendiği sonucuna varılmıştır.

Bilgilerimize göre literatürde HeLa hücre dizisinde bosutinib etkisinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (75). Yasmeen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, iki farklı serviks kanser hücre dizisinde (HeLa ve SiHa) Bosutinibin serviks kanseri hücre dizilerinde antiproliferatif etkinliği EGFR inhibitörü gefitinib ile karşılaştırılmıştır.

Bosutinib'in daha düşük dozda etki ettiği görülmüştür. Yazarlar, bosutinibin, gefitinibden farklı olarak tümör hücre migrasyonunda görevli yolakları ve b-katenin yoluyla invazyon genleriyle ilişkili yolakları da inhibe ettiği için serviks kanseri tedavisinde umut vadecici bir ajan olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da benzer olarak bosutinibin pozitif kontrol olarak kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> · a ya göre daha yüksek oranda kaspaz aktivasyonu yaparak hücreleri apoptoza götürdüğü ve ayrıca DNA çift zincir kırıklarına yol açarak doz bağımlı olarak DNA hasarı yaptığı gösterilmiştir.

Kanserin tedavisinde önemli dönüm noktalarından biri olan hedef tedavideki başarılar ileriki dönemlerde araştırmacıların bu konu üzerine daha çok gideceğini göstermektedir. Bosutinib' in de hedef tedavideki yerinin ilerleyen zamanlarda daha da artacağı gözükmektedir. Kronik miyeloid lösemi (KML) hastalarında klinik kullanıma giren Bosutinib ile ilgili bir çok prelinik ve faz çalışmaları yapılmış ve bir çok yeni çalışma da devam etmektedir. Ayrıca klinik kullanımlar arttıkça ilacın bilinmeyen etki ve/veya yan etkileri de daha çok gün yüzüne çıkacaktır. Bosutinibin meme, prostat, pankreas, akciğer ve serviks kanseri gibi solid tümörlerde de araştırıldığı bir Faz I (NCT00195260) çalışmasında bosutinib'in genellikle iyi tolere edildiği ve daha çok gastrointestinal yan etkiler görüldüğü bildirilmiştir (85). Farklı bir Faz II (NCT00319254) çalışmada kemoterapi görmüş lokal ileri evre ya da metastatik meme ca olgularında bosutinibin, progresyonsuz sağkalım süresini uzatmada umut verici sonuçlar sağladığı bildirilmiştir. İlaç genelde iyi tolere edilmiştir; en sık toksik etkiler diyare (%66), bulantı (%55) ve kusma (%47) ve minimal kemik iliği supresyonu olarak bildirilmiştir (86). Farklı bir çalışmada da ileri evre solid tümörler üzerinde faz I çalışması yapılmıştır. Çalışma doz yükseltme ve doz ekspansiyonu olmak üzere iki bölüm halinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada en sık görülen bosutinib ilişkili ters etkiler bulantı, ishal, kusma, yorgunluk ve iştahsızlık olup KML olgularında yapılan bosutinib çalışmalarında imatinibe dirençli ya da toleranssız hastalardakilere benzer olarak saptanmıştır.

Transaminaz yüksekliği ve yorgunluk ileri solid tümörlü olgularda doz azaltımı için ana nedenler olarak bildirilmiştir (87).

Çalışmamızın en büyük kısıtlamalarından biri tek hücre dizisi üzerinde çalışılmasıdır. Bunun nedeni başka bir serviks kanseri hücre kültürü olan HTB-32 birkaç kez üretilmeye çalışılmış ancak teknik sorunlar nedeniyle başarılı olunamamasıdır. Çalışmamızın diğer kısıtlamalarından biri de bosutinibin diğer tirozin kinaz inhibitörleriyle karşılaştırma yapılamamasıdır. Bunun nedeni ise hem ilacın teminindeki zorluklar hem de çalışmanın bütçesindeki kısıtlılık olmuştur. Bunlar ile birlikte; bulgularımız umut verici olup daha fazla hücre dizisinde, daha geniş bütçe ile oluşturulacak ve birden fazla ajanın bosutinib ile karşılaştırılabileceği ayrıntılı çalışmalar için zemin hazırlamaktadır.

## VI. SONUÇ

1. MTT analizi sonucunda bir tirozin kinaz inhibitörü olan bosutinibin serviks kanseri hücre hattı CCL-62'nin proliferasyonunu önemli derece baskıladığı gözlemlendi ve önemli bir anti-proliferatif ajan olarak rol oynayabileceği sonucuna varıldı.
2. Bosutinib, CCL-62 serviks kanseri hücre hattında DNA çift zincir kırıklarına yol açarak doz bağımlı olarak DNA hasarına yol açtığı sonucuna varıldı.
3. Bosutinib uygulamasının pozitif kontrol olarak kullanılan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e oranla daha yüksek oranda kaspaz-3 aktivasyonunu tetiklediği ve hücreleri apoptoza sürüklediği belirlendi.
4. Bosutinib uygulaması ile artan apoptozun, PARP proteininin parçalanarak seviyesinin yaklaşık 12 kat azalmasına ve dolayısıyla aktif PARP seviyesinin yaklaşık 10 kat artmasına yol açtığı gözlemlendi. Kontrole oranla bosutinib uygulanmış hücrelerde kaspaz 9 ve 3 seviyelerinin de yaklaşık olarak 10 kat artması ile CCL-62 hücrelerinin bosutinib aracılığıyla apoptoza sürüklendiği sonucuna varıldı.
5. Bosutinib'in insan serviks kanseri CCL-62 (HeLa Contaminantı) hücre dizisinde doz bağımlı olarak apoptozu indüklediği ve DNA hasarını arttırdığını sonucuna varıldı.

## VII. ÖZET

### 'SERVİKAL KANSERDE HEDEF TEDAVİ: SRC TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ'

**AMAÇ:** Serviks kanseri hücre kültürlerinde tirozin kinaz inhibitörü Bosutinib'in etkisinin incelenmesi

**GEREÇ VE YÖNTEM:** İnsan serviks kanseri hücre hattı olan CCL-62 HeLa kontaminantı, uygun koşullarda optimize edilmiş ve Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji bölümünde tüm hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır. Gerekli üreme koşulları sağlanan bu hücre hatlarına bir Src-tirozin kinaz inhibitörü olan bosutinibin (SKI-606) farklı konsantrasyonları uygulanmıştır.

MTT sitotoksikite testleri ile sitotoksik veya anti-proliferatif etkinin gözlemlendiği optimum konsantrasyon değerlerinin ( $IC_{50}$  değerlerinin) belirlenmiştir. Daha sonra hücreler primer antikor ile işaretlenip, florokrom takılı sekonder antikorlar ile belirlenip floresan mikroskopu ile incelenmiştir. Hücrelere madde uygulamalarıyla gelişen DNA hasarı nükleer odak oluşumları ölçülmüş ve apoptoz miktarı ise annexin-5 ve kaspaz boyamaları ile görüntülenerek incelenmiştir. Kalorimetrik kaspaz-3 analizi yapılarak bosutinibin serviks kanseri hücre hatlarında apoptoz aktivasyonuna yol açıp açmadığına bakılmıştır. Son olarak western-blot yöntemi kullanılarak DNA hasarı ile ilişkili olarak  $\gamma$ H2AX, ATM, p53 seviyelerine ve apoptoz ile ilişkili olarak PARP kırılması, kaspaz 3 ve 7 seviyelerine bakılmıştır. Burada madde uygulamalarına bağlı olarak hücre grupları arasındaki değişiklikleri saptanması amaçlanmıştır.

Veriler, Microsoft Excel (XP) ve GraphPad yazılımı aracılığıyla grafiksel olarak ve "Image J" analiz programı kullanılarak histogram grafikleri ile değerlendirildi.

**BULGULAR:** Tirozin kinaz inhibitörü "Bosutinib", CCL-62 serviks kanseri hücre hattında DNA çift zincir kırıklarına yol açarak DNA

hasarına yol açtığı ve Kaspaz 3 aktivasyonunu tetikleyerek anti-proliferatif etki gösterdiği görülmüştür.

**SONUÇ:** Bir trozin kinaz inhibitörü olan Bosutinib'in, serviks kanseri hücrelerinde (CCL-62 He-La kontaminantı), antiproliferatif etki göstererek DNA hasarı oranını arttırdığı ve apoptozu indüklediği görüldü. Bu etkilerle Bosutinibin serviks kanser tedavisinde etkili olabilecek bir ajan olabileceği sonucuna varılmıştır. Bu etkinin ilerde yapılacak hayvan ve insan çalışmaları ile doğrulanması gerekmektedir.

**ANAHTAR KELİMELEER:** Servikal kanser, Tirozin Kinaz inhibitörleri, Bosutinib, hedef tedavi

## VIII. İNGİLİZCE ÖZET

### TARGETED TREATMENT FOR CERVICAL CANCER: SRC-TYROSİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ

**OBJECTIVE:** Investigation of the effect of the cell culture level of the tyrosine kinase inhibitors in the treatment of cervical cancer

**MATERIAL AND METHODS:** CCL-62 HeLa contaminant, a human cervical cancer cell line, was optimized in appropriate condition in Department of Medical Biology of Celal Bayar University Medical School. A src-kinase inhibitor named as Bosutinib (SKI-606) was administered in different concentration to these cell lines.

Optimal concentration values (IC50 values) for cytotoxic or anti-proliferative effects were determined by MTT cytotoxicity tests. Then, the cells were marked by primary antibodies, identified by secondary antibodies affixed to fluorochrome and examined by fluorescent microscope. The damaged focuses in DNA by the study agent was assessed and the rate of apoptosis was evaluated by imaging the annexin-5 and caspase activities. Calorimetric caspase-3 analysis was used for analyzing if bosutinibe activated apoptosis in cervical cancer cell lines. Lastly, the levels of  $\gamma$ H2AX, ATM, p53 were evaluated as markers of damage in DNA and sheared PARP, caspase 3 and 7 were evaluated as markers of apoptosis; for the consideration of the effect of the agent on the cell lines.

The data was analyzed graphically by Microsoft Excel (XP) and GraphPad software programs and with histogram graphics by Image Z analyze programme.

**RESULTS :** A Tyrosine Kinase Inhibitor "Bosutinib" was found to be responsible for DNA damage by causing DNA double-chain fragmentation and had antiproliferative effect by activating caspase 3.

**CONCLUSION** : A tyrosine kinase inhibitor “Bosutinib” shows anti proliferative effect on cervix cancer CCL-62 He-La cell lines by DNA damaging and inducing the apoptosis. This findings indicate that bosutinib can be an effective agent in cervical cancer treatment. Much more animal and human studies need to be done to verify this effect.

**KEYWORDS** : Cervical cancer, Tyrosin kinase inhibitors, Bosutinib, Targeted treatment

## IX. KAYNAKLAR

1. Globocan 2012. Cervical Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012
2. Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri 2009.
3. Comprehensive cervical cancer control. A guide to essential practice. World Health Organization 2006.
4. Planning and implementing cervical cancer prevention and control programs: A manual for managers. Alliance for Cervical Cancer Prevention (ACCP). 2004.
5. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signaling. *Nature* 2001; 411:355-64.
6. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med.* 2005; Jul 14; 353: 172–87.
7. Jallal H, Valentino ML, Chen G et al. A Src/Abl kinase inhibitor, SKI-606, blocks breast cancer invasion, growth, and metastasis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2007;67:1580 –1588
8. Ho A. Dowdy SF. Regulation of G1cell-cycle progression by onkogenes and tumor suppressor genes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2002;1: 47-52
9. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell.* 1995; 81: 323–30.
10. Scriver CR. Beaudet AL, Sly WS., Valle D. *The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease.* McGraw-Hill. 2001; 613-74.
11. Heuvel van den. Harlow E. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 262, 1993; 2050–4.
12. Kopnin BP. Targets of onkogenes and tümör suppressors: key for understanding basic mechanisms of carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc).* 2000; 1: 2-27.
13. Brown VD. Phillips RA. Gallie BL. Cumulative effect of phosphorylation of pRB on regulation of E2F activity. *Mol Cell Biol.* 1999;19:3246–56.

14. Cotran R. Kumar V. Collins T. (1998). Robins Pathologic Basis of Disease. In: Cellular Pathology I: Cell Injury and Cell Death. Cellular Pathology, II: Adaptations, Intracellular Accumulations, and Cell Aging. Philadelphia: WB Saunders Co. 238-85.82- Ohtsubo M. Theodoras A. Schumacher
15. J. Roberts J. Pagano M. Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol Cell Biol.* 1995; 15: 2612–24.
16. Onat T. Emerk K. Sözmen EY. (2002). İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme yayıncılık 569-75.
17. Pediconi N. Ianari A. Costanzo A. Belloni L. Gallo R. et.al. Differential regulation of E2F1 apoptotic target genes in response to DNA damage. *Nat Cell Biol.* 2003; 6:552-8.
18. Ameisen JC, Estaquier J. Idziorek T. De Beis F. Programmed cell death and AIDS pathogenesis: significance and potential mechanisms. *Curr Top Microbial Immunol.* 1995; 200:195-211.
19. Dragunow M, MacGibbon GA, Lawlor P, et al. Apoptosis, neurotrophic factors and neurodegeneration. *Rev, Neurosci.* 1997; 8:223-65.
20. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *The Oncologist* 1999;4:332-9
21. Hetts SW. To die or not to die. *The Journal of The American Medical Association (JAMA)* 1998; 279:300-7.
22. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology* 1998; 16:395-419
23. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Official Publication of The American College of Chest Physi-cians (CHEST)* 2000; 117:1771-7.
24. Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proceedings of The National Academy of Science of The United States of America (PNAS)* 2001; 98:13884-8.

25. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Annual Review of Biochemistry 2000; 69:217-45.
26. Patnick J. Cervikal screening programme. J MedScreen 1999;6:57.
27. Stilson T, Knight AL, Elsvick RK Jr. The effectiveness and safety of two cervical cytologic techniques during pregnancy. Journal of Family Practice 1997;45:159-63
28. Cronje HS. Screening for cervical cancer in a developing countries. Int J Gynecol and Obstet 2004;84:101-8.
29. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol. 1999 Sep;189(1):12-9.
30. Münger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. (1992) Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. Cancer Surv. 12:197-217.
31. Ries LAG, Kosary CL, Hankey BF. SEER Cancer Statistics Review. 1998; 1973-1995. Bethesda, MD, National Cancer Institute.
32. Weinstein LC, Buchanan EM, Hillson C, Chambers CV. Screening and prevention: Cervical Cancer 2009 Sep;36(3):559-74
33. Burger RA, Monk BJ, Kurosaki T, Anton-Culver H, Vasilev SA, Berman ML, Wilczynski SP. Human papillomavirus type 18: association with poor prognosis in early stage cervical cancer. J Natl Cancer Inst. 1996; 2;88(19):1361-8. Review.
34. Yiice K. Human Papilloma Virus infeksiyonları. In: Uzun O, Unal S, eds. Güncel Bilgiler ışığında infeksiyon Hastalıkları, Ankara; Bilimsel Tıp Yayınevi: 2001. p.425-43.
35. Onan M.A, HPV Virolojisi, Epidemiyoloji ve Genital Kansere İlişkisi, Türkiye Klinikleri J Gynecol Obst-Special Topics 2009;2(1): 1-8
36. Kjaer SK, Engholm G, Dahl C, Bock JE. Case-control study of risk factors for cervical squamous cell neoplasia in Denmark. IV: role of smoking habits. Eur J Cancer Prev. 1996; 5(5):359-65.

37. De Villiers EM. Human papillomavirus. Introduction. *Semin Cancer Biol* 1999;9:377.
38. Munoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 2000;19:1–5.
39. Bosch FX, de Sanjose S Human Papillomavirus and cervical Cancer burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monographs* 2003; 3–13.
40. Güner H, Taşkıran Ç. Serviks kanseri epidemiyolojisi ve human papillomavirüs. *TJOD* 2007;4: 11–19.
41. Doorbar J, Elston RC, Napthine S, et al. The E1E4 protein of humanpapilloma virus type 16 associates with a putative RNA helicase through sequences in its C terminus. *J Virol* 2000;74:10081-95.
42. Roberts S, Ashmolel, GibsonLJ, RookesSM, BartonGJ, Gallimore PH. Mutation alanalysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in the formation of cytoplasmic E4/cytokeratinnetworks in epithelialcells. *J Virol* 1994;68:6432-45.
43. Tsai TC, Chen SL. The biochemical and biological functions of human papillomavirus type 16 E5 protein. *ArchVirol* 2003;148:1445-53.
44. Storrs CH, Silverstein SJ. PATJ, a tight junction-associated PDZ protein, is a novel degradation target of high-risk human papillomavirus E6 and the alternatively spliced isoform 18 E6. *J Virol* 2007;81(8):4080-90.
45. Lu Z, Hu X, Li Y, Zheng L, Zhou Y, Jiang H, et al. Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferences with insulin signaling pathway by binding to tuberin. *J Biol Chem* 2004;279(34): 35664-70.
46. Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller L, Woodworth CD. Papillomavirustype 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation associated and NF-kappa B responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 2001;75:4283-96.

47. Mattiussi S, Matsumoto K, Illi B, Martelli F, Capogrossi MC, Gaetano C. Papilloma protein E6 abrogates shear stress-dependent survival in human endothelial cells: evidence for specialized functions of paxillin. *Cardiovasc Res* 2006;70(3):578-88.
48. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* 2000;275:6764-9.
49. Stanley MA. Immunobiology of papillomavirus infections. *J Reprod Immunol* 2001;52:45-59.
50. Cason J. Perinatal acquisition of cervical cancer associated papillomaviruses. *Br J Obstet Gynaecol* 1996;103:853-8.
51. Köse F, Turan T, Servikal Kanser Tumorogenez ve PIPV, Türkiye Klinikleri Gynecol Obst-Special Topics 2009;2(l):13-8
52. Park JS, Rhyu KS, Kim CJ, Kim HS, Han KT, Ahn HK, et al. Presence of oncogenic HPV DNAs in cervical carcinoma tissues and pelvic lymph nodes associated with proliferating cell nuclear antigen expression. *Gynecol Oncol* 1996;60:418-23.
53. Cox JT. Clinical role of HPV testing. *Obstet Gynecol Clin North Am* 1996;23(4): 811-51.
54. Arvas M, Gezer A. Genital HPV , İstanbul medikal yayıncılık, 2007 975-9944-211-04-8
55. Wright TC Jr, Schiffman M. Adding a test for human papillomavirus DNA to cervical cancer screening. *N Engl J Med* 2003;348(6):489-90
56. Te Linde's Operative Gynecology Dokuzuncu Basım ( Türkçe Basım) Jhan A. Rock, Howard W. Jones Bölüm 45-46 sayfa;1231.1232.1233.1234.1235.1252.1254.
57. - Köse MF. Intraepitelial Serviks Hastalıkları. Çiçek NN, Akyavek C, Çelik Ç, Haberal A (Editörler). Kadın Hastalıkları ve Doğum Bilgisi 2. Baskı. İstanbul: Güneş Kitabevi; 2006. s.1145-61.

58. Sankaranarayanan R, Wesley R, Somanathan T. Visual inspection of the uterine cervix after the application of acetic acid in the detection of cervical carcinoma and its precursors. *Cancer* 1998;83:2150-8.
59. Sankaranarayanan R, Ramani S, Wesley R. A Practical Manual on Visual Screening for Cervical Neoplasia (Servikal Neoplazilerde Gözle Tarama Pratik El Kitabı). Özgül N (Çeviri editörü). 1. baskı. Ankara: Ankara Form Matbaacılık; 2005.9–14.
60. Han AC, Merzouk M, Belch RZ. Update on cervical cancer. *Cancer Ther.* 2005;3: 243–48.
61. Disaia PJ, Creasman WT. *Clinical Gynecologic Oncology (Klinik Jinekoloji Onkoloji)*. Ayhan A (Çeviri editörü). 6. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi; 2003. 53–111.
62. Pawson T, Raina M, Nash P. Interaction domains: From simple binding events to complex cellular behavior. *FEBS Letters* 2002; 513:2-10.
63. Pawson T. Regulation and targets of receptor tyrosine kinases. *Eur J Cancer* 2002; 38(Suppl 5):3-10.
64. Jones RJ, Brunton VG, Frame MC. Adhesion-linked kinase in cancer; emphasis on Src, focal adhesion kinase and PI 3-kinase. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1595-606.
65. Frame MC. Src in cancer: Deregulation and consequences for cell behavior. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602:114-30.
66. Kwak EL, Sordella R, Bell DW, Godin-Heymann N, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 7665–70.
67. Hartmann JT, Haap M, Kopp HG, Lipp HP. Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr Drug Metab.* 2009; 10: 470–81.

68. Chen MH, Kerkelä R, Force T. Mechanisms of cardiac dysfunction associated with tyrosine kinase inhibitor cancer therapeutics. *Circulation*. 2008; 118: 84–95.

69. Coluccia AM, Benati D, Dekhil H et al. SKI-606 decreases growth and motility of colorectal cancer cells by preventing pp60(c-Src)-dependent tyrosine phosphorylation of beta-catenin and its nuclear signaling. *Cancer Res* 2006; 66:2279 –2286.

70. Golas JM, Lucas J, Etienne C et al. SKI-606, a Src/Abl inhibitor with in vivo activity in colon tumor xenograft models. *Cancer Res* 2005; 65:5358 –5364.

71. Daud AI, Krishnamurthi SS, Saleh MN, Gitlitz BJ, Borad MJ, Phase I study of bosutinib, a src/abl tyrosine kinase inhibitor, administered to patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res*. 2012 Feb 15;18(4):1092-100. Epub 2011 Dec 16.

72. Golas JM, Arndt K, Etienne C, Lucas J, Nardin D, SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. *Cancer Res*. 2003 Jan 15;63(2):375-81.

73. Jallal H, Valentino ML, Chen G, Boschelli F, Ali S, Rabbani SA. A Src/Abl kinase inhibitor, SKI-606, blocks breast cancer invasion, growth, and metastasis in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2007 Feb 15;67(4):1580-8.

74. Rabbani SA1, Valentino ML, Arakelian A, Ali S, Boschelli F. SKI-606 (Bosutinib) blocks prostate cancer invasion, growth, and metastasis in vitro and in vivo through regulation of genes involved in cancer growth and skeletal metastasis. *Mol Cancer Ther*. 2010 May; 9(5):1147-57. Epub 2010 Apr 27.

75. Yasmeen A1, Alachkar A, Dekhil H, Gambacorti-Passerini C, Al Moustafa AE. Locking Src/Abl Tyrosine Kinase Activities Regulate Cell Differentiation and Invasion of Human Cervical Cancer Cells Expressing

E6/E7 Oncoproteins of High-Risk HPV. *J Oncol.* 2010;2010. pii: 530130. Epub 2010 Aug 25

76. Vultur A, Buettner R, Kowolik C, Liang W, Smith D, Boschelli F, Jove R. SKI-606 (bosutinib), a novel Src kinase inhibitor, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2008 May;7(5):1185-94.

77. Hebbard L, Cecena G, Golas J et al. Control of mammary tumor differentiation by SKI-606 (bosutinib). *Oncogene* 30.2011; 301–312

78. McNeely S1, Beckmann R2, Bence Lin AK. CHEK again: revisiting the development of CHK1 inhibitors for cancer therapy. *Pharmacol Ther.* 2014 Apr;142(1):1-10 Epub 2013 Oct 15

79. Dai Y, Chen S, Shah R, Pei XY, Wang L, Disruption of Src function potentiates Chk1-inhibitor-induced apoptosis in human multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Blood.* 2011 Feb 10;117(6):1947-57. Epub 2010 Dec 10.

80. Nguyen T1, Hawkins E1, Kolluri A1, Kmiecik M2, Park H. Synergism between bosutinib (SKI-606) and the Chk1 inhibitor (PF-00477736) in highly imatinib-resistant BCR/ABL<sup>+</sup> leukemia cells. *Leuk Res.* 2015 Jan;39(1):65-71. Epub 2014 Nov 11

81. Pang L, Zhao X, Liu W, Deng J, Tan X, Qiu L. Anticancer Effect of Ursodeoxycholic Acid in Human Oral Squamous Carcinoma HSC-3 Cells through the Caspases. *Nutrients.* 2015 May 5;7(5):3200-18.

82. Hui LM, Zhao GD, Zhao JJ. δ-Cadinene inhibits the growth of ovarian cancer cells via caspase-dependent apoptosis and cell cycle arrest. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 Jun 1;8(6):6046-56. eCollection 2015.

83. ) Heo SK, Noh EK, Yoon DJ, Jo JC, Park JH. Dasatinib accelerates valproic acid-induced acute myeloid leukemia cell death by regulation of differentiation capacity. *PLoS One.* 2014 Jun 11;9(2):e98859 eCollection 2014.

84. Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell

death. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Nov 28;103(48):18314-9. Epub 2006 Nov 20.

85. Messersmith WA, Krishnamurthi S, Hewes BA et al. Bosutinib (SKI-606), a dual Src/Abl tyrosine kinase inhibitor: Preliminary results from a phase 1 study in patients with advanced malignant solid tumors. J. Clin. Oncol. 2007 ASCO Annual Meeting Proceedings 25 (18S), 3552 (2007).

86. Campone M, Bondarenko I, Brinca S et al. Phase II study of single-agent bosutinib, a Src/Abl tyrosine kinase inhibitor, in patients with locally advanced or metastatic breast cancer pretreated with chemotherapy. Ann. Oncol. 2011; 23 (3), 610 – 617.

87. Adil I. Daud, Smitha S. Krishnamurthi, Mansoor N. Saleh. Phase I Study of Bosutinib, a Src/Abl Tyrosine Kinase Inhibitor, Administered to Patients with Advanced Solid Tumors. Clin Cancer Res. 2012 Feb 15;18(4):1092-100. Epub 2011 Dec 16.