

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

THYMOQUINONE'UN DENEYSEL RENAL HÜCRELİ
KANSER MODELLERİNDE ETKİSİ

AHMET DİRİCAN
ORCID: 0000-0001-6992-9289

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
TEMEL ONKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

İZMİR
HAZİRAN 2023

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD.2016970072

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

THYMOQUINONE'UN DENEYSEL RENAL HÜCRELİ
KANSER MODELLERİNDE ETKİSİ

AHMET DİRİCAN
ORCID: 0000-0001-6992-9289

ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
TEMEL ONKOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Safiye Aktaş
ORCID: 0000-0002-7658-5565

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından
2020.KB.SAG.065 numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR
HAZİRAN 2023

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “**Thymoquinone'un Deneysel Renal Hücreli Kansere Modellerinde Etkisi**” başlıklı Doktora tezinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezin özgün olduğunu, tezin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

İmza

Adı Soyadı: Ahmet DİRİCAN

Tarih: 25/05/2023

TEŐEKKÜR

Temel Onkoloji Doktora programında bana doktora yapma imkanını sağlayan, eğitim sürecimde her zaman destek olan ve tecrübelerini benimle paylaşan hocam Prof. Dr. Safiye AKTAŞ'a çok teŐekkür ederim.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji doktora eğitimimde katkılarından ve desteklerinden dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Zekiye ALTUN ve Prof. Dr. IŞıl SOMALI'ya; hem onkoloji ihtisasım hem de Temel Onkoloji doktora eğitimim süresince bana her türlü desteği sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Oktay TARHAN'a; tezimin her aŐamasında desteklerini esirgemeyen, güzel ve uyumlu bir ekip olmamıza katkı sağlayan Aylin EROL ve Özde GÖKBAYRAK'a; doktora eğitimim boyunca bana hep destek olan arkadaşlarım Uzm. Dr. Berke MANOğLU, Uzm. Dr. Yasemin ÇAKIR ve Uzm. Dr. İlknur ULUGÜN'e; doktora eğitimi süresince desteklerini esirgemeyen Uzm. Dr. Hilmi SARI ve Dr. Batuhan YILMAZ'a ve ismini sayamadığım tüm çalışma arkadaşlarıma teŐekkür ederim.

Ahmet DİRİCAN

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLolar DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
KISALTMALAR	vi
ÖZET	viii
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Problemin Tanımlanması.....	1
1.2. Çalışmanın Amacı.....	4
1.3. Çalışmanın Hedefleri.....	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Renal Hücreli Kanserde Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Olası Risk Faktörleri.....	6
2.2. Renal Hücreli Kanserin Patolojik Sınıflandırması.....	7
2.3. Renal Hücreli Kansere Evreleme.....	7
2.4. Renal Hücreli Karsinom Tedavisi.....	8
2.4.1. Lokalize Böbrek Hücre Karsinomu Tedavisi.....	8
2.4.2. Adjuvant Tedavi.....	9
2.4.3. İleri Evre Böbrek Hücre Karsinomu Tedavisi.....	9
2.5. Renal Hücreli Kansere Tedavisinde Prognozun Önemi.....	10

2.6 Thymoquinone.....	11
2.6.1 Thymoquinone anti kanser etkileri.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	16
3.2 MTT Canlılık Analizleri.....	17
3.3. Deney Hayvanı Çalışmaları.....	18
3.4 Histopatolojik İncelemeler.....	20
3.4.1 Parafin Bloklama ve Kesit Alma.....	20
3.4.2 Hematoksilen & Eozin Boyama.....	21
3.4.3 İmmünohistokimyasal Boyamalar.....	21
3.5. Apoptoz/Nekroz Oranlarının Belirlenmesi.....	22
3.6 Moleküler Analizler.....	23
3.6.1 Dokudan RNA İzolasyonu.....	23
3.6.2 cDNA İzolasyonu ve PCR Analizleri.....	24
4. BULGULAR.....	26
4.1. MTT Canlılık Analiz Sonuçları.....	26
4.2. Apoptozis/Nekroz Sonuçları.....	27
4.3. Hematoksilen Eozin Boyama Sonuçları.....	28
4.4. İmmünohistokimya Analiz Sonuçları.....	29
4.5. PCR Gen Analizi Sonuçları.....	30
5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	31
6. TARTIŞMA.....	32

7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
8. KAYNAKLAR.....	42
9. EKLER.....	52



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. AJCC evreleme sistemine göre (8. versiyon 2017) RCC’de TNM sınıflaması.....	8
Tablo 2. Deney Hayvanı Grupları.....	19
Tablo 3. Uygulanan doku takip prosedürü.....	20
Tablo 4. İn vivo Annexin V+PI ile apoptozis sonuçları	27
Tablo 5. İn vivo İlaç Uygulamaları Sonrası Kontrole Kıyasla Tedavi Gruplarının İHK Sonuçlarının İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	30
Tablo 6. İn vivo İlaç Uygulamaları Sonrası Kontrole Kıyasla Tedavi Gruplarının RT-PCR Sonuçlarının İstatistiksel Anlamlılık Değerleri	30
Tablo 7. İn vivo İlaç Uygulamaları Sonrası Kontrole Kıyasla Tedavi Gruplarının RT-RT-PCR Sonuçlarının İstatistiksel Anlamlılık Değerleri.....	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nigella Sativa Bitkisi	11
Şekil 2. TQ'nin kimyasal yapısı	12
Şekil 3. TQ'nin kanser ve inflamatuvar hastalıklardaki etki mekanizmaları	13
Şekil 4. Konfluent olan Renca hücresi.....	16
Şekil 5. MTT Testi	17
Şekil 6. İlaç uygulamaları Renca hücre hatlarında 24. saat MTT analiz sonucu	26
Şekil 7. İlaç uygulamaları Renca hücre hatlarında 48. saat MTT analiz sonucu	26
Şekil 8. İlaç uygulamaları Renca hücre hatlarında 72. saat MTT analiz sonucu	27
Şekil 9. TQ+NV Kombinasyon Grubunda Tümör Çevresinde Artmış İnflamatuvar Yanıt Örnekleri	28
Şekil 10. Kontrol grubunda sakrifikasyon sonrası total eksize edilmiş tümör dokusu.....	28
Şekil 11. Kombinasyon ve TQ tedavi grubunda makroskopik tümör bulguları.....	29

KISATMALAR

- AJCC: Amerikan Ortak Kanser Komitesi
AKT: Akt Kinaz
AXL: AXL Reseptör Tirozin Kinaz
Bax: Bcl-2 İlişkili X Proteini
Bcl- XL: B Hücreli Lenfoma- Ekstra Büyük
CD: Farklılaşma Kümeleri
CDK4: Siklin Bağımlı Kinaz-4
CTLA-4: Sitotoksik T Lenfosit İlişkili Antijen
DMSO: Dimetil Sülfoksit
DNA: Deoksiribonükleik asit
EMA: Avrupa İlaç Ajansı
ERK: Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
ESMO: Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği
EVER: Everolimus
FBS: Fetal Bovin Serum
FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGFR: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
HIF1-a: HIF1-alfa
HUVEC: İnsan Umbilikal Venöz Endotel Hücresi
ICAM-1: Hücre İçi Adezyon Molekülü 1
VCAM-1: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü 1
IFN-g: İnterferon Gamma
IMDC: Uluslararası Metastatik Böbrek Hücreli Karsinom Veritabanı
Konsorsiyumu
IP: İntraperitoneal
ITT: Tedavi Amacına Yönelik
JNK: Jun N Terminal Kinaz
KPS: Karnofsky Performans Durumu
MAPK: Mitojen Aktive Edici Protein Kinaz

MET: Hepatosit Büyüme Faktörü
MHC: Doku Uygunluk Proteini
MTT: 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-Difeniltetrazolyum Bromid
NCCN: Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı
NCI: Ulusal Kanser Enstitüsü
NV: Nivolumab
OS: Genel Sağ Kalım
OYO: Objektif Yanıt Oranı
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PD1: Programlı Hücre Ölümü 1
PDE1A: Siklik Nükleotid Fosfodiesteraz
PDGFR: Trombosit Türevi Büyüme Faktörü Reseptörü
PDL1: Programlı Hücre Ölüm Ligandı 1
PFS: Progresyonsuz Sağ Kalım
PI: Propidyum İyodür
PPARS: Peroksizom Proliferatör Aktifleyen Reseptör
PS: Fosfatidilserin
RCC: Renal Hücreli Kanser
RNA: Ribonükleik asit
ROS: Reaktif Oksijen Türevleri
RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640
RT-PCR: Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEER: Sürveyans Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar
SF: Serum Fizyolojik
TCR: T Hücre Reseptörü

THYMOQUINONE'UN DENEYSEL RENAL HÜCRELİ KANSER MODELLERİNDE ETKİSİ

Doktora Tezi

Ahmet DİRİCAN

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temel Onkoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç: *Nigella sativa* tohumlarından ekstrakte edilen biyoaktif bir bileşen olan Thymoquinone'un meme, prostat, mesane ve böbrek hücre kanserine karşı anti inflamatuvar, antioksidan ve anti tümör etkinliğine sahip olduğu kanıtlanmıştır. Thymoquinone'un bir immün kontrol inhibitörü olan Nivolumab ile kombinasyon halinde sinerjistik sitotoksik ve apoptotik etkilerini ve renal hücreli kanser modellerinde mekanizmasını araştırmayı amaçladık.

Gereç-Yöntem: *In vitro* çalışmalar: Renal kanser hücre hattı olan Renca ile hücre kültürü yapıldı ve MTT ve Annexin V + PI ile Thymoquinone ve Nivolumab etkisi analiz edildi. *In vivo* çalışmalar: Renal hücre kanseri modeli, dört grupta 8 haftalık erkek, C57BL/6 farelerine Renca hücreleri subkutan enjekte edildi. Kontrol grubu, Thymoquinone (1,4,7,14 gün, 20 mg/kg İP), uygulanan, Nivolumab (1,6,13 gün 10mg/kg İP) uygulanan, Thymoquinone ve Nivolumab'ın kombine uygulandığı koşul olarak gruplar oluşturuldu. Her deney grubunda 7 hayvan randomize edildi. Apoptoz/nekroz oranları, immün belirteçlerden CD4, CD8, C20, CD34, CD68, VEGFR, PD-1, PD-L1, Kaspaz-3, Kaspaz-9 ve gen düzeyleri olarak; c-kit, c-met, ICAM, E-selectin, VCAM, Tie2, Axl, Flt3, FGFR, Ret, VGFR, PDGFR kantitatif RT-PCR ile tümör dokusu üzerinde değerlendirildi. Sistemik yan etkiler açısından diğer iç organlar patolojik olarak değerlendirildi. İstatistiksel analiz, p<0,05 değerinde Mann Witney U testi ile yapıldı.

Bulgular: Thymoquinone, *in vitro* ve *in vivo* olarak anti tümör etki gösterdi. Ayrıca Nivolumab grubu, immün hücre ölümünde artış gösterdi. Kombinasyon grubunda tümör dokusu belirgin nekroz veya tedaviye tam yanıt gösterdi.

Sonuç: Thymoquinone'un renal hücreli karsinom üzerinde anti tümör etkisi olduğu ve Nivolumab'ın immün hücre ölümü etkilerini artırdığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca tek başına veya kombinasyon halinde diğer organlara yan etkisi yoktur.

Anahtar Kelimeler: Renal Hücreli Kanser, Thymoquinone, immün kontrol noktası inhibitörleri

Tezin sayfa adedi: 87

Danışman: Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

**EFFECT OF THYMOQUINONE ON EXPERIMENTAL RENAL CELL
CANCER MODELS**

Doctorate Thesis

Ahmet DİRİCAN

Dokuz Eylul University Health Sciences Institute

Department of Oncology

ABSTRACT

Effect of Thymoquinone in combination with Nivolumab on Experimental Renal Cell Cancer Models

Objectives: Thymoquinone a bioactive component extracted from the seeds of *Nigella sativa*, has been proved to have antiinflammatory, antioxidant properties anti antitumor efficiency against breast, prostate, bladder, and renal cell cancer. We aimed to investigate the synergistic cytotoxic and apoptotic effects of thymoquinone in combination with Nivolumab, an immuno-control inhibitor, and its mechanism in renal cell cancer models.

Materials-Methods: *In vitro* studies: Cell culture was performed with renal cancer cell line Renca, and the effects of MTT and Annexin V + PI and thymoquinone and nivolumab were analyzed. *In vivo* studies: Renal cancer cells were injected to 8-week-old male, C57BL/6 mice isubcutaneously. Groups were formed as the control group, Thymoquinone group (1,4,7,14 days, 20 mg/kg IP), nivolumab treatment group (1,6,13 days 10mg/kg IP) and combined Thymoquinone and Nivolumab group. Seven animals were randomized in each experimental group. Apoptosis/necrosis rates, immunomarkers CD4, CD8, C20, CD34, CD68, VEGFR, PD1, PDL1, Caspase-3, Caspase-9 and gene levels; c-kit, c-met, ICAM, E-selectin, VCAM, Tie2, Axl, Flt3, FGFR, Ret, VGFR, PDGFR were evaluated on tumor tissue by quantitative RT-PCR.

Other internal organs were evaluated as pathological in terms of systemic side effects. Statistical analysis was performed with the Mann Witney U test at $p<0.05$.

Results: Thymoquinone showed antitumor effect *in vitro* and *in vivo*. It also showed increase in immune cell death of Nivolumab. Tumor tissue showed prominent necrosis or complete response to therapy in combination group.

Conclusion: It was concluded that Thymoquinone has an anti-tumor effect on renal cell carcinoma and increases the immune cell death effects of nivolumab. In addition, it does not have side effects on other organs alone or in combination.

Keywords: renal cell cancer, Thymoquinone, immune check point inhibitors

Page Number: 87

Advisor: Prof. Dr. Safiye AKTAŞ

1. GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımlanması

Renal hücreli kanser (RCC) insidansı 1975'ten 2008'e kadar sürekli bir artış göstermiş ve 2008'den sonra bu ivmenin azaldığı görülmüştür. 2003-2006 yılları arasında beş yıllık sağ kalım %71,3 iken bu oran 2007-2013 yıllarında %75,3'e yükselmiştir (1). Özellikle son 10 yılda yeni hedefleyici tedavilerin kullanılmaya başlanması ile 2007-2013 yıllarına ait sağ kalım verilerindeki bu iyileşmeye katkısı olduğu aşikardır. Bununla birlikte hedefleyici tedavilere rağmen metastatik renal hücreli kanser vakalarının beş yıllık sağ kalım oranları %11,6 oranında kalmış ve plato çizmiştir.

RCC'nin moleküler patogeneziyle ilişkin ilk bilgiler, Von Hippel-Lindau (VHL) hastalığında yapılan çalışmalardan gelmektedir. VHL genindeki mutasyon sonucunda ortamda hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 alfa (HIF-1 α) birikimine neden olmaktadır. HIF-1 α 'nın var olan miktarın üzerinde birikmesi vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiyogenezis ve hücre bölünmesi ile ilişkili proteinleri aktive etmektedir (2). VEGF tümör anjiyogenezinde yer alan en önemli büyüme faktörüdür ve RCC de dahil olmak üzere birçok insan kanserinin büyümesinde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle VEGF yolağını ve onların reseptörlerini hedefleyen ajanlar RCC tedavisinde önemli rol üstlenmiştir.

Sunitinib ve pazopanib, renal hücreli kanser tedavisinde kullanılan VEGF reseptörleri (VEGFR-1,2,3) trombosit türevi büyüme faktörü reseptörleri (PDGFR) ve diğer anjiyogenezis ile ilişkili proteinlerin tirozin kinazlarını inhibe eden tirozin kinaz inhibitörleridir (TKİ). Her iki ajan da yıllarda kullanılan interferon alfa'ya göre daha yüksek yanıt oranları ve daha uzun progresyonsuz sağ kalım ile ilişkilendirilirken birbiriyle karşılaştırıldığında ise eşit etkinlik saptanmıştır (3), (4), (5).

Maalesef, VEGFR-TKİ tedavisine belli bir süre sonra direnç gelişmektedir (6). Klinik çalışmalarda bu tedavilerle orta derece progresyonsuz sağ kalım 10 ayları geçmemektedir. VEGFR-TKİ tedavisine dirençte en olası mekanizma anjiyogenezis, invazyon ve proliferasyonda rol oynayan alternatif anjiyogenezis

yolakların aktive olmasıdır. Bu alternatif yollara hepatosit büyüme faktörü (MET), AXL reseptör tirozin kinaz (AXL) ve Fibroblast büyüme faktör reseptörü (FGFR) tirozin kinazlar sayılabilir (7),(8). Faz III çalışmalarda bu TKİ'ler ile %100'e yakın oranda yan etki görülürken bunların %71'inde derece üç-dört düzeyinde ciddi yan etkiler oluşturmaktadır. Yine aynı çalışmalarda yan etki nedeniyle ortalama %60 hastada doz azaltılırken %20 hastada tedavi kesilmek zorunda kalınmıştır. Tüm bu gelişmelerin sonunda günümüzde metastatik RCC hastalarında anjiyogenezi hedefleyen TKİ (sunitinib, pazoponib, cabozantinib vb.) ajanları, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi kuruluşlar tarafından kabul edilmiş olup rehberler tarafından hala standart tedavi seçenekleri arasında kabul edilmektedir.

2010'lu yılların başlarından itibaren birçok kanserde immün kontrol noktası inhibitörleri ile çalışmalar hız kazanmıştır. Devrim niteliğindeki bu gelişme immün kontrol noktası inhibitörünü bulan araştırmacılara 2018 nobel tıp ödülünü getirmiştir. Kanser hücreleri tarafından salgılanan programlı hücre ölüm ligandı-1 (PD-L1)'in, farklılaşma kümeleri-8 (CD8+) sitotoksik T lenfositleri üzerinde bulunan programlı hücre ölümü-1 (PD-1) reseptörüne bağlanması CD8+ sitotoksik T lenfositlerini inhibe etmektedir. Bu mekanizma kanserin immün sistemden kaçış mekanizmalarından birisi olarak bilinmektedir. Kanser CD8+ T lenfositler üzerindeki fren mekanizması immün kontrol noktası inhibitörleri ile ortadan kaldırılmakta ve sonuç olarak kanser hücreleri, lenfositler tarafından öldürülmektedir.

İmmün kontrol noktası inhibitörleri RCC'nin de içinde olduğu mutasyon yükü fazla olan kanserlerde standart tedavilere göre belirgin sağ kalım farkı oluşturmuştur. Özellikle 2018 yılında açıklanan Keynote 426, Javelin Renal 101 ve Immotion 151 isimli faz III çalışmalarla beraber immün kontrol noktası inhibitörlerinin anti-anjiyogenik TKİ'ler ile kombine kullanımı gündeme gelmiştir. Yapılan randomize kontrollü meta analiz çalışmaları ile sunitinib ile karşılaştırıldığında immün kontrol noktası inhibitörleri ile TKİ kombinasyonunun hastalarda ölüm riskini önemli ölçüde azalttığı kanıtlanmıştır (9)(10). Bununla birlikte kombine ilaç kullanımı beraberinde maliyet ve yan etki

gibi bazı dezavantajları beraberinde getirmektedir. Kombinasyon çalışmalarında derece üç-dört yan etkiler %70-75'lere kadar çıkmaktadır.

İmmün kontrol noktası inhibitörlerinin etkinliğini öngören en iyi çalışılmış belirteç PD-L1 ekspresyon düzeyidir. Ancak bu belirteç, RCC'nin de içinde bulunduğu bazı tümörlerde tedavi etkinliğini iyi derecede ifade etmediği anlaşılmıştır. Tümörlerde metastaz için gerekli olan anjiyogenezin aktive olmasıyla; hücre içi adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) gibi endotelial adezyon moleküllerinin aşağı regüle olduğu gösterilmiştir. Tümörlü dokuda endotelial adezyon moleküllerinin azalması, endotel lökosit interaksyonunu engellemekte ve sonuç olarak lenfositlerin tümör dokusuna infiltrasyonunu engellemektedir. Anjiyogenezin inhibe edilmesi lökositlerin dokuya infiltrasyonunu sağlamaktadır (11),(12). Bu mekanizma immünoterapi ile anti-anjiyogenez TKİ ilaçlarının kombine kullanıldığı faz III çalışmaların temelini oluşturmaktadır. FDA 10 Ağustos 2021'de RCC'li yetişkin hastaların birinci basamak tedavisi için lenvatinib, pembrolizumab kombinasyonunun kullanımını onaylamıştır.

Pembrolizumab ile lenvatinib alan hastaların medyan PFS'si 23,9 ay (%95 GA: 20,8, 27,7) ile karşılaştırıldığında sunitinib (HR 0,39; %95 GA: 0,32, 0,49; $p < 0,0001$). Objektif yanıt oranları %71 (%95 GA: 66, 76) ve %36 (%95 GA: 31, 41; $p < 0,0001$); tam yanıt oranları, kombinasyon ve sunitinib kollarında sırasıyla %16 ve %4 idi (9).

Yaklaşık 1000 yılı aşkın süredir doğal ürünler klinik çalışmalarda denenmiş olmamasına rağmen çok farklı hastalıkların tedavisinde folklorik olarak kullanılmaktadır. Bu doğal ürünlerden en iyi bilinenlerden ve ülkemizde çörek otu olarak bilinen *Nigella sativa* adlı bitki Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak yetişmektedir. Çalışmalar çörek otu tohumlarının biyolojik etkinliğinden majör biyoaktif komponenti (%30-48) olan Thymoquinone'dan (TQ) oluşan esansiyel yağ komponentinin sorumlu olduğunu açığa çıkarmıştır (13),(14). Klinik öncesi çalışmalar TQ maddesinin kanser, sepsis, ateroskleroz, diyabet ve inflamasyonu içeren birçok hastalıkta terapötik etkinliği ortaya koymuştur (15),(16).

TQ, VEGF ile indüklenen ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) aktivasyonunu inhibe ederek endotel hücrelerinin proliferatif aktivitesinde azalmaya ve tüp formasyonu oluşumunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (17). Genel olarak bu bulgular, TQ'nin, neovaskülarizasyonun proangiyogenik işaretlemeyen endotel hücre göçü ve tüp oluşumuna kadar gerekli tüm aşamalarını bozduğunu ortaya koymaktadır. Dirican ve ark. daha önce prostat kanseri hücre hatlarında TQ'nin hem tekli hem de zoledronik asit ve dosetaksel kemoterapötik ilaçları ile kombine kullanımının sitotoksik ve apoptotik etkisini olduğunu göstermiştir (18),(19). TQ'nin RCC üzerine etkili olduğu klinik öncesi çalışmalarda gösterilmiştir (20). TQ'nin RCC'de klinik öncesi modellerde anjiyogenezis ve tümör lenfosit infiltrasyonu üzerine etkileri ve ayrıca immünoterapi ile birlikte olası sinerjik etkileri çalışılmamıştır.

Çalışmalarda TQ'nin anti kanser ilaçların teröpatik etkilerinin artırılmasının yanında kemoterapinin normal doku üzerindeki olumsuz etkilerini azalttığı gösterilmiştir (21). Bununla birlikte TQ'nin immün kontrol noktası inhibitörlerinin normal dokular üzerindeki zararlı etkilerini önleyici etkisi olduğuna ilişkin literatür bilgisi bulunmamaktadır. Sonuç olarak RCC tedavisinde bugün için daha az toksik etkili yeni kombinasyonlara ihtiyaç bulunmaktadır.

Çalışmamızda anti kanser ve anti toksik etkileri bilinen TQ'nun, oluşturulan RCC modelinde *in vitro* ve *in vivo* modeller üzerinde immün kontrol noktası inhibitörü olan Nivolumab (NV) ile kombine kullanımın anjiyogenezis etkisini ve tümör infiltratör lenfositler üzerinden ise sinerjik, sitotoksik ve apoptotik etkilerini göstermeyi planladık. Ayrıca TQ'nin immün kontrol noktası inhibitörlerinin diğer organlar üzerindeki olası toksik etkilerini engelleyici özelliğini araştırmayı planladık.

1.2. Çalışmanın Amacı

Çalışmada öncelikli olarak RCC modelinde TQ ve NV'nin sitotoksik ve apoptotik etkisinin araştırılması planlanmıştır. İkincil olarak; *in vitro* bilgiler ışığında *in vivo* RCC modellerinde apoptotik etkinin olası mekanizmalarını

açıklamaktır. Ayrıca, kullanılan ajanların anti tümöral etkisinin yanı sıra organlar üzerinde toksik etkili olmadığını göstermek amaçlanmıştır.

1.3. Çalışmanın Hedefleri

Bu çalışmadaki hedefler RCC’de NV ve TQ kombinasyonun;

- 1- RCC hücre hatlarında TQ-NV’ın sinerjik sitotoksik ve apoptotik etkilerini incelemek.
- 2- Hücre hattı ile oluşturulacak olan BALB/C tümör modelinde TQ ve NV’nin tekli ve kombinasyon dozları uygulanarak ilaçlara verilen tümör yanıtlarının ortaya konulması.
- 3- Protein ve gen düzeyinde anti-tümör etkinliğin olası mekanizmaların aydınlatılması
- 4- Deney hayvanı modelinde mevcut ajan kombinasyonunun güvenilirliğini ortaya koymak
- 5- Ayrıca literatüre immünoterapi ile kullanılacak etkin ve daha güvenilir bir molekülü literatüre sunmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Renal Hücreli Kanserde Epidemiyoloji, Etiyoloji ve Olası Risk Faktörleri

Küresel olarak, RCC insidansı bölgeden bölgeye büyük farklılıklar göstermektedir (22); en yüksek oranlar Çek Cumhuriyeti ve Kuzey Amerika'da gözlenir (23). ABD'de her yıl RCC'den yaklaşık 80.000 yeni vaka ve yaklaşık 14.000 ölüm gerçekleşmektedir(24). Dünya çapında, böbrek kanseri nedeniyle yılda 400.000'den fazla yeni RCC vakası ve 170.000'den fazla ölüm kaydedilmektedir (25).

RCC, erkeklerde kadınlara göre yaklaşık iki kat daha yaygındır (24). RCC, ağırlıklı olarak yaşamın altıncı ila sekizinci 10 yılında ortaya çıkar ve medyan tanı yaşı 64 yaş civarındadır; 40 yaşın altındaki hastalarda olağandışıdır ve çocuklarda nadirdir (26),(27),(28). 2009 ile 2015 yıllarını kapsayan Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) Sürveyans, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar (SEER) kayıtlarından elde edilen verilerde böbreğe lokalize hastalığın %65, loko-rejyonel hastalığın %17, metastatik hastalığın %16, evresi belirlenmemiş hastalığın ise %3 olduğu bildirilmiştir (29).

Böbrek kanserli hastaların beş yıllık sağ kalım oranı, 1954'te %34'ten 1996'da %62'ye ve 2009'dan 2015'e %75'e çıkarak son 60 yılda ikiye katlanmıştır (29),(30),(31),(32). RCC insidansı ölüm oranından üç kat daha fazla artmıştır (1). Bu iyileştirilmiş sağkalım ve vaka-ölüm oranı, çoğunlukla bu tümörlerin daha küçük boyutlarda (<4 cm) erken saptanması ve küratif cerrahi tedaviden kaynaklanmaktadır (31).

Bir çok kanserde olduğu gibi sigara, hipertansiyon ve obezite RCC risk faktörleri arasında yer almaktadır (33),(34),(35),(36). RCC gelişiminde en önemli risk faktörü olarak edinilmiş böbreğin kistik hastalığı ve kronik böbrek hastalığı yer almaktadır. Böbreğin edinilmiş polikistik hastalığı olan ve diyalize giren hastalarda RCC gelişme riskinin genel popülasyona göre 30 kata kadar daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (37). Kronik diyaliz hastaları arasında edinilmiş kistik hastalık insidansı yaklaşık %35 ila 50'dir ve bu hastaların yaklaşık %6'sında RCC geliştiği bildirilmiştir (38). RCC riski ile ilişkili

tanımlanmış diğer risk faktörleri arasında kadmiyum, asbest ve petrol yan ürünleri gibi toksik bileşiklere mesleki maruziyet, kronik analjezik kötüye kullanımı, genetik faktörler, kronik hepatit C enfeksiyonları, alkol kullanımı, böbrek taşları ve diyabet sayılabilir (39-44).

2.2. Renal Hücreli Kanserin Patolojik Sınıflandırması

Önceden, RCC'ler hücre tipi ve büyüme şekline göre sınıflandırılırdı (45). Bu sınıflandırma, farklı adenokarsinom türlerinin morfolojisini, büyüme modelini, köken aldığı hücrelerini, histokimyasal ve moleküler temelini daha doğru yansıtmak için değiştirilmiştir (46),(47),(48). RCC'nin birkaç farklı alt tipi tanımlanmıştır:

Bu alt tipler arasında; Berrak hücreli (tümörlerin % 75-85'i), Papiller (kromofilik; %10-15), Kromofob (%5-10), Onkositik (% 3-7), Toplayıcı kanal (Bellini kanalı; çok nadir), Translokasyon renal hücreli karsinom (nadir) yer almaktadır. RCC'lerin %5 kadarı sınıflandırılmamış olarak kabul edilir ve bu tümörlerin berrak hücreli kanserlere kıyasla daha kötü bir prognoza sahiptir (49), (50).

Sarkomatoid özelliklere sahip tümörler, RCC'nin herhangi bir histolojik alt tipinde sarkomatoid farklılaşması görülebildiğinden ayrı bir alt tip olarak kabul edilmez.

2.3. Renal Hücreli Kansere Evreleme

RCC evrelemesinde Amerikan Ortak Kansere Komitesi (AJCC) evreleme sistemi olan tümör-nod-metastaz (TNM) sınıflaması kullanılmaktadır (49). AJCC 2017 evreleme sisteminin güncel 8. versiyonu Tablo 1'de verilmiştir. Bu sistemde böbreğe sınırlı tümörler büyüklüklerine göre T1 veya T2 olarak sınıflandırılır. T3 tümörler renal ven veya perinefrik dokulara uzanıp, ancak Gerota fasyasının ötesine geçmez, T4 tümörler ise ipsilateral adrenal beze doğrudan yayılım dahil olmak üzere Gerota fasyasının ötesine uzanmaktadır. Nodal ve uzak metastazlar basitçe yok veya var olarak sınıflandırılır.

Tablo 1. AJCC evreleme sistemine göre (8. versiyon 2017) RCC’de TNM sınıflaması

<p>T: Primer Tümör</p> <p>Tx: Değerlendirilemeyen primer tümör</p> <p>T0: Primer tümör bulgusu yok</p> <p>T1: Tümör en büyük boyutu ≤ 7 cm, böbrekle sınırlı</p> <p> T1a: Tümör en büyük boyutu ≤ 4 cm, böbrekle sınırlı</p> <p> T1b: Tümör >4 cm ama en büyük boyutu ≤ 7 cm, böbrekle sınırlı</p> <p>T2: Tümör >7 cm en büyük boyutta, böbrekle sınırlı</p> <p> T2a: Tümör >7 cm ama en büyük boyutu ≤ 10 cm, böbrekle sınırlı</p> <p> T2b: Tümör >10 cm, böbrekle sınırlı</p> <p>T3: Tümör majör venlere veya perinefrik dokulara uzanıyor, ancak ipsilateral adrenal beze ve Gerota fasyasını aşmamaktadır</p> <p> T3a: Tümör renal vene veya onun segmental dallarına yayılıyor veya pelvikalisijel sistemi invaze ediyor veya perirenal ve/veya renal sinüs yağını invaze ediyor ama Gerota fasyasının ötesine geçmiyor</p>
<p>N: Bölgesel Lenf Nodları</p> <p>Nx: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez</p> <p>N0: Bölgesel lenf nodu metastazı yok</p> <p>N1: Bölgesel lenf düğümlerinde metastaz</p>
<p>M: Uzak Metastaz</p> <p>M0: Uzak metastaz yok</p> <p>M1: Uzak metastaz</p>

2.4. Renal hücreli karsinom tedavisi

RCC’li bir hastaya ilk yaklaşımda, hastalığın yaygınlığının yanı sıra hastanın yaşı ve ko-morbiditesi dikkate alınmalıdır. Tüm tümörlerde olduğu gibi öncelikle hastalık açısından lokalize hastalık (evre I, II ve III) veya ileri evre hastalık ayrımı yapılmalıdır.

2.4.1. Lokalize Böbrek Hücre Karsinomu Tedavisi

Metastazı olmayan RCC’li hastaların çoğunda cerrahi tedavi küratiftir. Bu nedenle evre I, II ve III hastalığı olan hastalar için cerrahi tercih edilen tedavidir. Cerrahi tedavide radikal nefrektomi gerektirebilir, ancak uygun şekilde seçilmiş

hastalarda renal parankimi korumak için parsiyel nefrektomi tercih edilir. Cerrahi prosedürün seçimi, hastalığın yaygınlığına ve ayrıca yaş ve ko-morbidite gibi hastaya özgü faktörlere bağlıdır. Cerrahi, geleneksel bir yaklaşımla veya laparoskopi gibi minimal invaziv bir yaklaşımla gerçekleştirilebilir. Cerrahi olarak çıkartılabilir bir primer tümör ve eş zamanlı tek metastaz ile başvuran dikkatli seçilmiş hastalarda, metastazın cerrahi rezeksiyonu, radikal nefrektomi ile küratif olabilir.

Diğer ablatif prosedürler (örneğin, kriyoterapi, radyofrekans ablasyon), cerrahi aday olmayan nispeten küçük böbrek kitleleri olan hastalar için önemli bir alternatif olabilir.

2.4.2. Adjuvant Tedavi

Günümüze kadar RCC'nin adjuvant tedavisi için TKİ'ler yeterli başarıyı sağlayamamıştır. Sunitinib ile yapılan çalışmalarda genel sağ kalım avantajı sağlanmazken hastaliksız geçen sürede ılımlı iyileşme görülmüştür. Beraberinde getirdiği toksisite ve maliyet düşünüldüğünde tedavi rehberlerinde ön planda önerilmemektedir.

Bununla birlikte KEYNOTE-564 faz III çalışmasında orta-yüksek veya yüksek hastalık nüksü riski için patolojik kriterleri karşılayan hastalar için, bir yıl adjuvan pembrolizumab kullanımı hastaliksız sağ kalım avantajı sağlamıştır (51). Bu verilere dayanarak FDA, nefrektomiye takiben orta-yüksek veya yüksek rekürrens riski olan veya nefrektomi ve metastatik lezyonların rezeksiyonu sonrasında RCC'li hastaların adjuvan tedavisi için pembrolizumab için onay vermiştir (52).

2.4.3. İleri Evre Böbrek Hücre Karsinomu Tedavisi

Evre I ila III RCC'de cerrahi rezeksiyon her ne kadar küratif bir yaklaşım olsa da hastaların üçte biri nüks etmektedir. Ek olarak, RCC'li hastaların yaklaşık yüzde 15'i, cerrahinin küratif olmadığı lokal olarak ilerlemiş veya metastatik RCC ile başvurur. İlerlemiş veya metastatik RCC'li hastalarda hastalığın doğal seyri, hastalığın klinik, patolojik, laboratuvar ve radyografik özelliklerine bağlı olarak birkaç aydan birkaç yıla kadar değişebilir.

PD-1 yolağını ve/veya sitotoksik T lenfosit ile ilişkili antijen 4'ü (CTLA-4) hedefleyen kontrol noktası inhibisyonu, berrak hücre dahil birçok malignitelerin tedavisinde önemli bir rol almıştır. Anti PD-1 antikoru NV ve anti CTLA-4 antikoru ipilimumab'ın kombinasyonu, orta ve düşük riskli hastaların tedavisinde yer almaktadır (53),(54). Tek ajan olarak NV ayrıca, birinci basamak anti anjiyogenik tedaviden sonra progresyon gösteren hastalarda genel sağkalım (OS) yararı göstermiştir (55),(56). Kombine immünoterapiye ilave olarak anti anjiyogenik tedaviler, ileri veya metastatik RCC'li hastalarda immünoterapi kombinasyonları gibi kabul görmüş tedavilerdir. OS yararı ile bu tür kombinasyonların örnekleri arasında pembrolizumab artı axitinib, cabozantinib artı NV ve lenvatinib artı pembrolizumab bulunmaktadır.

Mevcut başka bir kombinasyon olarak avelumab artı axitinib de mevcuttur. NV artı ipilimumab gibi kombinasyonlara kıyasla anti-VEGF/immünoterapi kombinasyonlarının rolünü tanımlamak için randomize çalışmalardan elde edilen olgun sonuçlara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, sonuçların, az ya da çok yarar sağlama veya ciddi toksisite yaşama olasılığı olan belirli hasta alt grupları olup olmadığını analiz edilmesi gerekmektedir. Kombinasyon tedavisi ile ilgili çözülmesi gereken önemli konular arasında, bu tür denemelerle gözlemlenen herhangi bir iyileştirilmiş etkinliğin sinerjistik mi yoksa basitçe katkı maddesi mi olduğu ve bu ajanların sıralı kullanımıyla benzer sonuçlara ulaşılabileceği yer almaktadır. Kombinasyon tedavilerinde önemli ek konular ise, farklı kombinasyon rejimleri ile ilişkili nispi etkinlik ve toksisiteyi ve birden fazla ajanın aynı anda kullanılmasından kaynaklanan ilaç maliyetlerindeki artışı içerir.

2.5. Renal Hücreli Kanser Tedavisinde Prognozun Önemi

İlerlemiş hastalığı olan hastalar için tedavi seçimi, tarihsel olarak cephe hattı vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR)- TKİ'ler çağında geliştirilen prognostik risk faktörlerine dayanmaktadır. Uluslararası Metastatik Böbrek Hücreli Karsinom Veritabanı Konsorsiyumu (IMDC) prognostik modeli altı olumsuz faktörü içermektedir (57).

Bu risk faktörleri;

- Karnofsky performans durumu (KPS) <yüzde 80

- Tanıdan tedaviye kadar geçen süre <1 yıl
- Hemoglobin konsantrasyonu normalin alt sınırından daha düşük
- Serum kalsiyumu normalin üst sınırından fazla
- Nötrofil sayısı normalin üst sınırından fazla
- Platelet sayısı normalin üst sınırından fazla

Bu risk faktörlerinden hiçbirine sahip olmayan hastalar olumlu risk, bir veya ikisine sahip olanlar orta riskli ve üç veya daha fazlasına sahip olanlar kötü risk olarak kabul edilir. Klinik araştırmalarda NV artı ipilimumab kombinasyonu orta ve kötü risk faktörlerde iyi bir etkinlik gösterirken iyi risk faktörlü hastalarda VEGF TKİ olan sunitinib den verileri daha kötü çıkmıştır. Diğer immünoterapi artı VEGF TKİ kombinasyonları tüm risk faktörlü hastalarda etkin bulunmuştur. Bununla birlikte iyi risk faktörlü hastalarda tek ajan VEGF TKİ tedavisinde etkin olduğunu gösterir veriler bulunmaktadır. Bu nedenle IMDC prognostik kriterlerinin kombinasyon tedavileri belirlemede immünoterapi çağındaki önemi henüz tam olarak belirlenmemiştir. Alternatif immünoterapiye dayalı prognostik kriterlerin yokluğunda, bu kriterler hastaları risk sınıflandırmak için klinik çalışmalarda ve klinik kılavuzlar tarafından tedaviyi yönlendirmek için kullanılmaya devam etmektedir (58).

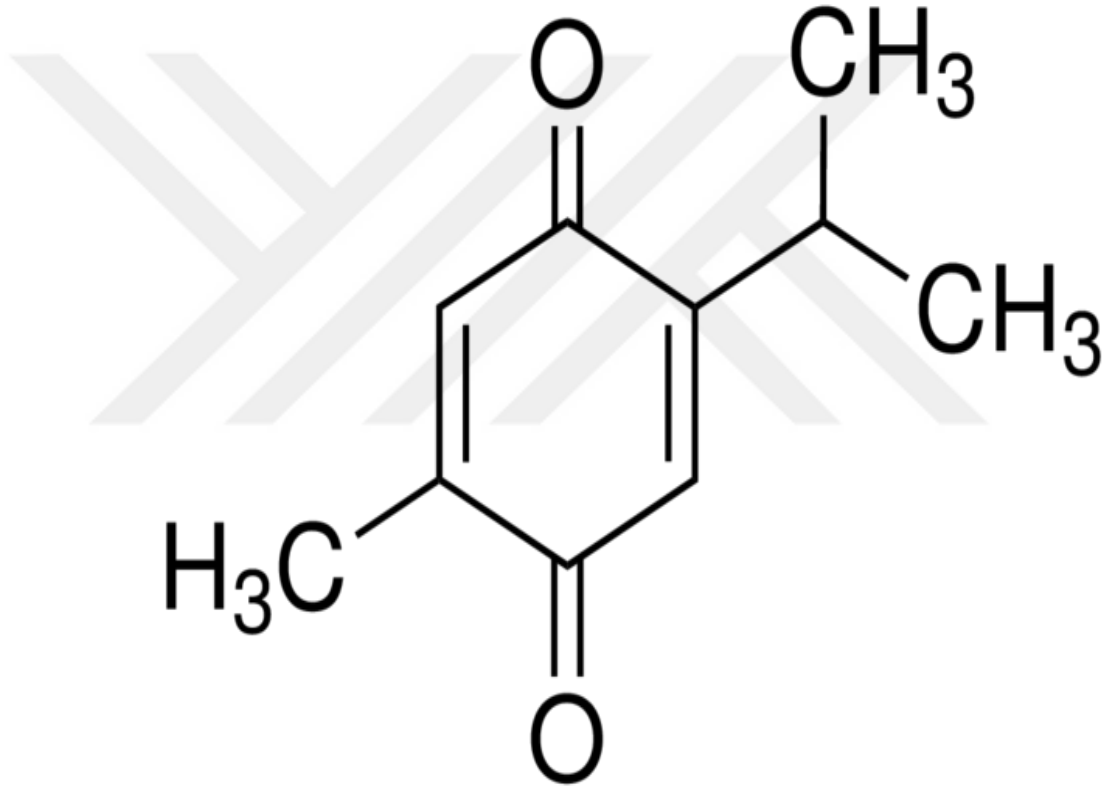
2.6 Thymoquinone

Yaklaşık 1000 yılı geçkin süredir doğal ürünler bilimsel dayanağı olmamasına rağmen çok farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Bu doğal ürünlerden en iyi bilinenlerden olan ve ülkemizde çörek otu olarak bilinen *Nigella sativa* adlı bitki Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak yetişmektedir (şekil 1).

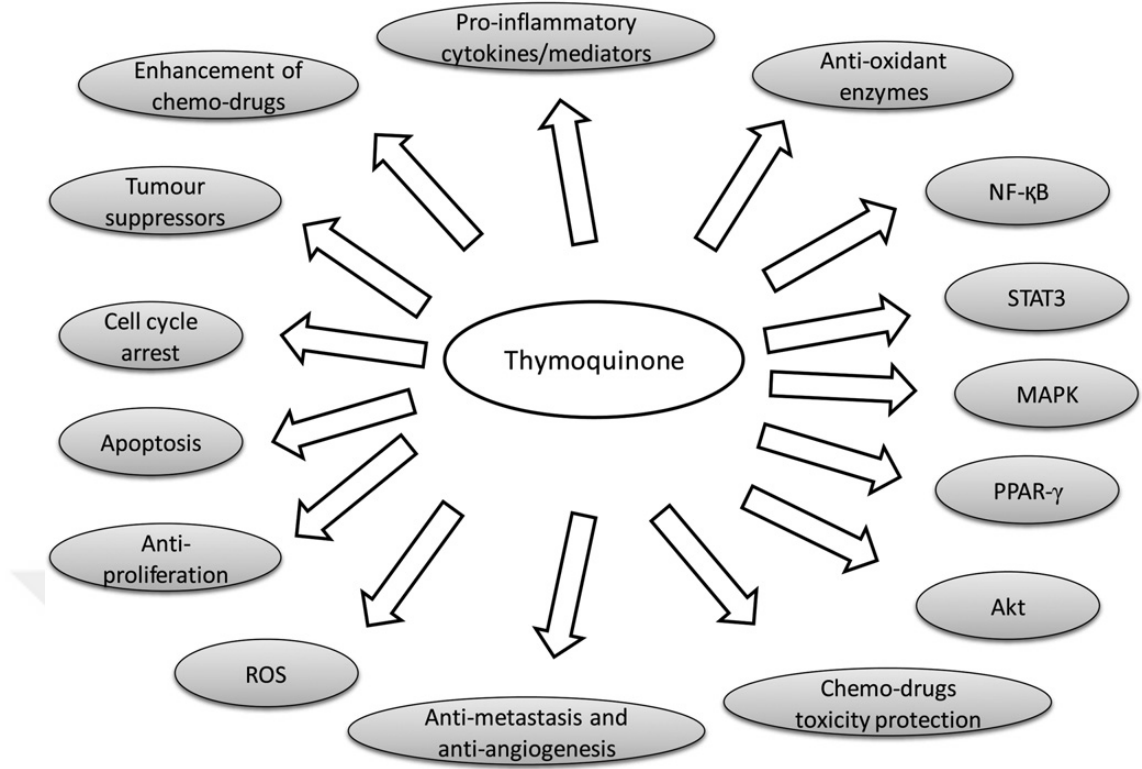


şekil 1. *Nigella Sativa* Bitkisi

Çalışmalar çörek otu tohumlarının biyolojik etkinliğinden pre-dominant (yüzde 30-48) TQ'den oluşan esansiyel yağ komponentinin sorumlu olduğunu açığa çıkarmıştır (13),(14). TQ ekstraksiyon ile elde edildikten sonra (59) bu bileşiğin kanser, sepsis, ateroskleroz, diyabet ve inflamasyonu içeren bir çok hastalıkta terapötik etkinliği çalışılmıştır. Bu çalışmalar TQ'nin bir çok farklı etkilerini ortaya koymuştur (Şekil 3)(60). Bununla birlikte kansere karşı etkinliği için yeterli kesin kanıt bulunmamaktadır.



Şekil 2. TQ'nin kimyasal yapısı



Şekil 3. TQ'nin kanser ve inflamatuvar hastalıklardaki etki mekanizmaları

2.6.1 Thymoquinone anti kanser etkileri

Bu bileşiğin en temel olarak açıklanan bazı anti kanser etkileri bulunmaktadır. Bunlar;

- Anti proliferatif etkileri
- Kanser hücrelerinde hücre siklusu üzerine etkileri
- Pro-apoptotik etkileri
- Reaktif oksijen türevleri (ROS) üzerinden etkileri
- Kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonunda sitotoksik etkilerinin artırılması
- *In vivo* kemopreventif ve kemoterapötik etkinlikleri
- Metastaz ve anjiyogenezis üzerine etkileri
- Mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) ve diğer potansiyel yollar üzerine etkileri
- **Anti proliferatif etkileri:** Bu bileşiğin glioma/glioblastoma, meme kanseri, lösemi, akciğer kanseri, kolorektal kanser, pankreatik kanser, osteosarkoma, prostat kanserini içeren bir çok farklı kanserin büyümesini inhibe ettiği

gösterilmiştir (60), (61), (62),(63), (64) . Ayrıca bu bileşiğin kanserli olmayan hücreler üzerine ise çok az bir etkisi olduğu gösterilmiştir (60), (63),(65).

- **Kanser hücrelerinde hücre siklusu üzerine etkileri:** Hücre siklusunun G0/G1 fazını, G1 den S fazına geçişi, G2/M fazını durdurucu etkileri birçok kanserde gösterilmiştir. Bu etkileri siklin D1'de azalma, p16 ekspresyonun artışı, p53 regülasyonu, siklinin bağımlı kinaz-4 (Cdk-4), siklin bağımlı kinaz-2 Cdk-2 ve siklin A aracılığı ile gerçekleştiği çalışmalarda gösterilmiştir (64), (66), (67).
- **Pro-apoptotik etkileri:** Kemoteröpatik ilaçların apoptosizi indüklemesi kanser tedavisindeki etkinliğin belirlenmesinde önemli bir faktördür (65). TQ'nun apoptozisi, p53 bağımlı ve p53 bağımsız yoldan indüklediği gösterilmiştir. HCT116 insan kolorektal kanser hücrelerinde Bcl-2 inhibisyonu ile birlikte p53 ve p21 up-regüle olduğu bulunmuştur (64). Benzer şekilde birçok kanserde benzer pro-apoptotik etkiler gösterilmiştir.
- **Reaktif oksijen türevleri (ROS) üzerinden etkileri:** En son çalışmalarda TQ'nun ROS üretimi ile apoptosizi indüklediği gösterilmiştir. ROS üretimi Akt Kinaz (AKT) aktivasyonunun inhibisyonuna neden olarak apoptosizi inhibe etmektedir (68).
- **Kemoterapötik ilaçlarla kombinasyonunda sitotoksik etkileri artırabilir:** Kemoterapötik ilaçlarla kombine edildiği zaman sitotoksik etkileri artırmaktadır. NCI-H460 küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hatlarında sisplatin ile kombine edildiğinde anti tümör etkiler artığı saptanmıştır (62). Aynı şekilde multipl myelomda talidomid ve bortezomib etkilerini artırmıştır(69). KBM-5 hücrelerinde doksorubusin veya paklitaxel ile kombine edildiğinde apoptosizi artırmaktadır (70).
- ***In vivo* kemopreventif ve kemoterapötik etkinlikleri:** TQ'nun anti-tümör aktivitesi farklı dozlarda fare ksenograft tümör modellerinde araştırılmıştır. HCT-116 hücresi ile oluşturulan ksenograft fare modelinde apoptosizi indükleyerek tümör büyümesini geciktirdiği gösterilmiştir. HPAC hücre hattı ile oluşturulan ortotropik fare modelinde TQ'nun, gemsitabin veya oksaliplatin ile kombinasyonunda tümör dokusunda B hücreli lenfoma-

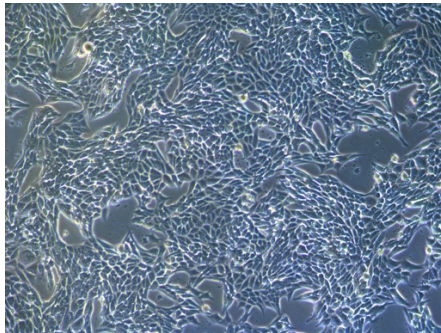
ekstra büyük (Bcl-Xl), survivin ve X bağılı apoptoz inhibitörü (XIAP) proteinlerinin aşağı regülasyonunu sağladığı ve Kaspaz-3 aktivitesini artırdığı, ayrıca nodal metastaz ve lokal invazyonun azaldığı gösterilmiştir (71).

- **Metastaz ve angiyojenesis üzerine etkileri:** PC-3 prostat kanseri hücre hattı ile oluşturulan modellerde tümör içinde anjiyojenizi inhibe ettiği gösterilmiştir (72). Aynı çalışmada TQ'nun insan umbilikal vendeki endotelial hücre migrasyonu, invazyon ve tüp formasyon oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (72). Benzer çalışmalarda farklı kanserlerde de anjiyojenizi ve invazyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (73),(62),(74),(75). Bu etkilerinin moleküler mekanizmaların açıklanması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.
- **Mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) ve diğer potansiyel yollar üzerine etkileri:** El-Najjar ve ark. TQ maddesinin Jun N-terminal kinaz (JNK) ve ERK yollarında, ilgili proteinlerin fosforilasyonu artırarak aktive edip, apoptoz ve oksidatif stresi artırdığını göstermiştir (63). Başka bir çalışmada ise TQ ile tedavi edilen FG/COLO357 hücre hatlarında Mucin-4'ü aşağı regüle ederek JNK ve p38 MAPK yolağını aktive ettiği gösterilmiştir (73). TQ'nun anti kanser etkileri ve MAPK rolü hakkında yeterli çalışma bulunmamaktadır ve ileri çalışmaların yapılmasını gerektirmektedir. Ek olarak, TQ'nun peroksizom proliferatör-aktifleyen reseptör (PPARs) aktivitesini indüklediği bulunmuştur. Bu reseptörün alt grubu olan PPAR-g ise, bazı çalışmalarda anti kanser mekanizmalarda anahtar roledir. Yine TQ'nun, MCF-7 meme kanseri hücrelerinde bu reseptörü indüklediği gösterilmiştir(74). TQ'nun epigenetik integratörü olan ubikutin benzeri yüzük parmak-1 (UHRF1)'in yeniden ekspresyonu, siklik nükleotid fosfodiesteraz (PDE1A)'nın aşağı regülasyonu, 20S proteozom inhibisyonu , p53 ve Bcl-2 ilişkili x proteini (Bax) akümüülasyonu diğer anti kanser etkileridir (75),(76),(77).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

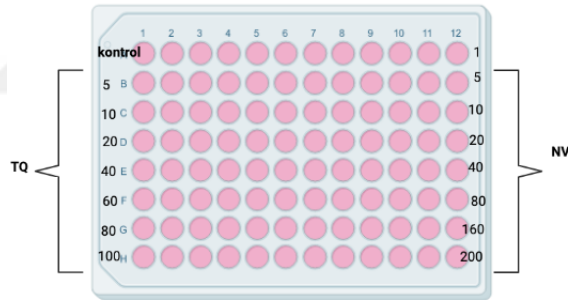
RCC hücre hattı olan Renca hücresi, sekonder bir hücre hattı olup -80°C’de muhafaza edildi. Renca hücresini kültüre etmek için Roswell Park Memorial Institute 1640 ortamı (RPMI 1640) (Cat No: E0500-360, Cegrogen) kullanıldı. Ortamın içerisine yüzde 20 Fetal Bovin Serum (FBS) (Cat No: FBS-ES-12A, Capricorn), yüzde1 L-glutamin 200mM (Cat No: K0100-670, Cegrogen) ve yüzde1 Penisilin/Streptomisin 100x (Cat No:PS-B, Capricorn) eklenerek komplet ortam haline getirildi. -80°C’den çıkartılan hücre hızla çözdürüldü ve temiz, steril 25 cm²’lik flaska 5 mL komplet RPMI 1640 eklenerek, flaska hücre ekildi. Ardından yüzde 5 CO₂’li 37°C inkübatör içerisinde inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün, flaskın yüzeyine tutunma gösteren hücrelerin olup olmadığı ışık mikroskopunda kontrol edildi. Tutunan hücrelerin konfluensi oranı yüzde 70-80’e geldiğinde hücreler pasajlandı. Bunun için 25 cm²’lik flaskta tutunan hücrelerin ortamı tamamen uzaklaştırıldı ve üzerine 2 mL Tripsin/EDTA yüzde 0,05 (Cat No: TRY-1B, Capricorn) eklendi ve yüzde 5 CO₂’li 37°C inkübatöre kaldırılıp beş dakika bekletildi. Bekleme süresinin ardından Tripsin/EDTA ile kaldırılan hücreler, temiz ve steril 15 mL’lik falkonda toplandı ve 1500 rpm’de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Ardından süpernatant uzaklaştırıldı ve dipte kalan pellet 1 mL ortam ile sulandırıldıktan sonra thoma lamı yardımı ile sayım yapıldı. 2.1 x 10⁶ hücre olacak şekilde 75 cm²’lik flasklara ekim yapıldı. Pasajlama işlemine, iki günde bir hücrelerin yoğunluğu kontrol edilerek devam edildi. Ayrıca hücreler, daha sonraki adımlarda kullanılmak üzere dimetilsülfoksit (DMSO) ile dondurularak -80°C’de stoklandı.



Şekil 4. Konfluent olan Renca hücresi

3.2 MTT Canlılık Analizleri

Canlılık testlerini gerçekleştirmek için (3-(4,5-dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) (MTT) (Cat No: A2231, Panreac AppliChem) reaktifi kullanıldı. 96 kuyucuklu plaklara, her bir kuyuda 10^4 hücre olacak şekilde 200 μ L ve 6 tekrarlı Renca hücresi ekildi ve yüzde5 CO₂'li 37°C inkübatörde inkübe edildi. Ertesi gün, TQ ve NV'nin farklı konsantrasyonlarda dozları hazırlandı. TQ için dozlar 5 μ m, 10 μ m, 20 μ m, 40 μ m, 60 μ m, 80 μ m ve 100 μ m'dır. NV için dozlar 1 μ m, 5 μ m, 10 μ m, 20 μ m, 40 μ m, 80 μ m, 160 μ m ve 200 μ m'dır. Her bir doz, kuyu başına 100 μ L olacak şekilde, yüzde 1 FBS içeren RPMI 160 ortamında seyreltilerek taze hazırlandı. Konfluent olan hücrelerin üzerindeki kültür ortamları çekilerek uzaklaştırıldı. Daha sonra hücrelerin üzerlerine TQ ve NV dozları eklendi. Kontrol olarak belirlenen kuyulara yüzde 1 FBS içeren RPMI 1640 ortamı verildi. 24, 48 ve 72 saat ajan denemeleri için ayrı ayrı 96 kuyucuklu plaklar ile çalışıldı.



Şekil 5. MTT Testi

(TQ ve NV'nin farklı doz konsantrasyonları ile gerçekleştirildi.)

24, 48 ve 72. saatlerin sonunda hücrelerin üzerine 10 μ L MTT ajanı eklendi. MTT eklenen plaklar yüzde5 CO₂'li 37°C inkübatör içerisine konuldu ve dört saat bekletildi. Bekleme süresinin sonunda, kuyulardan 50 μ L ortam uzaklaştırılıp, 50 μ L DMSO eklendi ve formazan kristallerinin çökmesi için plaklar tekrar yüzde5 CO₂'li 37°C inkübatöre konuldu. 15 dakika bekletildikten sonra ELISA plak okuyucuda (Thermo, Multiskan, 51119000) 570 nm dalga

boyunda okumalar gerçekleştirildi ve absorbans değerleri alındı. Elde edilen absorbanslardan örneklerin canlılığı, kontrole oranlanarak verildi.

3.3. Deney Hayvanı Çalışmaları

Caki-1 hücreleri McCoy ortamında kültüre edildikten sonra 37°C yüzde 5 CO2 inkübatörde üretildi. 2 adet çıplak fare ve C57/BL6 siyah fareye subkutan sağ yan tarafa insülin enjektörü ile 0.3 mL inkomplet ortam içinde, sol yan tarafa 0.3 mL matrijel içinde 10^6 hücre enjekte edildi. Tümör gelişimi haftada 5 gün takip edildi. Bir ayda tümör oluşmayınca aynı enjeksiyonlar 5×10^6 hücre ile tekrarlandı. Bir ay sonra yine tümör oluşmayınca üçüncü tekrar olarak 10^7 hücre verildi. Üçüncü ay sonunda tümör oluşmayınca hücre hattı değiştirilmesine karar verildi ve *in vitro* çalışmalarda kullanılan fare kökenli Renca hücre hattı temin edildi.

Ön denemede ikinci enjeksiyonda 45 gün içinde çıplak farede tümör gelişimi görüldü. Yapılan literatür güncellemesi ile TQ'nun NV ile sinerjistik etkisini daha net gösterebilmek amacıyla C57/BL6 siyah farelerde tümör denenmesine karar verildi. Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'na fare tür değişikliği bilgisi verilip onay alındı.

C57/BL6 siyah farelerde subkutan matrijel içinde ikinci enjeksiyonda iki ayda tümör ön denemede oluştu. 28 adet 4 gruba randomize edilmek üzere C57/BL6 siyah fare kullanıldı. Fareler 4'er tane kafese konuldu. Serbestçe yem ve suya ulaşmaları sağlandı. Fareler çalışma süresince oda ısısında ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) ve 12'şer saatlik aydınlık / karanlık ortamında tutuldu. Bir hafta ortam adaptasyonları sonrası yüzde 20 FBS içeren komplet RPMI içinde üretilen Renca hücreleri 10^7 adet 0.3mL matrijel içinde subkutan sol sırt yana enjekte edildi. Tümör gelişmeyenlere bir ay sonra enjeksiyon tekrarlandı. Ortalama üçüncü enjeksiyonda tümör gelişimi görüldü. Kumpas ile ölçümlerde 9 mm çapa ulaşan tümörlü fareler, 4 gruptan birine randomize edilerek kimyasallar tek tek ya da kombine olarak ya da kontrol grubu için serum fizyolojik (SF) 0.1 mL hacim içinde intraperitoneal (IP) enjekte edilmiştir.

- **İn-Vivo Hayvan Grupları ve Ajan Uygulamaları:**

Tablo 2. Deney Hayvanı Grupları

Kontrol Grubu (n=7)	SF uygulanan kontrol grubu. IP; 1.,4.,6.,7.,10.,11.,13. günler
TQ Grubu (n=7)	TQ 20 mg/kg IP; 1., 4., 7., 11. günler
NV Grubu (n=7)	NV 30mg/kg IP; 1.,6.,10.,13. günler
TQ+NV Kombinasyon Grubu	TQ (20mg/kg) ve NV (30mg/kg) IP; 1.,6.,10.,13. günler

NV (Bristol-Myers Squibb; 100mg/10 ml injeksiyonluk flakon): Likid formu 30 mg/kg olacak şekilde kanser oluşan farelerde *in vivo* ortam koşullarında implantasyon sonrası 1., 6.,10.,13. günlerde IP uygulandı. Bu doz daha önceki EMA Nisan 2015 raporunda NV için fare modellerinde etkin kullanılan doz olarak belirlenmiştir (78).

Üç günde bir tümör volümleri ölçüldü. İlk ilaç uygulamasının 30. gününde sakrifikasyon işlemi uygulandı. Sakrifikasyon esnasında farelerden kardiyak kan alındı.

TQ (Sigma Cat No. 274666, 5 gram) toz halinde DMSO'da (3,5 gram 2 mL DMSO'da) çözülerek daha sonra SF ile seyreltildi. DMSO miktarının yüzde 0,01'in altında olacak şekilde hayvanlara IP olarak uygulandı.

Sakrifikasyon sırasında örnekler, ileri analizler için stoklandı. Taze tümör dokusundan tek hücre süspansiyonu yapıp akış sitometri ile Annexin V (FITC işaretli) +PI (PE okuma) ile canlı hücre apoptoz (erken geç) ve nekroz oranlarını belirlemek amacıyla stoklandı. Tümör dokularından ribonükleik asit (RNA) izolasyonu ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) çalışmalarını gerçekleştirmek amacıyla yedek dokular alındı ve hızla yüzde bir antibiyotik içeren RPMI 1640 dondurma ortamına konulup -80 °C'de stoklandı. Histopatolojik analizler için tümörün bir kısmı kasetlenerek formolde saklandı.

3.4 Histopatolojik İncelemeler

Fare dokularının çıkarılmasını takiben dokular kaset içerisinde yüzde 10 formole alınıp fikse edildi. Uygulanan fiksasyon süresi en az 24 saat olmak üzere, dokular formol içerisinde en az bir gece bekletildi. Dokuların tespitinden sonra doku takibine başlandı. Doku takibi otomatik sistem doku takip cihazında (RVG-1, Intelsit) gerçekleştirildi. Doku takip prosedürü aşağıdaki gibidir (Tablo 3).

Tablo 3. Uygulanan doku takip prosedürü

ADIM	SOLVENT	SICAKLIK
01	%70 Alkol	0
02	%90 Alkol	0
03	%96 Alkol I	0
04	%96 Alkol II	0
05	%100 Alkol I	0
06	%100 Alkol II	0
07	%100 Alkol III	0
08	Ksilen I	35
09	Ksilen II	40
10	Ksilen III	45
11	Parafin I	60
12	Parafin II	60
13	Parafin III	60
14	Bloklama	60

3.4.1 Parafin Bloklama ve Kesit Alma

Doku takibinden çıkarılan dokular, 60°C'de erimiş sıcak parafine gömüldü (KSA,2015). Sıcak parafin bloklar, hızlıca soğuması için soğuk tablaya (KSA 2001) konuldu ve parafin donduruldu. Daha sonra, her bir bloktan lizinlenmiş lamlara kesitler alındı. Doku kesitleri, Leica mikrotom cihazında (RM2125) beş

mikron inceliğinde kesildi. Daha sonra lamalar en az bir gece kuru etüvde 60°C’de bekletildi.

3.4.2 Hematoksilen & Eozin Boyama

Hematoksilen-eozin boyanacak olan lamalar, öncelikle lam sepetine yerleştirildi ve 30 dakika ksilolde bekletildi. Ksilol sonrasında, dokuların kurummasına da izin vermeden tüm ksilol uçuruldu. Lamalar daha sonra yüzde 100 etil alkol içerisinde beş dakika bekletildi. Daha sonra yüzde 80 etil alkole alındı ve beş dakika bekletildi. Alkol serisinin en sonunda yüzde 60 ve yüzde 40 alkol serilerinde sırayla beş dakika daha bekletildi. Daha sonra distile su ile yıkama yapıldı ve lamalar Hematoksilen (Tek-Path,160146) içerisinde alındı ve iki dakika bekletildi. Sürenin sonunda lamalar iki kez ve ikişer dakika çeşme suyu ile yıkandı. Daha sonra lamalar Eozin Y yüzde 1 (Tek-Path,12647) içerisinde alındı ve bir dakika kadar boya içerisinde bekletildi. İki kez ikişer dakika çeşme suyu yıkaması ardından, iki dakika distile su içerisinde alındı ve yıkama işlemi tamamlandı. Artan alkol serisi (yüzde 40, yüzde 60, yüzde 80, yüzde 100) uygulandıktan sonra tüm lamalar şeffaflama ksilölü içerisinde alındı ve 30 dakika bekletildi. Ksilölün uçurulması beklenmeden lamalar entellan ile üzerine lamel kapatılarak mikroskopi için hazır hale getirildi.

3.4.3 İmmünohistokimyasal Boyamalar

Kesit alınan lamalar, immünohistokimyasal boyama (IHK) için ön hazırlığa tabi tutuldu. Bunun için;

- Tüm lamaların yüzeyine metanol damlatıldı ve 10 dakika bekletildi.
- Kuruduktan sonra yüzde 10 formolde 10 dakika bekletildi.
- Distile suda beş dakika yıkandı.

Lamalar daha sonra, yüzde 3 H₂O₂ içerisinde 10 dakika bekletildi. Distile su ile beş dakika, PBS ile üç dakika yıkandıktan sonra bir damla inhibitör blokan damlatıldı ve beş dakika bekletildi. Lamalara boyanacak olan primer antikolar (CD20 (SantaCruz, sc-393894), CD4 (Bioss, Bs-0647R), CD8 (Bioss, Bs-0648R), CD68 (SantaCruz sc-17832), VEGFR1 (Abcam, ab283654), PD1

(Abcam, ab237728), PDL1(Abcam ab205921), CASP3 (Abcam, ab32351), CASP9 (Abcam, ab32539)), 100 µL distile suya 0.5 µL antikor gelecek şekilde seyreltilerek lamaların üzerine kondu. İki saat bekletildi. İki saatin sonunda damlar PBS ile beş dakika yıkandı ve daha sonra sekonder HRP antikor (OmniMap anti-Rt HRP, 760-4311) eklendi ve 30 dakika bekletildi. Bekleme süresinin sonunda PBS ile beş dakika yıkandı. Lamlara, yüzde 3 H₂O₂ ile karıştırılarak bir damla DAB boyası (ChromoMap DAB kit, 760-159) damlatıldı ve on dakika bekletildi. Çeşme suyu yıkaması ardından distile su ile yıkanan lamalar, artan alkol serisinden ikişer dakika tutulduktan sonra kurutuldu. Şeffaflama ksilolünde bir saat bekletildi. Daha sonra lamalar entellan ile kapatıldı.

3.5. Apoptoz/Nekroz Oranlarının Belirlenmesi

Apoptoz, birden fazla olayın bir sinyal dizisi gibi gerçekleştiği ve farklı noktalarını değerlendirmek için birçok fırsat sağlayan süreçtir. Bu süreç, akış sitometrik olarak değerlendirilebilmektedir. Farklı apoptotik evrelerdeki hücreler Annexin V ve propidyum iyodür (PI) kullanılarak ayırt edilebilmektedir.

Akış sitometrik apoptoz tayininde BD Accuri C6 fakii sitometri cihazı ve Biologend FITC Annexin V Detection Kit with PI (Katalog No: 640914) kullanıldı. Yöntemin basamakları aşağıdaki gibidir:

- 1) Apoptoz değerlendirmesine alınacak hücre süspansiyonu 1200 rpm'de on dakika santrifüjlendi.
- 2) Santrifüj sonrası üst kısım atıldı. Pellet 500 ml PBS ile iki kez yıkandı.
- 3) Yıkama sonrası yapılan santrifüj sonrasında elde edilen pellet 200 µL Annexin Binding Buffer (1X) solüsyonu ile resüspanse edildi.
- 4) Resüspanse edilen hücreler, tüp başına 1×10^5 hücre olacak şekilde iki tüpe bölündü. Tüplerden birisi boyanın konmadığı iç kontrol olan "Unstained" tüpü, diğer ise boyanacak hücreler olan "Stained" tüpüdür.
- 5) Boyanacak hücrelerin bulunduğu "Stained" tüplerine 5 µL Annexin V-FITC ve 5 µL PI boya eklendi.

- 6) Nazikçe vortekslendi, oda sıcaklığında ve karanlıkta 15-20 dakika inkübe edildi.
- 7) İnkübasyon sonrası tüm tüplerin üzerine 400 µL Annexin Binding Buffer (1X) eklendi.
- 8) Hücrelerin kümelenmesini engellemek adına tüpler filtre edildi.
- 9) Annexin V-FITC (494 nm Eksitasyon dalga boyu, 518 nm emisyon dalga boyu) FL-1 kanalında, PI (535 nm Eksitasyon dalga boyu, 617 nm emisyon dalga boyu) ise FL-2 kanalında flow sitometrik okutulması yapıldı.
- 10) Okutma sonucunda Annexin V-FITC ve PI bağlanmamış hücreler canlı, sadece annexin V-FITC bağlanmış hücreler erken apoptotik, sadece PI bağlanmış hücreler nekrotik ve hem annexin V-FITC hem de PI bağlanmış hücreler geç apoptotik olarak değerlendirildi.

3.6 Moleküler Analizler

3.6.1 Dokudan RNA İzolasyonu

Doku örnekleri, mekanik dağıtıcı yardımıyla homojen hale getirildikten sonra, dokuların üstüne 200 µL Tissue Lysis buffer ve 40 µL Proteinaz K eklenmiş ve 37°C de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından, High Pure RNA Isolation Kit (Roche, 11828665001) kiti kullanılarak izolasyona başlandı. Dokuların üstüne 100 µL no:1 Tissue Lysis buffer eklendi. Daha sonra 40 µL no:2 Proteinaz K solüsyonu eklendi. Ependorflar vortekslendi ve spin yapıldı. Kuru ısı bloğunda 85°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Örnekler ısı bloğundan çıkartılıp oda sıcaklığına getirildikten sonra üzerine 80 µL no:2 solüsyonu eklendi. Kuru ısı bloğunda 55°C'de 30 dakika boyunca inkübe edildi. Örnekler ısı bloğundan çıkartılıp oda sıcaklığına getirildikten sonra üzerine 325 µL no:3 solüsyonu ve 325 µL yüzde 100 etanol eklendi. Pipetaj yapılarak karıştırıldı. Örneklerin tümü, mikropipet ile kitin içinde bulunan spin-kolon tüplere alındı. Tüpler 6000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Altta kalan tüp ekarte edildi, kolonlar temiz yeni bir tüpe aktarıldı. Tüpler 16.000 g'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Altta kalan tüp ekarte edildi, kolonlar temiz yeni bir tüpe aktarıldı. Spin-kolon tüplerin filtrelerinin üzerine 100 µL DNaz working solution eklendi ve 15 µL boyunca oda ısısında bekletildi.

Örneklerin üzerine, 500 µL no:4 solüsyonu eklendi ve 6000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Tüpün altındaki süpernatant döküldü ve filtrenin üstüne 500 µL no:5 solüsyonu eklendi. 6000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. İkinci kez, tüpün altındaki süpernatant döküldü ve filtrenin üstüne 500 µL no:5 solüsyonu eklendi. 6000 g'de 30 saniye santrifüj edildi. Tüpün altındaki süpernatant döküldü, maksimum hızda iki dakika boyunca santrifüj edildi. Altta kalan tüp ekarte edildi, üstte filtrenin olduğu kısımlar temiz 1,5 mL'lik ependorfların üzerine yerleştirildi.

Filtrelerin üzerine 50 µL no:8 Elüsyon buffer eklendi ve oda ısısında bir dakika boyunca beklendi. 6000g 'de bir dk boyunca santrifüj edildi. Filtre kısımları çıkartılıp ekarte edildi. 1.5 mL'lik ependorflarda altta kalan, elde edilen RNA'lar PCR çalışmasında kullanılmak üzere -80 °C'ye kaldırıldı.

3.6.2 cDNA İzolasyonu ve PCR Analizleri

Doku örneklerinden izole edilen RNA'lar, çalışma öncesi -80°C'den çıkartılıp soğuk bloğa kondu ve eritildi. Abm cDNA kiti (abm G236) kullanılarak RNA'ların cDNA'ya çevrilmesi gerçekleşti. 10 µL RNA, 1 µL oligo dt, 1 µL random primer, 1 µL dntp ve 1,5 µL dH₂O, temiz PCR striplerine, her örnekten ayrı hazırlanacak şekilde birleştirildi ve 65°C'de beş dakika kuru ısı bloğunda bekletildi. Daha sonra hemen buza konuldu. RT2, RT6 ve RT7'den 5X buffer, total örnek miktarına göre hazırlandı ve miks oluşturuldu. Hazırlanan miks, 5,5µL örnek başına PCR striplerine dağıtıldı. Böylece total konsantrasyon 20µL'ye tamamlandı. Konvansiyonel PCR cihazında (NYXTechnik, ATC401) cDNA'ya çevrim programı kullanılarak çevrimler yapıldı.

Program döngüsü aşağıdaki gibi uygulandı.

- 25°C 10 dk
 - 50°C 30 dk
 - 85°C 5 dk
- Sürenin sonunda örnekler buza alındı.

cDNA örnekleri, Fast Start Essential DNA Probe Master (Roche, 06402682001) kullanılarak gerçekleştirildi. Buna göre, FGFR1, PDGFRB3, VEGFR, c-Kit, c-Met, RET, AXL, Flt-3, Tie2, ICAM1, VCAM1, E-Selectin genlerinin Forward ve Reverse primerleri ve kontrol geni olarak ise ACTB

kullanılarak real-time PCR gerçekleştirildi. Master miks'ten 16 μ L ve örnekten 4 μ L kullanılarak hacim toplamda 20 μ L'ye tamamlandı. Roche LightCycler Nano cihazı kullanılarak real-time PCR yapıldı.

Program döngüsü aşağıdaki gibidir.

- Denatürasyon 1 Döngü, 95°C 10 dakika
- Amplifikasyon 45 Döngü,
 - 95°C 10 saniye
 - 60°C 30 saniye
 - 72°C 1 saniye
- Soğutma 1 Döngü, 40°C 30 saniye

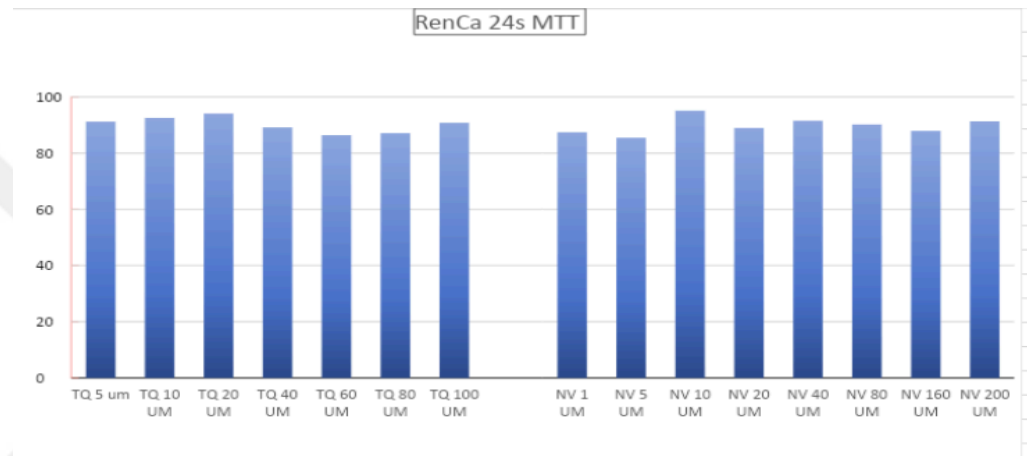
Analiz için, relatif kantitasyon, Δ Ct analiz yöntemi kullanılarak yapıldı.



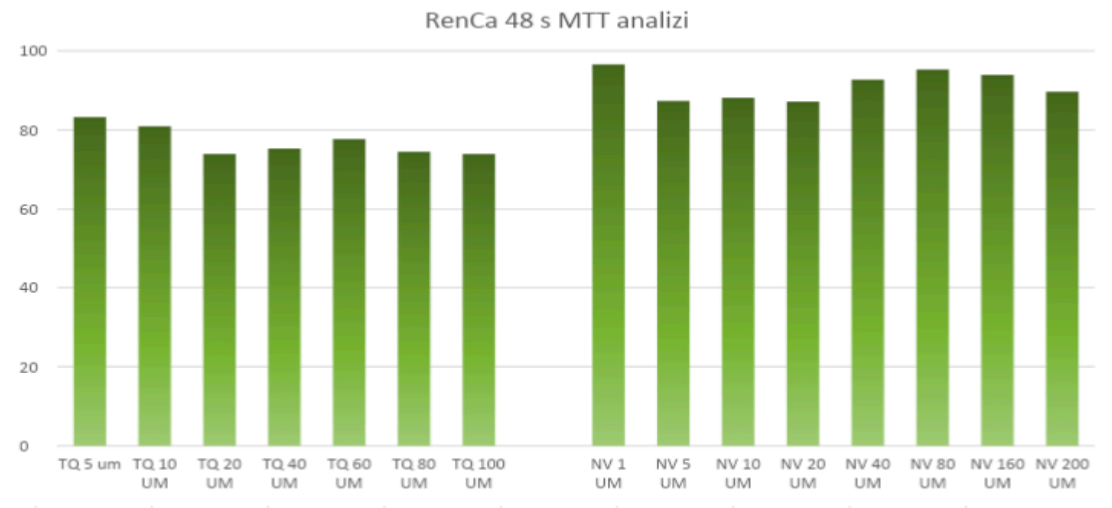
4. BULGULAR

4.1. MTT Canlılık Analiz Sonuçları

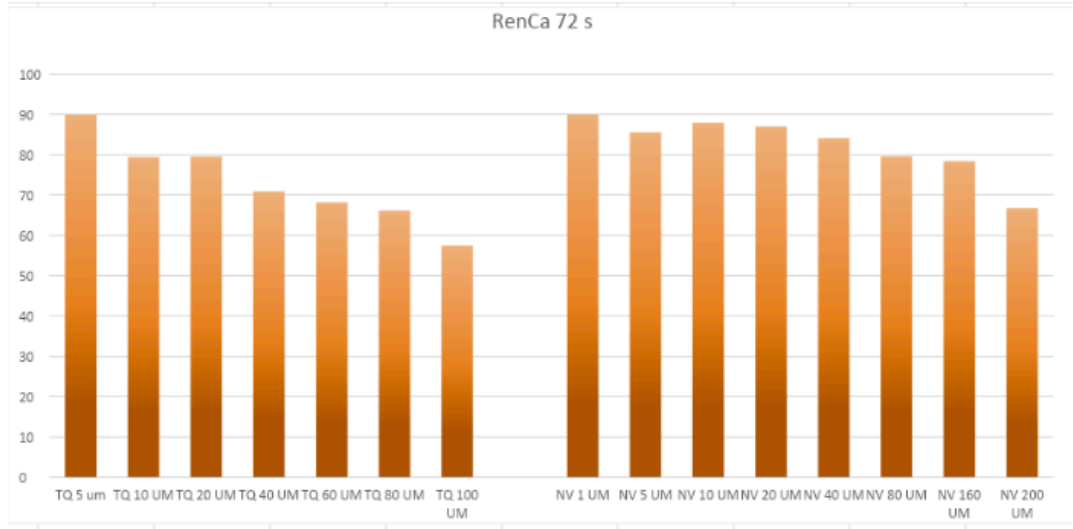
Renca hücre hatlarında 24, 48 ve 72. saat ajan uygulamasında MTT sonuçları Şekil 7-9 de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre hücre canlılığı üzerine en etkin doz olarak, TQ'nun 72. saat uygulamasında 100 μ M ve NV için 72. saat uygulamasında 200 μ M olarak tespit edildi.



Şekil 6. İlaç uygulamaları Renca hücre hatlarında 24. saat MTT analiz sonucu



Şekil 7. İlaç uygulamaları Renca hücre hatlarında 48. saat MTT analiz sonucu



Şekil 8. İlaç uygulamaları Renca hücre hatlarında 72. saat MTT analiz sonucu

4.2. Apoptozis/Nekroz Sonuçları

MTT analizinde belirlenen dozlara göre NV ve TQ tekli ve kombinasyon uygulamalarının Annexin V+PI apoptozis sonuçları Tablo 4'te özetlenmiştir. Buna göre; En yüksek apoptotik ölüm oranı TQ+NV kombinasyon grubunda görülürken, en düşük apoptotik etkiye sebebiyet veren ajan TQ'dur.

Tablo 4. *In vivo* Annexin V+PI ile apoptozis sonuçları

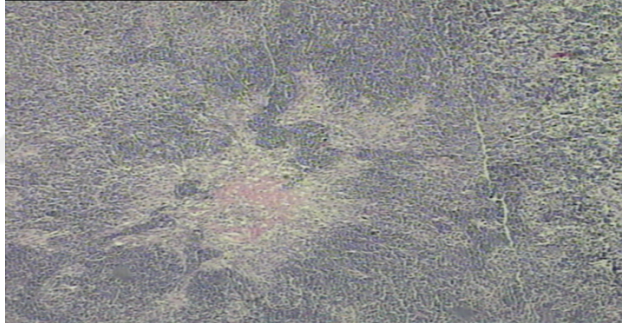
	APOPTOSIS	NECROSIS
CONTROL	%5,3	%9,6
TQ	%10,4	%12,25
NV	%18,4	%5,7
TQ+NV	%25	%14

Tablo 5. Kontrole Kıyasla Tedavi Gruplarının Apoptoz/Nekroz Sonuçlarının İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

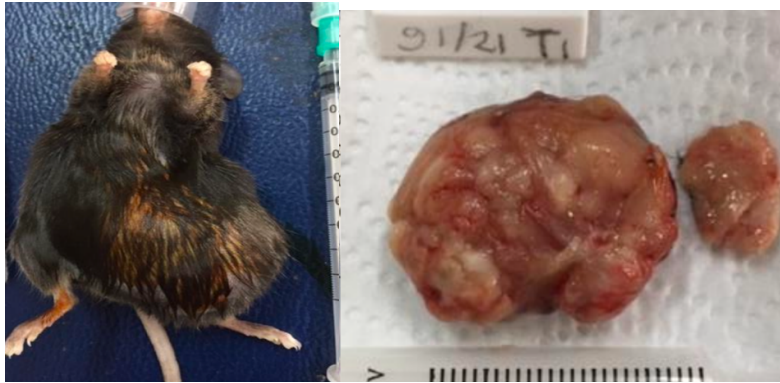
	APOPTOSIS*	NECROSIS*
TQ	0.067	0.054
NV	<i>0.021</i>	<i>0.027</i>
TQ+NV	<i>0.034</i>	0.851

4.3. Hematoksilen Eozin Boyama Sonuçları

Hematoksilen Eozin boyama sonuçları için mikroskopik olarak tümör içi ve tümör çevresindeki inflamatuvar yanıt değerlendirilmiştir. Tümör içi inflamatuvar yanıtın kontrole oranla TQ+NV kombinasyon grubunda artmış olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 9. TQ+NV Kombinasyon Grubunda Tümör Çevresinde Artmış İnflamatuvar Yanıt Örnekleri



Şekil 10. Kontrol grubunda sakrifikasyon sonrası total eksize edilmiş tümör dokusu.

Hayvanlarda hücre hattı ile ksenograft tümör modeli oluşturulduktan sonra tedavi sonrası tüm gruplar sakrifiye edilmiştir. İlk makroskopik bulgular; tümörün yumuşak kıvamlı, iyi sınırlı, solid, kanama nekroz içermediğini ve kesit yüzü heterojen balık eti kıvamında bej renkli olduğunu gösterdi.



Şekil 11. Kombinasyon ve TQ tedavi grubunda makroskopik tümör bulguları

Kombinasyon grubunda (sol) ve TQ grubunda (sağ) tümörde makroskopik olarak küçülme izlenmedi. İç organlarda metastaz bulgusuna rastlanmadı.

4.4. İmmunohistokimya Analiz Sonuçları

Tablo 6’da, *in vivo* deneylerde uygulanan TQ ve NV’nin tekli ve kombinasyon gruplarında protein analizleri amacıyla histokimyasal boyama yapılan grupların analizleri gösterilmektedir. İmmün belirteçlerde CD8+ sitotoksik T lenfositlerde kontrol grubuna oranla NV verilen tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme gösterdi ($p<0,05$). Aynı etki, kontrolle kıyaslandığında kombinasyon grubu olan TQ+NV’de de görüldü ($p<0,05$).

CD68 tümör ilişkili makrofaj belirtecinin ekspresyon seviyelerinde hem NV tedavi grubunda hem de TQ+NV kombinasyon tedavisi grubunda kontrole kıyasla anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,05$).

Bir apoptotik ölüm belirteci olan kaspaz 9 ve kaspaz 3 ekspresyon seviyeleri ise kontrole kıyasla en fazla NV verilen grupta görüldü ($p<0,05$).

Tablo 6. *İn vivo* İlaç Uygulamaları Sonrası Kontrole Kıyasla Tedavi Gruplarının İHK Sonuçlarının İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

	CD20*	CD4*	CD8*	CD68*	VGFR*	PD-1*	PD-L1*	CASP3*	CASP9*
TQ Grubu	0.439	0.211	0.823	0.776	0.242	0.356	0.329	0.334	0.432
NV Grubu	0.373	0.232	0.019	0.034	0.464	0.794	0.696	0.049	0.018
TQ+NV Grubu	0.515	0.375	0.024	0.022	0.533	0.372	0.767	0.527	0.286

*p değerleri

4.5. PCR Gen Analizi Sonuçları

Tablo 7, *in vivo* grupları arasında yapılan gen analizlerinin kıyaslanması ile elde edilen verileri göstermektedir. Anjiyopietin reseptör proteinini kodlayan gen olan Tie2 geninde TQ+NV tedavisi verilen grubun kontrole oranla gen ekspresyon seviyesi anlamlı derecede azaldı ($p<0,05$).

Axl geninde de benzer etki olarak, TQ+NV tedavisi verilen grubun kontrole oranla gen ekspresyon seviyesi anlamlı derecede azaldı ($p<0,05$).

VEGFR gen ekspresyon düzeyleri, yalnızca TQ verilen grupta kontrole kıyasla azalma gösterdi ($p<0,05$). Flt-3 gen ekspresyon düzeyleri de yalnızca TQ verilen grupta belirgin bir azalma gösterdi ($p<0,05$). Benzer şekilde FGFR düzeyleri de yine TQ grubunda kontrole göre belirgin azaldı ($p<0,05$).

Tablo 7. *İn vivo* İlaç Uygulamaları Sonrası Kontrole Kıyasla Tedavi Gruplarının RT-PCR Sonuçlarının İstatistiksel Anlamlılık Değerleri

	TQ Grubu	NV Grubu	TQ+NV Grubu
c-kit*	0.144	0.670	0.439
c-met*	0.386	0.465	0.606
ICAM*	0.109	0.873	0.337
E-Selectin*	0.157	0.831	0.462
VCAM*	0.439	0.337	0.631
Tie2*	0.055	0.631	0.025
Axl*	0.631	0.873	0.028
Flt3*	0.025	0.749	0.337
FGFR*	0.025	0.631	0.200
Ret*	0.109	0.200	0.273
VEGFR*	0.016	0.522	0.150
PDGFR*	0.631	0.337	0.522

*p değerleri

5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler statistical package for social sciences, versiyon 22.0 (SPSS, Chicago, Ill) software programı kullanılarak analiz edilmiştir. Dokudaki tümör hücrelerinde ve çevresindeki immün sistem hücrelerinde İHK ekspresyon oranları ile ilaç uygulaması sonrası tedavi yanıt oranları karşılaştırılarak incelenmiştir. İstatistiksel değerlendirmede bağımsız değişkenler tümör hücreleri ve T hücrelerinde İHK inceleme sonuçları, hücre canlılık yüzdeleri, yaş, cisiyet, tümör hücrelerinin patolojik özellikleri, tümör boyutu ve yerleşimidir. Bağımlı değişkenleri ise her bir ilaç için hücre kültürü koşulunun 3 kez tekrarlarıdır. Bağımsız değişkenler Mann Whitney U test, Kruskal-Wallis test ve χ^2 test ile karşılaştırılmıştır. Bağımlı değişkenler için istatistiksel analiz yapılmamış, sadece ortalamaları alınmıştır. İlaç gruplarının kendi kontrolleri ile karşılaştırılmasında ise Wilcoxon test kullanılmıştır. Analizlerde anlamlılık $p < 0.05$ kesim noktası ile değerlendirilmiştir.

6. TARTIŞMA

Evre I ila III RCC'nin cerrahi rezeksiyonu küratif bir tedavi yaklaşımı olmasına rağmen bu hastaların üçte biri nüks etmektedir. Ek olarak, RCC'li hastaların yaklaşık yüzde 15'i, cerrahinin küratif olmadığı lokal olarak ilerlemiş veya metastatik RCC ile başvurmaktadır. Metastatik RCC'li hastalarda hastalığın doğal seyri, hastalığın klinik, patolojik, laboratuvar ve radyografik özelliklerine bağlı olarak birkaç aydan birkaç yıla kadar değişebilir. Metastatik RCC'nin tedavideki tarihsel gelişimine baktığımızda interlökin, interferon gibi spesifik olmayan immünoterapi tedavilerinden son yıllarda en çok çalışılan TKİ hedefli tedavilere (anti VEGF) ve son olarak immün kontrol noktası inhibitörleri (anti PD-1, anti PD-L1 ve anti CTLA-4) ile oldukça zenginleştiğini görmekteyiz. Bu önemli terapötik gelişmelere rağmen, metastatik RCC'li hastaların beş yıllık sağ kalım oranları, özellikle olumsuz prognostik faktörleri olan hastalarda zayıf kalmaktadır (79). Özellikle son beş yılda bu tedavilerin kombine kullanılması sağ kalımlar üzerine olumlu sonuçlar üretmiştir. VEGF hedefleyici ajanların TKİ'ler ile kombinasyonu, tek başına TKİ sınırlamalarının üstesinden gelebilecek ve hem anjiyogenez kaskadını hem de tümör mikro ortamını hedefleyebilecek terapötik bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır. Anti-VEGFR inhibitörleri (sunitinib, cabozantinib vb) anti anjiyogenik etkilerine ek olarak, immün modülatör etkiler de göstermektedir. VEGF'nin inhibitör freninin kilidini açmak ile, efektör hücrelerin infiltrasyonunu ve aktivasyonunu teşvik etmek ve immün süpresif hücreleri inhibe etmektedir (80). NV ile ilişkili sunitinib veya pazopanib ile ilgili ilk çalışmaların yüksek karaciğer ve gastrointestinal toksisite oranı göstermekte ve olumsuz sonuçları olmasına rağmen (81), yeni kombinasyonların da aktif olduğu ve daha iyi tolere edildiği kanıtlanmıştır (82),(83),(84). Yine de kombinasyon çalışmalarında toksisite etkilerinin daha aydınlatıcı olarak çalışılmasına ve bulguların ortaya konulmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

IMmotion151 çalışmasında, anti VEGF ajanı bevacizumab ile kombine anti PD-L1 atezolizumab, PD-L1 pozitif tümörleri olan hastalarda sunitinib mono terapisinden daha iyi performans göstermiştir (HR = 0.74 [yüzde 95 GA = 0.57-0.96]; p = 0.02]; bununla birlikte, tedavi amaçlı popülasyonda, medyan

OS, kombinasyon kolunda 33,6 aya karşılık sunitinib kolunda 34,9 ay olarak kaydedilmiş ve sonuçlar (HR = 0.93) henüz anlamlılık sınırını geçmemiştir. IMmotion151'in önceden belirlenmiş bir alt grup analizi, sunitinib tedavi koluna kıyasla bevacizumab artı atezolizumab tedavi kolunda sarkomatoid özellikleri olan RCC'li hastalarda progresyonsuz sağ kalım (PFS) açısından önemli bir fayda göstermiştir (85).

Bu çalışmalardan faz III Keynote 426 çalışmasında, daha önce tedavi edilmemiş metastatik RCC'li 861 hasta, pembrolizumab artı aksitinib veya sunitinib kollarına atanmıştır. Birincil sonlanım noktası, tedavi amacına yönelik (ITT) popülasyonundaki OS ve PFS ve ikincil sonlanım noktaları ise objektif yanıt oranları (OYO) idi. 12.8 aylık medyan takipten sonra, bu çalışma PFS (15.1'e aya karşı 11,1 ay, HR = 0,69; yüzde 95 CI = 0,57-0,84; p = 0,001) ve OYO (yüzde 59,3'e karşı yüzde 35,7, p = 0,001) PD-L1 durumu ve prognostik risk kategorisinden bağımsız olarak kombine tedavi kolu lehine sonuçlanmıştır (84). Keynote-426 çalışmasının uzun dönem (medyan takip 30,6 ay) sonuçları medyan GS açısından kombinasyon kolunun üstünlüğünü korumaktadır. Ancak çalışmanın alt grup analizlerine bakıldığında GS farkı kombinasyon kolunda orta-kötü risk faktörlü hastalarda istatistiksel olarak anlamlıyken iyi risk faktörlü hastalarda ise anlamlı değere ulaşmamıştır [HR = 1.06; (%95 CI = 0,60–1,86)]. Tedaviyle ilişkili tüm derecelerdeki yan etki sıklığına bakıldığında her iki kolda ortalama yüzde 97 saptanırken derece 3-5 yan etki olarak bu oran yüzde 67 saptanmıştır.

Tedaviye bağlı herhangi bir immün yan etki ise 3. derece veya daha yüksek yan etkiler kombinasyon kolunda yüzde 10,7 saptanırken sunitinib kolunda yüzde 1,9 saptanmıştır. Bu yan etkiler arasında en sık hepatit, pnömonit, kolit, nefrit ve hipotiroidi saptanmıştır.

Başka bir faz III çalışma olan CheckMate-9ER çalışmasında metastatik RCC için birinci basamak tedavi olarak NV ve cabozantinib kombinasyonu ile sunitinib kombinasyonunu karşılaştırmıştır ve randomize kontrollü bir çalışmadır. Çalışmanın ilk analizinde, standart tedaviye göre kombinasyon kolunun üstünlüğünün, ölüm riskini yüzde 40 azaltarak üç etkinlik sonlanım

noktalarının tümünü karşıladığı gösterilmiştir [HR = 0.60 (%98,89 CI = 0.40-0.89); p = 0.0010]. Cabozantinib ve NV kombinasyonu ile tedavi edilen hastalarda, çalışmanın birincil sonlanım noktası olan medyan PSK, yalnızca sunitinib alan hastalara kıyasla iki katına çıkarmıştır: 8,3 aya kıyasla 16,6 ay [HR = 0,51 (yüzde 95 GA = 0,41–0,64), p=0.0001]. Tüm bu sonuçları, önceden belirlenmiş alt gruplarda ve IMDC ve PD-L1 ifadesine göre tüm risk kategorilerinde tutarlılık göstermektedir (86),(87). Bu çalışmaya dayanarak, Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği (ESMO) ve Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı (NCCN) kılavuzları, tüm prognostik alt gruplarda geçerli bir birinci basamak tedavi olarak NV ve kabozantinib kombinasyonunu önermektedir (87). NV artı ipilimumab kombinasyonu sunitinib ile karşılaştırıldığında orta-kötü risk faktörlü hastalarda sağ kalımı anlamlı bir şekilde iyileştirirken iyi risk faktörlü hastalarda tek ajan sunitinib kombinasyon koluna üstünlük sağladığı görülmüştür (88).

Şu anki haliyle, immüno-hedef kombinasyonu, özellikle tümörü zayıf immün infiltrasyon ile karakterize edilen ve tek başına immün kontrol noktası inhibitörleri bazlı tedaviye yanıt verme olasılığının daha düşük olduğu düşünülen “soğuk” fenotipli hastalarda özellikle geçerli bir fırsatı temsil edebilmektedir.

Mikro ortam RCC, tümör infiltre eden immün hücrelerin heterojen bir popülasyonu ile karakterize edilmekte; ancak bugüne kadar çelişkili veriler bulunmaktadır. CD8+ lenfositler ve M1 makrofajlar gibi efektör T hücrelerinin infiltrasyonu daha iyi bir prognoz ile ilişkilendirilebilirken, T regülatör hücre (TREG) ve M2 makrofajlar gibi düzenleyici T hücrelerinin infiltrasyonu daha kötü bir sonuca sahiptir (87-90). Bunun tersine, yüksek tümör içi ve peri-tümör CD8+ hücre yoğunluğu da kötü prognozla koreledir (91). Tümör hücreleri üzerindeki PD-L1 ekspresyonunun, CD8+ infiltratlı iki tümör grubunu ayırt ederek daha yüksek CD8+ T hücre infiltrasyonuna yol açabileceği ve immün kontrol noktalarının düşük ekspresyonuna ve olgun dendritik hücrelerin lokalizasyonuna sahip grubun iyi bir prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. (92). IMmotion150 çalışmasının bir keşif analizi, PD-L1 ekspresyonu ve T CD8+ hücrelerinin infiltrasyonu ile ilişkili bir T efektör immün geninin,

atezolizumab kolunda daha yüksek bir OYO ve uzun süreli PFS ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Özellikle VEGF blokajının, T hücrelerinin tümör mikroçevresine infiltrasyonunu destekleyebildiği ve böylece immün kontrol noktası inhibitörlerinin etki mekanizmasını güçlendirdiği gözlemlenmiştir (94).

Günümüzde metastatik RCC tedavisinde TKİ ve VEGFR/TKİ kombinasyonları standart tedavi haline gelmiştir. Bu iki ilaç grubunun sinerjik etkilerinin anlaşılabilmesi için kanser bağışıklık döngüsü ve tümör anjiyogenezin tümör mikro çevresine etkisinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Kanser bağışıklık döngüsü kanser hücresinden antijenlerin salınmasıyla başlayan ve kanser hücrelerinin öldürülmesiyle biten çok farklı süreçleri içermektedir. Tümör hücreleri tarafından antijenik peptitlerin salınmasıyla birlikte başlayan süreçte bu antijenler daha sonra yakalanır ve dendritik hücreler tarafından işleme tabi tutulur. Tehdit olarak tanımlanan tümör antijenlerinin bu şekilde tanınması, yüksek mutasyon yükü taşıyan bazı tümörler ve dolayısıyla tümör neoantijenleri için kendiliğinden olabilirken, diğer durumlarda kemoterapi ve/veya radyoterapinin uygulanmasından sonra ortaya çıkmayabilir.

Dendritik hücreler daha sonra doku uygunluk proteinleri (MHC) sınıf I (CD8+ ile etkileşim) ve sınıf II (CD4+ ile etkileşim) yoluyla tümör antijenlerini sunar. Ardından, efektör T hücreleri (CD4+ ve CD8+) ve aynı zamanda rolü temel olan düzenleyici T lenfositler ile ilgili olan bağışıklık hücrelerinin başlatma ve aktivasyon aşaması gelir. Aktive edilmiş T lenfositler, tümöre geçecek ve tümör mikro ortamına girecektir. Tümör hücrelerini tanıyıp T hücre reseptörü (TCR) yoluyla ona bağlanırlar. Bu adım, PD-1/PD-L1 bağlanması yoluyla bağışıklık sisteminden kaçmak için tümör hücreleri tarafından atlanan ana adımlardan biridir. Yeterli lenfosit proliferasyonu, tümör sitoliziyle sonuçlanır.

RCC'ye özgü kanser-bağışıklık döngüsündeki farklar TKİ yanıtını da belirlemektedir. Bu döngünün immünoterapiyi destekleyen dikkate değer RCC'ye özgü özellikleri arasında, RCC'ye özgü salınan antijenler (insan endojen retrovirüsü kaynaklı antijenler dahil), genellikle yüksek seviyelerde CD8+ T hücre infiltrasyonu ve ekspresyonu antijen sunumu ile ilgili genler ve tümör hücresi öldürmeyi destekleyen T hücre fenotipleri yer almaktadır. Tersine, anti

tümör bağışıklığı, genellikle düşük tümör mutasyon yükü, sınırlı sayıda üçüncül lenfoid yapılar, immünoşüpresif sitokinlerin veya VEGF'nin varlığı tarafından bozulabilir. RCC'de anti anjiyogenik tedavinin önemi VHL genindeki mutasyon ile normal iskemik koşullarda bile anjiyogenezin tetklendiği HIF-1 α yıkılamaması ile anlaşılmıştır. Tabi ki RCC'deki anjiyogenik faktörlerin aşırı salınması sadece anti anjiyogenik tedaviler için değil tümör mikro çevresinde bazı immünoşüpresif etkiye neden olması açısından önemlidir. Bu immün şüpresif etkiler arasında; dentrik hücrelerin matürasyonun engellenmesi, M1 makrofajlardan M2 makrofajların polarizasyonun sağlanması, tümör ilişkili makrofajların myeloid kökenli kök hücrelerin aktive olması gibi etkiler sayılabilmektedir.

Özellikle TREG hücrelerinden salınan interlökin-4 (IL-4), IL-10, IL-13 artmış seviyelerinin monositlerin tümör ilişkili makrofajlara farklılaşmasını arttırdığı bilinmektedir.

Diğer bir immün şüpresif etki ise CD8+ üzerindeki PD-1 ekspresyonunun artmasıdır. Anti anjiyogenik ilaçların kullanılması interferon gamma (IFN- γ) aracılı vasküler yeniden modelleme sağlayarak tümör içerisine artmış efektör immün hücre infiltrasyonu sağlamaktadır. Ayrıca yukarıda bahsedilen immün şüpresif mekanizmaları da geri çevirmektedir. Anti anjiyogenik tedavilerle immün terapötik ilaçların beraber kullanımı bu etkiyi potansiyelize etmektedir. Bu mekanizmalar günümüzdeki metastatik RCC'deki kombinasyon tedavilerinin temelini oluşturmaktadır.

RCC'de NV, ilk onay almış anti PD-1 immün kontrol noktası inhibitörüdür. RCC'deki FDA'nın ilk onay verdiği CheckMate 025 çalışması ile metastatik ikinci basamak tedavide yer almıştır. Bu çalışmada, o dönemin ikinci basamakta standart tedavisi olan Everolimus (EVER) ile karşılaştırılmış ve EVER'da genel sağ kalım farkı ortaya koymuştur (25,9 ay vs 19,6 ay, $p < 0.05$). Sonrasında birinci basamakta CABOSUN çalışması ile Sunutinibe karşı objektif yanıt oranları açısından üstünlük sağlamıştır. Güncel olarak CheckMate 214 çalışması ile NV/İpilimumab kombinasyonu ile orta-kötü risk faktörlü hastalarda CheckMate 9ER çalışması ile Cabozantinib/NV

kombinasyonu tüm risk faktörlü metastatik RCC tedavisinde yüksek kanıt düzeyi ile yerini almıştır.

Metastatik RCC tedavisinde kombinasyon tedavilerindeki olumlu gelişmelere rağmen beraberinde birtakım olumsuzlukları da beraberinde getirmektedir. Bunlar arasında kombinasyon tedavilerinin getirdiği ek yan etki toksisiteleri sayılabilmektedir. Diğer bir problem ise tedavideki en etkin iki ajanı beraber kullanıp hastalık ilerlemesi sonrası hangi tedavinin verileceğinin belirsizliğidir.

Çok farklı bir tedavi seçeneği şu an için bulunmamaktadır. Son bir yıldır açıklanan HIF1- α inhibitörleri ile ilgili çalışmalar heyecan vermektedir. Metastatik RCC tedavisinde yeni tedavi seçeneklerine ihtiyaç bulunmaktadır.

TQ'nun; anti inflamatuvar etkileri olan ve apoptosis sinyallerini düzenleme, anjiyogenezis inhibisyonu ve hücre siklusunu durdurucu özelliği ile tümör büyümesini durdurduğu *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda birçok kez gösterilmiştir. TQ ile kemosenitizasyon çoğunlukla *in vitro* çalışmalarla sınırlıdır ve kanser için terapötik strateji potansiyeline sahiptir. TQ'nin kemoterapi ile kombinasyon çalışmalarının sonuçları genellikle etkinliğin ve terapötik etkinliğin arttığı lehine sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte TQ'nin anti PD-1 veya anti PD-L1 ajanlarla kombinasyon deneyleri literatürde bulunmamaktadır. Şimdiye kadar TQ'nun, RCC dahil birçok kanser hücre hatlarında hücre profilerasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Caki hücre hatlarında 24. saatte TQ'nin 25, 50 ve 75 μ M dozlarda doz bağımlı olarak sitotoksik etkili olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada kaspaz inhibitörü zVAD kaspaz inhibitörü (zVAD)'ı TQ tarafından indüklenen apoptozda kaspazların ilişkisini incelemek için kullanılmış ve TQ'nun kaspazı indüklediği tespit edilmiştir. Bu deneyde deoksiribonükleik asit (DNA) parçalanmasının bir sonucu olan sitoplazmik histon seviyesinin arttığı ve dolayısıyla TQ kaynaklı DNA parçalanmasının arttığı gözlemlenmiştir.

TQ'nun; rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) yolağını hedeflediğini göstermek için yapılan *in vitro* çalışmada RCC hücre hatları olan 786-O ve ACHN ile TQ, farklı konsantrasyonlarda (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μ mol/L) sırasıyla 24 saat veya 48 saat süreyle inkübe edilmiştir (89). Sonuçlar,

TQ'nun 24 saatte 786-O'da 55 $\mu\text{mol/L}$ ve ACHN'de 72 $\mu\text{mol/L}$ IC50 değeri ile RCC hücrelerinde hücre büyümesi üzerinde konsantrasyona bağlı inhibisyon sergilediğini göstermiştir. 40 $\mu\text{mol/L}$ TQ, her iki hücre hattında da yüzde 20'den daha az bir hücre proliferasyonunu inhibe etme oranı sergilemiştir.

Aynı alışmada TQ'nun normal renal túbüler epitel hücresi HK-2 üzerindeki etkisini gözlemlenmiş ve düşük TQ dozları (60 $\mu\text{mol/L}$ 'den az) altında HK-2'de hücre büyümesinde önemli bir azalma olmadığını göstermiştir. Bu nedenle, bu çalışmada sonraki deneylerde 24 saatte 40 $\mu\text{mol/L}$ 'lik konsantrasyonda TQ kullanılmıştır. Aynı çalışmada 10 adet erkek çıplak farede 786-O hücreleri ile tümör oluşturulmuş ve TQ 20 mg/kg olacak şekilde her üç günde bir IP olarak uygulanmıştır. 4 hafta sonra tümörlerin boyutlarının kontrol grubunda yaklaşık 500 mm³'e ve TQ grubunda 270 mm³'e ulaştığı görülmüştür. Bu da TQ'nun *in vivo* olarak RCC hücre büyümesini inhibe ettiğini düşündürmüştür. Ayrıca, ihk ve western blot analizini kullanarak EMT ile ilgili olarak TQ grubunda E-kaderin ekspresyonunu arttığını ve N-kaderin ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Akciğer dokularının hematoksilin eozin boyaması ile, kontrol grubuna kıyasla TQ ile tedavi edilen farelerin akciğerlerindeki metastatik nodüllerin sayısında önemli bir azalma olduğu ortaya konulmuştur. Bu veriler, TQ'nun *in vivo* olarak RCC hücre büyümesini ve metastazı engellediğini göstermektedir.

Kou ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 769-P ve 786-O hücreleri, farklı zamanlarda (0, 24, 48 ve 72 saat) farklı TQ dozları (0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15 ve 20 μM) verilerek deney oluşturuldu (90). Konsantrasyona ve zamana bağlı bir şekilde kademeli olarak düşük TQ dozları (10 μM 'ye kadar) yüzde 10'dan daha az hücre büyümesini inhibe etme oranı sergilerken, daha yüksek TQ dozları (10 μM 'nin üstünde) önemli bir hücre proliferasyonu inhibisyonu sergilemiştir. TQ'nun normal renal túbüler epitelyal HK2 hücre hattı üzerinde 24 saat boyunca TQ tedavisi ile hücre büyümesinde önemli bir değişiklik olmadığını, 48 ve 72 saat boyunca TQ tedavisi ile hücre büyümesinde hafif bir düşüş gözlemlendiğini gösterdi, bu da TQ'nun normal epitel hücreleri üzerinde düşük sitotoksik etki gösterdiğini açıklamaktadır.

Çalışmamızda RCC modelini oluşturmak amacı ile Renca hücre hattını kullandık. Literatüre bakıldığında, daha önce TQ ile Renca hücre hatları çalışılmamıştı. Çalışmamızda TQ'un etkili dozu 100 µM bulunmuş olup, NV etkin dozu ise 200 µM olarak saptanmıştır. Apoptozda ise en fazla apoptotik ölüm oranı TQ ve NV'nin kombinasyon olarak verildiği koşulda görülmüştür. Nekroz oranı ise yine en fazla kombinasyon grubunda görülmektedir. *In vivo* aşamada kontrol grubunda tümör çapı ortalama 11 mm³ kadar büyürken bu oran TQ verilen grupta 6.5 mm³ 'e kadar gerilemiş olup, TQ ile NV kombinasyon grubunda 5.1 mm³ 'e kadar gerilemiştir (p=0,042). Bu veriler doğrultusunda; kombinasyon grubunda apoptozun en yüksek oranda etkili olması ile tümör hacimlerinin küçülmesi arasında doğru orantı vardır. Kombinasyon tedavisinin, özellikle sitotoksite ve apoptoz sonuçlarına uygun olarak *in vivo* koşullarda sitotoksik etkili olduğu gösterilmiştir.

İmmünoterapi ilaçlarının *in vivo* çalışmaları yapılırken seçilecek olan hücre hattının murin solid tümör modellerinde immünoterapi yanıtı çalışılmış ve tanımlanmış hücre hatlarının seçilmesine özen gösterilmelidir. Daha önce bu amaçla altı murin tümör modelinin (CT26, 4T1, MAD109, RENCA, LLC ve B16) immün profilleri, immünoterapi rejimlerine karşı yanıt olarak tümör regresyonu çalışılmıştır(91). Her model için kapsamlı profiller, kantitatif RT-PCR, ihk ve akış sitometrisi tekniklerinin yanı sıra baskılayıcı hücre popülasyonlarının fonksiyonel çalışmaları kullanılarak, tümör içi ve drene olan lenfoid dokuları analiz edilerek çalışılmıştır. Çalışılan bu altı modelde tümör infiltrate eden sitotoksik T lenfositlerinin ve olgun dentritik hücrelerinin varlığına rastlanılmamış olup, model oluşturulan altı tümörde kullanılan immünoterapilerle gecikmiş tümör büyümesi ve yaşam süresi artmış ve ayrıca tümör immünojenitesi ile ilişkilendirilmiştir. Tümör MHC sınıf I ekspresyonu, genel tümör immünojenisite seviyesi ile korele olmakla birlikte, bu tedavi rejimleri ile immünoterapi yanıtını tahmin etmek için en önemli belirteç olarak kullanılmıştır.

İnsan kanserlerinde örnek oluşturması için deneysel tümör modelleri kullanılan bu çalışmalarda immünoterapi rejimlerine yanıt verme olasılığı en yüksek olan hastaları belirlemek için bir bağışıklık profilinin seçkin

özelliklerinin nasıl kullanılabileceğini göstermektedir(92). Biz de çalışmamızda, literatüre uyumlu olarak TQ ile immünoterapi ajanı olan NV kullanıldığı için oluşturulan modelin immünojenik olması gerekliliği nedeniyle Renca hücre hattını kullandık.

Çalışmadaki en önemli çıkış noktalarından birisi TQ'nun anti anjiyogenik etkisinin, NV'nin anti tümöral etkisini potansiyelize ettiğini göstermektedir. TQ'nun birçok *in vitro* ve *in vivo* kanser modellerinde anti anjiyogenik etkisi gösterilmiştir (93). Daha önceki çalışmalarda TQ'nun bir anjiyogenez modeli olarak insan umbilikal venöz endotel hücreleri (HUVEC'ler) kullanılarak, TQ'nun VEGF'ye bağımlı önemli bir rol oynayan VEGFR-2 aktivasyonu üzerinde doğrudan bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir(94). Bununla birlikte TQ'nin damar büyümesini ve anjiyogenezin çeşitli adımlarını modüle ettiğini gösterilmiştir (93). Genel olarak, çalışmalar TQ'nun pro anjiyogenik sinyalleşmeden endotel hücre göçüne ve tüp oluşumuna kadar neo vaskülarizasyonun tüm temel basamaklarına müdahale ettiğini göstermektedir (17). Biz de çalışmamızda literatürle ilişkili olarak anti anjiyogenik gen ekspresyon düzeylerinin, kombinasyon tedavi grubu olan TQ+ NV grubunda önemli ölçüde azaldığını tespit ettik.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Metastatik RCC tedavisinde son on yılda önemli gelişmeler olmuştur. Anti anjiyogenik TKİ'lerin önemli etkilerinin üzerine onkolojide immünoterapi çağıyla beraber daha da ilerlemeler kaydedilmiştir. En son Metastatik RCC'nin tedavisinde anti VEGF TKİ ve immüno terapi kombinasyonları gündeme gelmiş ve bu tedavilerle hastaların sağ kalımları önemli ölçüde iyileşmiştir. Ancak beraberinde toksisite problemlerini de getirmiştir. Tüm bu gelişmelerle metastatik RCC tedavisinde farklı ilaç gruplarına ihtiyaç devam etmektedir.

TQ, folklorik olarak kullanılan çörek Otu (*Nigella Sativa*) bitkisinin en aktif bileşenidir. Günümüze göre gerek *in vitro* gerek *in vivo* çalışmalarda anti kanser özellikleri çok iyi çalışılmıştır. Ayrıca anti kanser tedavilerinin toksik etkilerini azalttığına ilişkin çok fazla miktarda veri bulunmaktadır. Bu nedenle kanser tedavisinde kombinasyon olarak kullanımının etkinliği artırırken yan etkilerin azaltılabileceği fikrini oluşturmaktadır. Biz de çalışmamızda bu amaçla *in vitro* ve *in vivo* RCC modelinde daha önce çalışılmamış olan NV ve TQ kombinasyonu kullandık.

Çalışmamız sonuçlarına göre literatüre uygun olarak TQ'nun anti kanser etkilerini olduğu gördük. Ayrıca kombinasyon deney kolonun tümör içi inflamatuvar cevabı arttırdığı, tümör çapını azalttığını, CD8 sitotoksik T lenfosit sayısını arttırdığını gösterdik. Metastatik RCC de önemli anjiogenezis yolaklarından olan Tie2 ve Axl gen ekspresyonunda anlamlı bir şekilde azalttığını gösterdik.

Bizim çalışmamız literatürde ulaşılabildiğimiz kadarıyla NV ve TQ kombinasyonun kullanıldığı ilk çalışmadır. Bu kombinasyonun özellikle etkin olabileceğini ve toksik bir tedavi olmadığını sunmuş bulunmaktayız. Çalışmamız sonuçları ve diğer olası etki mekanizmaları ek çalışmalarla desteklenmelidir.

8. KAYNAKLAR

1. Altekruse SF, Kosary CL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W ve ark. SEER Cancer Statistics Review National Cancer Institute. Cancer. 2010;1975–2007.
2. Kaelin WG. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(11):865–73.
3. Motzer RJ, Hutson T., Tomczak P. Sunitinib versus Interferon Alfa in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2006;355:11–20.
4. Sternberg CN, Davis ID, Mardiak J, Szczylik C, Lee E, Wagstaff J, ve ark. Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: Results of a randomized phase III trial. *J Clin Oncol*. 2010;28(6):1061–8.
5. Tuttle KR. Overall Survival in Renal-Cell Carcinoma with Pazopanib versus Sunitinib. *N Engl J Med*. 2014;370(18):1767–9.
6. Karashima T, Fukuhara H, Tamura K, Ashida S, Kamada M, Inoue K, ve ark. Expression of angiogenesis-related gene profiles and development of resistance to tyrosine-kinase inhibitor in advanced renal cell carcinoma: Characterization of sorafenib-resistant cells derived from a cutaneous metastasis. *Int J Urol*. 2013;20(9):923–30.
7. Rini BI, Atkins MB. Resistance to targeted therapy in renal-cell carcinoma. *Lancet Oncol*. 2009;10(10):992–1000.
8. Zhou L, Liu XD, Sun M, Zhang X, German P, Bai S, ve ark. Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma. *Oncogene*. 2016;35(21):2687–97.
9. Rizzo A, Mollica V, Santoni M, Ricci AD, Rosellini M, Marchetti A, ve ark. Impact of Clinicopathological Features on Survival in Patients Treated with First-line Immune Checkpoint Inhibitors Plus Tyrosine Kinase Inhibitors for Renal Cell Carcinoma: A Meta-analysis of Randomized Clinical Trials. *Eur Urol Focus*. 2022;8(2):514–21.
10. Braun DA, Bakouny Z, Hirsch L, Flippot R, Van Allen EM, Wu CJ, ve ark. Beyond conventional immune-checkpoint inhibition: novel immunotherapies for renal cell

carcinoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021;18(4):199–214.

11. Dirksen AEM, Egbrink MGA, Castermans K, Schaft DWJ, Thijssen VLJL, Dings RPM, ve ark. Anti-angiogenesis therapy can overcome endothelial cell anergy and promote leukocyte-endothelium interactions and infiltration in tumors. *FASEB J*. 2006;20(6):621–30.

12. Yasuda S, Sho M, Yamato I, Yoshiji H, Wakatsuki K, Nishiwada S, ve ark. Simultaneous blockade of programmed death 1 and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) induces synergistic anti-tumour effect in vivo. *Clin Exp Immunol*. 2013;172(3):500–6.

13. Hajhashemi V, Ghannadi A, Jafarabadi H. Black Cumin Seed Essential Oil, as a Potent Analgesic and Antiinflammatory Drug. *Phyther Res*. 2004;18(3):195–9.

14. Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phyther Res*. 2000;14(5):323–8.

15. Woo CC, Kumar AP, Sethi G, Tan KHB. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(4):443–51.

16. Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A, Sisakhtnezhad S. Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacol Res*. 2015;95–96:138–58.

17. Chehl N, Chipitsyna G, Gong Q, Yeo CJ, Arafat HA. Anti-inflammatory effects of the *Nigella sativa* seed extract, thymoquinone, in pancreatic cancer cells. *Hpb*. 2009;11(5):373–81.

18. Dirican A, Atmaca H, Bozkurt E, Erten C, Karaca B, Uslu R. Novel combination of docetaxel and thymoquinone induces synergistic cytotoxicity and apoptosis in DU-145 human prostate cancer cells by modulating PI3K–AKT pathway. *Clin Transl Oncol*. 2015;17(2):145–51.

19. Dirican A, Erten C, Atmaca H, Bozkurt E, Kucukzeybek Y, Varol U, ve ark. Enhanced cytotoxicity and apoptosis by thymoquinone in combination with zoledronic acid in hormone- and drugresistant prostate cancer cell lines. *J BUON*. 2014;19(4):1055–61.

20. Liou YF, Chen PN, Chu SC, Kao SH, Chang YZ, Hsieh YS, ve ark. Thymoquinone suppresses the proliferation of renal cell carcinoma cells via reactive oxygen species-induced apoptosis and reduces cell stemness. *Environ Toxicol.* 2019;34(11):1208–20.
21. Nagi MN, Mansour MA. Protective effect of thymoquinone against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: A possible mechanism of protection. *Pharmacol Res.* 2000;41(3):283–9.
22. Znaor A, Lortet-Tieulent J, Laversanne M, Jemal A, Bray F. International variations and trends in renal cell carcinoma incidence and mortality. *Eur Urol.* 2015;67(3):519–30.
23. Scelo G, Larose TL. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *J Clin Oncol.* 2018;36(36):3574–81.
24. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(1):7–33.
25. WHO. The Global Cancer Observatory. *Int Agency Res Cancer WHO* 2020;419:199–200.
26. Thompson RH, Ordonez MA, Iassonos A et. al. Renal Cell Carcinoma in young and old patients. *J Urol.* 2008;180(4):1262.
27. Cook A, Lorenzo AJ, Salle JLP, Bakhshi M, Cartwright LM, Bagi D, ve ark. Pediatric renal cell carcinoma: Single institution 25-year case series and initial experience with partial nephrectomy. *J Urol.* 2006;175(4):1456–60.
28. Siemer S, Hack M, Lehmann J, Becker F, Stöckle M. Outcome of renal tumors in young adults. *J Urol.* 2006;175(4):1240–4.
29. NIH. Kidney Equivalent Terms and Definitions. 2020;649(December):1–21.
30. Kane CJ, Mallin K, Ritchey J, Cooperberg MR, Carroll PR. Renal cell cancer stage migration: Analysis of the National Cancer Data Base. *Cancer.* 2008;113(1):78–83.
31. Hollingsworth JM, Miller DC, Daignault S, Hollenbeck BK. Rising incidence of small renal masses: A need to reassess treatment effect. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(18):1331–4.

32. Zlotta AR. The changing natural history of renal cell carcinoma. *J Urol.* 2001;166(5):1611–23.
33. Cumberbatch MG, Rota M, Catto JW E ve ark. The role of tobacco smoke in bladder and kidney carcinogenesis. *Eur Urol.* 2016;70(458).
34. Tsivian M, Moreira DM, Caso JR, Mouraviev V, Polascik TJ. Cigarette smoking is associated with advanced renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):2027–31.
35. Hidayat K, Du X, Zou SY, Shi BM. Blood pressure and kidney cancer risk: Meta-analysis of prospective studies. *J Hypertens.* 2017;35(7):1333–44.
36. Adams KF, Leitzmann MF, Albanes D, Kipnis V, Moore SC, Schatzkin A, ve ark. Body size and renal cell cancer incidence in a large US cohort study. *Am J Epidemiol.* 2008;168(3):268–77.
37. Brennan JF, Stilmant MM, Babayan RK, Siroky MB. Acquired Renal Cystic Disease: Implications for the Urologist. *Br J Urol.* 1991;67(4):342–8.
38. Truong LD, Krishnan B, Cao JTH, Barrios R, Suki WN. Renal neoplasm in acquired cystic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 1995;26(1):1–12.
39. Mandel J, Mclaughlin JK, Schlehofer B, Mellempgaard A, Helmert U. International Renal-Cell Cancer Study . IV . Occupation. 1995;605:601–5.
40. Moser A, Range K ve ark. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer risk in a large, prospective cohort Elizabeth. *Bone.* 2008;23(1):1–7.
41. Wiklund F, Tretli S, Choueiri TK, Signoretti S, Fall K, Adami HO. Risk of bilateral renal cell cancer. *J Clin Oncol.* 2009;27(23):3737–41.
42. Gordon SC, Moonka D, Brown KA, Rogers C, Huang MAY, Bhatt N, ve ark. Risk for renal cell carcinoma in chronic hepatitis C infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010;19(4):1066–73.
43. Cheungpasitporn W, Thongprayoon C, O’corragain OA, Edmonds PJ, Ungprasert P, Kittanamongkolchai W, ve ark. The risk of kidney cancer in patients with kidney stones: A systematic review and meta-analysis. *Qjm.* 2015;108(3):205–12.
44. Lee JE, Hunter DJ, Spiegelman D, Adami HO, Albanes D, Bernstein L, ve ark.

Alcohol intake and renal cell cancer in a pooled analysis of 12 prospective studies. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(10):801–10.

45. Lyerly KM, Djamali A. Cystic Diseases of the Kidney. *Pathophysiol Kidney Dis Hypertens.* 2009;109–19.

46. Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ. Histopathology and Classification of Renal Cell Tumors (Adenomas, Oncocytomas and Carcinomas): The Basic Cytological and Histopathological Elements and their Use for Diagnostics. *Pathol Res Pract.* 1986;181(2):125–43.

47. Störkel S, van den Berg E. Morphological classification of renal cancer. *World J Urol.* 1995;13(3):153–8.

48. Patard JJ, Leray E, Rioux-Leclercq N, Cindolo L, Ficarra V, Zisman A, ve ark. Prognostic value of histologic subtypes in renal cell carcinoma: A multicenter experience. *J Clin Oncol.* 2005;23(12):2763–71.

49. Zisman A, Chao DH, Pantuck AJ, Kim HJ, Wieder JA, Figlin RA, ve ark. Unclassified renal cell carcinoma: Clinical features and prognostic impact of a new histological subtype. *J Urol.* 2002;168(3):950–5.

50. Karakiewicz PI, Hutterer GC, Trinh QD, Pantuck AJ, Klatte T, Lam JS, ve ark. Unclassified renal cell carcinoma: An analysis of 85 cases. *BJU Int.* 2007;100(4):802–8.

51. Choueiri TK, Tomczak P, Park SH, Venugopal B, Ferguson T, Chang Y-H, ve ark. Adjuvant Pembrolizumab after Nephrectomy in Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2021;385(8):683–94.

52. May T, Williams M, Wiggins R ve ark. Keytruda FDA. 2021;(1996):6.

53. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, ve ark. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2018;378(14):1277–90.

54. Powles T, Albiges L, Staehler M, Bensalah K, Dabestani S, Giles RH, ve ark. Updated European Association of Urology Guidelines: Recommendations for the

- Treatment of First-line Metastatic Clear Cell Renal Cancer. *Eur Urol.* 2018;73(3):311–5.
55. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, ve ark. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2015;373(19):1803–13.
56. Motzer RJ, Escudier B, George S, Hammers HJ, Srinivas S, Tykodi SS, ve ark. Nivolumab versus everolimus in patients with advanced renal cell carcinoma: Updated results with long-term follow-up of the randomized, open-label, phase 3 CheckMate 025 trial. *Cancer.* 2020;126(18):4156–67.
57. Heng DYC, Xie W, Regan MM, Harshman LC, Bjarnason GA, Vaishampayan UN, ve ark. External validation and comparison with other models of the International Metastatic Renal-Cell Carcinoma Database Consortium prognostic model: A population-based study. *Lancet Oncol.* 2013;14(2):141–8.
58. NCCN Guidelines for Kidney Cancer. 2022;0–5.
59. El-Dakhakhny M. Studies On The Chemical Constitution Of Egyptian Nigella Sativa L. Seeds. *The Essential Oil* 2018;(1):19-27
60. Gurung RL, Lim SN, Khaw AK, Soon JFF, Shenoy K, Ali SM, ve ark. Thymoquinone induces telomere shortening, DNA damage and apoptosis in human glioblastoma cells. *PLoS One.* 2010;5(8).
61. Effenberger-Neidnicht K, Schobert R. Combinatorial effects of thymoquinone on the anti-cancer activity of doxorubicin. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011;67(4):867–74.
62. Jafri SH, Glass J, Shi R, Zhang S, Prince M, Kleiner-Hancock H. Thymoquinone and cisplatin as a therapeutic combination in lung cancer: In vitro and in vivo. *J Exp Clin Cancer Res.* 2010;29(1):1–11.
63. El-Najjar N, Chatila M, Moukadem H, Vuorela H, Ocker M, Gandesiri M, ve ark. Reactive oxygen species mediate thymoquinone-induced apoptosis and activate ERK and JNK signaling. *Apoptosis.* 2010;15(2):183–95.

64. Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, ve ark. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther.* 2007;6(2):160–9.
65. Li QX, Yu DH, Liu G, Ke N, McKelvy J, Wong-Staal F. Selective anticancer strategies via intervention of the death pathways relevant to cell transformation. *Cell Death Differ.* 2008;15(8):1197–210.
66. Gali-Muhtasib HU, Abou Kheir WG, Kheir LA, Darwiche N, Crooks PA. Molecular pathway for thymoquinone-induced cell-cycle arrest and apoptosis in neoplastic keratinocytes. *Anticancer Drugs.* 2004;15(4):389–99.
67. Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, ve ark. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. *Int J Oncol.* 2004;25(4):857–66.
68. Hussain AR, Ahmed M, Ahmed S, Manogaran P, Plataniias LC, Alvi SN, ve ark. Thymoquinone suppresses growth and induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in primary effusion lymphoma. *Free Radic Biol Med.* 2011;50(8):978–87.
69. Li F, Rajendran P, Sethi G. Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. *Br J Pharmacol.* 2010;161(3):541–54.
70. Sethi G, Kwang SA, Aggarwal BB. Targeting nuclear factor- κ B activation pathway by thymoquinone: Role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis. *Mol Cancer Res.* 2008;6(6):1059–70.
71. Banerjee S, Kaseb AO, Wang Z, Kong D, Mohammad M, Padhye S, ve ark. Antitumor activity of gemcitabine and oxaliplatin is augmented by thymoquinone in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2009;69(13):5575–83.
72. Yi T, Cho SG, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, ve ark. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and

extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(7):1789–96.

73. Torres MP, Ponnusamy MP, Chakraborty S, Smith LM, Das S, Arafat HA, ve ark. Effects of thymoquinone in the expression of mucin 4 in pancreatic cancer cells: Implications for the development of novel cancer therapies. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(5):1419–31.

74. Woo CC, Loo SY, Gee V, Yap CW, Sethi G, Kumar AP, ve ark. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: Possible involvement of PPAR- γ pathway. *Biochem Pharmacol.* 2011;82(5):464–75.

75. Cecarini V, Quassinti L, Di Blasio A, Bonfili L, Bramucci M, Lupidi G, ve ark. Effects of thymoquinone on isolated and cellular proteasomes. *Febs J.* 2010;277(9):2128–41.

76. Alhosin M, Abusnina A, Achour M, Sharif T, Muller C, Peluso J, ve ark. Induction of apoptosis by thymoquinone in lymphoblastic leukemia Jurkat cells is mediated by a p73-dependent pathway which targets the epigenetic integrator UHRF1. *Biochem Pharmacol.* 2010;79(9):1251–60.

77. Ng WK, Yazan LS, Ismail M. Thymoquinone from *Nigella sativa* was more potent than cisplatin in eliminating of SiHa cells via apoptosis with down-regulation of Bcl-2 protein. *Toxicol Vit.* 2011;25(7):1392–8.

78. EMA. Assessment report: Nivolumab BMS International non-proprietary name: Nivolumab Procedure No. EMEA/H/C/003840/0000. 2015;(February).

79. Pal SK, Ghate SR, Li N, Swallow E, Peeples M, Zichlin ML, ve ark. Real-World Survival Outcomes and Prognostic Factors Among Patients Receiving First Targeted Therapy for Advanced Renal Cell Carcinoma: A SEER–Medicare Database Analysis. *Clin Genitourin Cancer.* 2017;15(4):e573–82.

80. Ott PA, Stephen Hodi F, Buchbinder EI. Inhibition of immune checkpoints and vascular endothelial growth factor as combination therapy for metastatic melanoma: An overview of rationale, preclinical evidence, and initial clinical data. *Front Oncol.* 2015;5(SEP):1–7.

81. Amin A, Plimack ER, Ernstoff MS, Lewis LD, Bauer TM, McDermott DF, ve ark. Safety and efficacy of nivolumab in combination with sunitinib or pazopanib in advanced or metastatic renal cell carcinoma: The CheckMate 016 study. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):1–12.
82. Rini BI, Powles T, Atkins MB, Escudier B, McDermott DF, Suarez C, ve ark. Atezolizumab plus bevacizumab versus sunitinib in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma (IMmotion151): a multicentre, open-label, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet*. 2019;393(10189):2404–15.
83. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, Rini B, Albiges L, Campbell MT, ve ark. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019;380(12):1103–15.
84. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, ve ark. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019;380(12):1116–27.
85. Rini BI, Motzer RJ, Powles T, McDermott DF, Escudier B, Donskov F, ve ark. Atezolizumab plus Bevacizumab Versus Sunitinib for Patients with Untreated Metastatic Renal Cell Carcinoma and Sarcomatoid Features: A Prespecified Subgroup Analysis of the IMmotion151 Clinical Trial. *Eur Urol*. 2021;79(5):659–62.
86. Kfoury M, Oing C. ESMO20 YO for YO: Highlights on metastatic renal cell carcinoma The CheckMate-9ER trial. *ESMO Open*. 2021;6(1):100025.
87. Choueiri TK, Powles T, Burotto M, Bourlon MT, Zurawski B, Oyervides Juárez VM, ve ark. Nivolumab + cabozantinib vs sunitinib in first-line treatment for advanced renal cell carcinoma: First results from the randomized phase III CheckMate 9ER trial. *Ann Oncol*. 2020;31:S1159.
88. Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, Arén Frontera O, Hammers HJ, Carducci MA, ve ark. Nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in first-line treatment for advanced renal cell carcinoma: extended follow-up of efficacy and safety results from a randomised, controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2019;20(10):1370–85.
89. Zhang Y, Fan Y, Huang S, Wang G, Han R, Lei F, ve ark. Thymoquinone inhibits

the metastasis of renal cell cancer cells by inducing autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway. *Cancer Sci.* 2018;109(12):3865–73.

90. Kou B, Kou Q, Ma B, Zhang J, Sun B, Yang Y, ve ark. Thymoquinone inhibits metastatic phenotype and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma by regulating the LKB1/AMPK signaling pathway. *Oncol Rep.* 2018;40(3):1443–50.

91. Lechner MG, Karimi SS, Barry-Holson K, Angell TE, Murphy KA, Church CH, ve ark. Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. *J Immunother.* 2013;36(9):477–89.

92. Sadun RE, Sachsman SM, Chen X, Christenson KW, Morris WZ, Hu P, ve ark. Immune signatures of murine and human cancers reveal unique mechanisms of tumor escape and new targets for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res.* 2007;13(13):4016–25.

93. Banerjee S, Padhye S, Azmi A, Wang Z, Philip PA, Kucuk O, ve ark. Review on molecular and therapeutic potential of thymoquinone in cancer. *Nutr Cancer.* 2010;62(7):938–46.

94. Yi T, Cho S, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, ve ark. Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and ERK signaling pathways. *Mol Cancer Ther.* 2009;7(7):1789–96.

9. EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayları

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MÜHÜRÜSÜZLÜK LABORATUVARI HAYVAN GENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
36340 Kurum: İzin-312 4179714

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 06/10/2017
Toplantı Tarihi : 16 Mayıs 2017

Sayın, Prof. Dr. Işıl SOMALI
DEÜ Onkoloji Enstitüsü Müdürüğü

22/2017 Protokol No'lu: yürütücüsü olduğunuz "Thymoqinone'un Deneysel Renal Hücreli Kanser Modellerinde Etkisi" isimli; Ahmet Dirican, Zekiye Altun, Osman Yılmaz, Safiye Aktaş, M. Oktay Tarhan'ın araştırmacı olduğu, 28 Adet Nüde Forenisi verildiği projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin başvuru formunda bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından seçilmiştir.

Önem No/Toplantı No/Yılı : 04/12/2021

35340. İnciraltı /zmr-232 4122234

Toplantı Tarihi : 11 Ağustos 2021

Sayın, Prof.Dr. Safiye AKTAŞ
DEÜ Tıp Fakültesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı

22/2017 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz " Thymoquinone'un Deneysel Renal Hücreli Kanser Modellerinde Etkisi " isimli; Ahmet DIRİCAN, Zekiye ALTUN, Osman YILMAZ, M.Oktay TARHAN, Işıl SOMALI'nın araştırmacı olduğu, 28 adet Nude farenin verildiği projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilen projede; gönderilen belgeler incelenerek, proje yürütücüsü Işıl SOMALI yerine Safiye AKTAŞ'ın atanması ve 28 adet Nude farenin 28 adet siyah C57BL fare ile değiştirilmesi hususunda bilgi edinilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

EK-2. Tez ile İlişkili Yayınlar (Dergi Gönderim Belgesi)

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
ADM: Zimmer, Benjamin	EBM-23-RM-0309	Effect of Thymoquinone In Combination With Nivolumab on Experimental Renal Cell Cancer Models View Submission Cover Letter	27-Apr-2023	05-May-2023
• Awaiting Global Editor Checklist				
Contact Journal				

Dergiye gönderildi.

1) Effect of Thymoquinone In Combination With Nivolumab on Experimental Renal Cell Cancer Models: Effect of Thymoquinone on Renal Cancer

Ahmet DİRİCAN ¹ , Özde GÖKBAYRAK ¹ , Aylin EROL ¹ , Tekincan AKTAŞ ¹ , Efsun KOLATAN ² , Efe SERİNAN ¹ , Zekiye Sultan ALTUN ¹ , Işıl SOMALI ³ , Osman YILMAZ ² , Safiye AKTAŞ ¹

1-Dokuz Eylul University, Institute of Oncology, Department of Basic Oncology, Izmir 35330, Turkiye,

2-Dokuz Eylul University, Department of Experimental Animal Sciences, Izmir 35330, Turkiye

3-Dokuz Eylul University, Institute of Oncology, Department of Clinic Oncology, Izmir 35330, Turkiye

ABSTRACT

We investigated the effects of thymoquinone (TQ) in combination with Nivolumab on experimental renal cell cancer models. TQ is a bioactive component extracted from *Nigella sativa* seeds, TQ has anti-inflammatory, antioxidant, and anti-tumor properties against various cancers. The effect of TQ and Nivolumab were analyzed using cell line Renca with MTT and Annexin V + PI assays. Renca cells were subcutaneously injected into 8-week-old male C57BL/6 mice. Groups were designed as control, TQ, NV, TQ+NV. Tumor tissues were analyzed for apoptosis/necrosis rates, expression of immunomarkers and RNA expression. at significance level of $p < 0.05$. The results showed that TQ had anti-tumor effects both in-vitro and in-vivo. The combination treatment with Nivolumab led to an increase in immune mediated tumor cell death, resulting in significant necrosis or complete response to therapy in the tumor tissue. TQ has anti-tumor properties against renal cell carcinoma and enhances the immune mediated tumor cell death effects of Nivolumab.

Keywords: Renal Cell Cancer, Thymoquinone, Immune Checkpoint Inhibitors

Derginin kayıtlı endekste yer aldığını gösteren bilgi

Refine Your Search Results

 Sort By: Relevancy ▾

Search Results

Found 9,223 results (Page 1) [← Share These Results](#)

Exact Match Found

EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE

Publisher: **SAGE PUBLICATIONS LTD , 1 OLIVERS YARD, 55 CITY ROAD, LONDON, ENGLAND, EC1Y 1SP**

ISSN / eISSN: **1535-3702 / 1535-3699**

Web of Science Core Collection: **Science Citation Index Expanded**

Additional Web of Science Indexes: **Biological Abstracts | BIOSIS Previews | Current Contents Life Sciences | Essential Science Indicators**

[← Share This Journal](#)

* Requires free login.

Effect of Thymoquinone In Combination With Nivolumab on Experimental Renal Cell Cancer Models

Journal:	<i>Experimental Biology and Medicine</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Dirican, Ahmet; Dokuz Eylül University, Institute of Oncology Gokbayrak, Ozde; Dokuz Eylül University, Institute of Oncology Erol, Aylin; Dokuz Eylül University, Institute of Oncology Aktas, Tekincan ; Dokuz Eylül University, Institute of Oncology Kolatan, Efsun; Dokuz Eylül University, Institute of Oncology Serinan, Efe; Dokuz Eylül University, Institute of Oncology Altun, Zekiye; Dokuz Eylül University, Institute of Oncology Somali, Isil; Dokuz Eylül University, Institute of Oncology Yilmaz, Osman; Dokuz Eylül University, Institute of Oncology Aktaş, Safiye; Dokuz Eylül University, Institute of Oncology
Keywords:	RENAL, TUMOR, PHYTOCHEMICALS, MEDICINE/ONCOLOGY/PATHOLOGY, IMMUNOTHERAPY, CELL
Abstract:	<p>Objective: We investigated the effects of thymoquinone (TQ) in combination with Nivolumab on experimental renal cell cancer models. TQ is a bioactive component extracted from <i>Nigella sativa</i> seeds, TQ has anti-inflammatory, antioxidant, and anti-tumor properties against various cancers.</p> <p>Methods: The effect of TQ and Nivolumab were analyzed using cell line Renca with MTT and Annexin V + PI assays. Renca cells were subcutaneously injected into 8-week-old male C57BL/6 mice. Groups were designed as control, TQ, NV, TQ+NV. Tumor tissues were analyzed for apoptosis/necrosis rates, expression of immunomarkers and RNA expression. at significance level of $p < 0.05$.</p> <p>Results: The results showed that TQ had anti-tumor effects both in-vitro and in-vivo. The combination treatment with Nivolumab led to an increase in immune mediated tumor cell death, resulting in significant necrosis or complete response to therapy in the tumor tissue.</p> <p>Conclusion: TQ has anti-tumor properties against renal cell carcinoma and enhances the immune mediated tumor cell death effects of Nivolumab.</p> <p>Keywords: Renal Cell Cancer, Thymoquinone, Immune Checkpoint Inhibitors</p>

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc.manuscriptcentral.com/ebm>

2) **Dirican A.,** Uncu D., Sekacheva M., Artac M., Aladashvil A., Erdogan AP., Kaplan MA., Alacacioglu A., Boukovinas I., Turhal NS., “ (2023) “Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma: an international multicentre study by the OncoBridge Study Group” Eastern Mediterranean Health Journal

Dergi indeksi.: SCIE

Already have a manuscript? Use our Manuscript Matcher to find the best relevant journals! [Find a Match](#)

Refine Your Search Results

Eastern Mediterranean Health Journal [Search](#) Sort By: Relevancy

Search Results

Found 1,668 results (Page 1) [Share These Results](#)

Filters [Clear All](#)

- Web of Science Coverage
- Open Access
- Category
- Country / Region
- Language
- Frequency

Exact Match Found

EASTERN MEDITERRANEAN HEALTH JOURNAL

Publisher: WHO EASTERN MEDITERRANEAN REGIONAL OFFICE, P. O. BOX 7608, NASR CITY, CAIRO, EGYPT,
ISSN / eISSN: 1020-3397 / 1687-1634
Web of Science Core Collection: Science Citation Index Expanded | Social Sciences Citation Index
Additional Web of Science Indexes: Biological Abstracts | BIOSIS Previews | Essential Science Indicators

[Share This Journal](#) [View profile page](#) *Requires free login.

Dergiye kabul aldı.

em Eastern Mediterranean Health Journal Ahmet Dirican | Logout

Home Main Menu Submit a Manuscript About Help

← Submissions with an Editorial Office Decision for Author

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions) Results per page 10

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status	Date Final Disposition Set	Final Disposition
View Submission Author Status Author Response View Decision Letter View Attachments Correspondence Send E-mail	EMHJ-D-21-00892	Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma: An international multicenter study by the OncoBridge Study Group.	09 Oct 2021	08 Dec 2022	Accept		

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions) Results per page 10

Clinical characteristics and prognosis of hepatocellular carcinoma: an international multicentre study by the OncoBridge Study Group

Ahmet Dirican,¹ Dogan Uncu,² Marina Sekacheva,³ Mehmet Artaç,⁴ Archil Aladashvil,⁵ Atike P. Erdogan,⁶ Muhammet A. Kaplan,⁷ Ahmet Alacacioğlu,⁸ Ioannis Boukovinas⁹ and Nazim S. Turhal¹⁰

Abstract

Background: Hepatocellular carcinoma (HCC) is a significant health problem, and the associated mortality rate is increasing.

Aim: We aimed to determine the clinical characteristics and prognostic factors for HCC in member countries of the OncoBridge Study Group.

Methods: In this study we recruited 630 patients diagnosed with HCC between 2013 and 2019. The participants were from 4 countries (Turkey, Russia, Georgia and Greece). Univariate and multivariate analyses were carried out to investigate clinical and laboratory prognostic factors. Receiver operating characteristic (ROC) analysis was also used to determine the prognostic value of the neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and alpha-fetoprotein (AFP) value.

Results: The 3 most common etiological factors were hepatitis B infection (39.7%), hepatitis C virus infection (17.0%) and non-alcoholic fatty liver disease (9.0%). Median overall survival for the whole group was 25 [95% confidence interval (CI): 15.7–34.2] months. Cut-off values for AFP and NLR were accepted as 200 ng/mL and 3.45, respectively. The area under the ROC curve values for AFP, NLR and NLR+AFP were 0.625 (95% CI: 0.547–0.704), 0.589 (95% CI: 0.512–0.667) and 0.657 (95% CI: 0.583–0.731). From the multivariate analysis, advanced tumour size, lymph node involvement and metastasis (TNM) stage; presence of cirrhosis; high AFP, and high NLR values were associated with poor survival.

Conclusion: Alpha-fetoprotein, NLR, advanced TNM and presence of cirrhosis might predict prognosis in patients with HCC. However, this should be supported by studies involving more countries.

Keywords: hepatocellular carcinoma, prognosis, neutrophil to lymphocyte ratio

3)Tural D., Ölmez ÖF., Sümbül AT., Özhan N., Çakar B., Köstek O., Ekenle M., Erman M., Coşkun HŞ., Selçukbiricik F., Keskin Ö., Türköz FP., Oruç K., Batram S., Bilgetekin İ., Yıldız B., Şendur MA., Paksoy N., **Dirican A.**, Erdem D., *ve ark.* “Prognostic factors in patients with metastatic urothelial carcinoma who have treated with Atezolizumab” (2021) International Journal of Clinical Oncology
Dergi İndeksi: SCIE

Refine Your Search Results

International Journal of Clinical Oncology Sort By: Relevancy

Search Results

Found 5,978 results (Page 1) [Share These Results](#)

Exact Match Found

INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

Publisher: SPRINGER JAPAN KK, SHIROYAMA TRUST TOWER 5F, 4-3-1 TORANOMON, MINATO-KU, TOKYO, JAPAN, 105-6005
ISSN / eISSN: 1341-9625 / 1437-7772
Web of Science Core Collection: Science Citation Index Expanded
Additional Web of Science Indexes: Essential Science Indicators

[Share This Journal](#)
* Requires free login.

Abstract

Background Atezolizumab (ATZ) has demonstrated antitumor activity and manageable safety in previous studies of patients with metastatic platinum-resistant urothelial carcinoma. However, the response rate of Atezolizumab was modest. In the current study, we evaluated the pretreatment prognostic factors for overall survival in patients with metastatic urothelial carcinoma who have progressed after first-line chemotherapy in the Expanded-Access Program of Atezolizumab.

Patients and methods In this study, we present a retrospective analysis of 113 patients with urothelial cancer treated with ATZ after progression on first-line chemotherapy. Data of the patients was obtained from patient files and hospital records. Eligible patients included metastatic urothelial carcinoma patients treated with at least one course of ATZ. Univariate analysis was used to identify clinical and laboratory factors that significantly impact OS. Variables were retained for multivariate analysis if they had a statistical relationship with OS ($p < 0.1$), and then included a final model of $p < 0.05$.

Results The median follow-up duration was 23.5 months. Of the patients, 98 (86.7%) were male and 13.3% were female. The median age was 65 years of age (37–86). In univariate analysis, primary tumor location in the upper tract, increasing absolute neutrophil count (ANC), increasing absolute lymphocyte count, neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) > 3 , liver metastases, baseline creatinine clearance less (GFR) than 60 ml/min, Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status ($1 \geq$), and hemoglobin levels below 10 mg/dl were all the significantly associated with OS. Three of the five adverse prognostic factors according to the Bellmunt criteria were independent of short survival: liver metastases HR 3.105; 95% CI 1.673–5.761; $p < (0.001)$, ECOG PS ($1 \geq$) HR 2.184; 95% CI 1.120–4.256; $p = 0.022$, and Hemoglobin level below 10 mg/dl HR 2.680; 95% CI 1.558–4.608; $p < (0.001)$. In addition, NLR > 3 hazard ratio [HR] 2.092; 95% CI 1.031–4.243; $p = 0.041$ and GFR less than 60 ml/min HR 1.829; 95% CI 1.1–3.041; $p = 0.02$, maintained a significant association with OS in multivariate analysis.

Conclusions This model confirms the Bellmunt model with the addition of NLR > 3 and GFR less than 60 ml/min and can be associated with clinical trials that use immunotherapy in patients with bladder cancer.

Keywords Atezolizumab · Urothelial carcinoma · Bladder cancer · Immunotherapy

- 4) Tural D., Ölmez ÖF., Sümbül AT., Artaç M., Özhan N., Akar E., Çakar B., Köstek O., Ekenel M., Erman M., Coşkun HŞ., Selçukbiricik F., Keskin Ö., Türköz FP., Oruç K., Bayram S., Yılmaz U., Bilgetekin İ., Yıldız B., Şendur MA., Paksoy N., **Dirican A.**, Erdem D., ve ark., “Atezolizumab in Patients with Metastatic Urothelial Carcinoma Who Have Progressed After First-line Chemotherapy: Results of Real-life Experiences” (2020) Eur Urol Focus.

Dergi İndeksi: SCIE

Refine Your Search Results

European Urology Focus Sort By: Relevancy

Search Results

Found 590 results (Page 1) [Share These Results](#)

Exact Match Found

EUROPEAN UROLOGY FOCUS

Publisher: ELSEVIER, RADARWEG 29, AMSTERDAM, Netherlands, 1043 NX
ISSN / eISSN: 2405-4569
Web of Science Core Collection: Science Citation Index Expanded
Additional Web of Science Indexes: Current Contents Clinical Medicine | Essential Science Indicators

[Share This Journal](#) [View profile page](#)
* Requires free login.

Article info

Article history:

Accepted September 18, 2020

Associate Editor: Peter Black

Keywords:

Atezolizumab
Urothelial carcinoma
Bladder cancer
Immunotherapy

Abstract

Background: Atezolizumab (ATZ) has demonstrated antitumor activity and manageable safety in previous studies in patients with locally advanced or metastatic platinum-resistant urothelial carcinoma.

Objective: To compare the real-life experience and data of clinical trials on ATZ treatment in metastatic urothelial carcinoma.

Design, setting, and participants: Patients with urothelial cancer treated with ATZ after progression on first-line chemotherapy from an expanded access program were retrospectively studied. Data of patients were obtained from their files and hospital records. Safety was evaluated for patients treated with at least one cycle of ATZ.

Outcome measurements and statistical analysis: The primary endpoint was objective response rate (ORR). The secondary endpoints are overall survival (OS), progression-free

survival (PFS), duration of response, and safety profile of patients. Kaplan-Meier methods were used to calculate median follow-up and estimate PFS and OS.

Results and limitations: Data of 115 enrolled patients were analyzed. Most of the patients (92.3%, $n = 106$) had received chemotherapy regimen only once prior to ATZ. The median follow-up duration was 23.5 mo. The complete response rate, partial response rate, and ORR were 8.7% ($n = 10$), 20.0% ($n = 23$), and 28.7% ($n = 33$), respectively. The median duration of response was 20.4 mo (95% confidence interval [CI], 6.47–28.8). Of the 33 patients who responded to treatment, 60% ($n = 20$) had an ongoing response at the time of the analysis. PFS and OS with ATZ were 3.8 mo (95% CI, 2.25–5.49) and 9.8 mo (95% CI, 6.7–12.9), respectively. All-cause and any-grade adverse events were observed in 113 (98%) patients. Of the patients, 64% experienced a treatment-related adverse event of any grade and 24 (21.2%) had a grade 3–4 treatment-related adverse event. Limitations of the study included its retrospective design, and determination of treatment response based on clinical notes and local radiographic studies.

Conclusions: In these real-life data, ATZ was effective and well tolerated in patients with metastatic urothelial carcinoma who have progressed with platinum-based first-line chemotherapy. ATZ is an effective and tolerable treatment for patients with locally advanced or metastatic platinum-resistant urothelial carcinoma in our study, similar to previously reported trials.

Patient summary: Atezolizumab is effective and well-tolerated in patients with metastatic urothelial cancer who progressed with first-line chemotherapy, consistent with the outcomes of the previous clinical trials in this setting.

© 2020 Published by Elsevier B.V. on behalf of European Association of Urology.

- 5) Oktay E., Yalcin GD., Ekmekci S., Kahraman DS., Yalcin A., Değirmenci M., **Dirican A.**, Altin Z., Ozdemir O., Surmeli Z., Diniz G., Ayhan S., Bulut G., Erdoğan A., Uslu R. “Programmed cell death ligand-1 expression in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors” 2019 Journal of BUON

JBUON 2019; 24(2): 779-790
ISSN: 1107-0625, online ISSN: 2241-6293 • www.jbuon.com
E-mail: editorial_office@jbuon.com

ORIGINAL ARTICLE

Programmed cell death ligand-1 expression in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors

Esin Oktay¹, Gizem Donmez Yalcin², Sumeyye Ekmekci³, Dudu Solakoglu Kahraman³, Abdullah Yalcin², Mustafa Degirmenci⁴, Ahmet Dirican⁵, Zeynep Altin⁶, Ozlem Ozdemir⁵, Zeki Surmeli⁴, Gulden Diniz², Semin Ayhan⁷, Gulcan Bulut⁸, Atike Erdogan⁸, Ruchan Uslu⁸

¹Aydin Government Hospital, Department of Medical Oncology, Aydin, Turkey; ²Adnan Menderes University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Aydin, Turkey; ³Tepecik Training and Research Hospital, Department of Pathology, Izmir, Turkey; ⁴Tepecik Training and Research Hospital Department of Medical Oncology, Izmir, Turkey; ⁵Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Department of Medical Oncology, Manisa, Turkey; ⁶Tepecik Training and Research Hospital Department of Internal Medicine, Izmir, Turkey; ⁷Celal Bayar University, Faculty of Medicine, Department of Pathology, Manisa, Turkey; ⁸Ege University, Faculty of Medicine, Department of Medical Oncology, Izmir, Turkey.

Summary

Purpose: Gastroenteropancreatic tumors (GEPNETs) is a heterogeneous disease with variable clinical course. While promising therapeutic options exist for other adult cancers, there are no new molecular-based treatments developed for GEPNETs. One of the main targets of cancer immunotherapy is the Programmed Cell Death Ligand-1 (PD-L1) pathway. Our purpose was to investigate the profile of PD-L1 expression in different organs of GEPNETs and compare the conventional immunohistochemistry (IHC) with the RNA expression analysis via real time polymerase chain reaction (RT-PCR) in order to determine which patients might be appropriate for immune check point-targeted therapy.

Methods: A total of 59 surgically or endoscopically resected GEPNET tissues were retrospectively collected. The expression of PD-L1 and mRNA was evaluated with IHC.

Results: The expression of PD-L1 was significantly associated with the high-grade classification ($p=0.012$). PD-L1

mRNA expression in tumor samples appeared to be higher compared to the corresponding normal tissues. In appendix, stomach and small intestine, the expression of PD-L1 mRNA was higher in the tumor tissues compared to the respective controls. In pancreas and colon, control tissues tend to have a higher PD-L1 mRNA expression compared to tumor tissues. PD-L1 mRNA expression was higher in GEP carcinomas ($p=0.0031$).

Conclusion: RT-PCR was found to be more sensitive in detecting PD-L1 expression than conventional IHC. This study may provide an important starting point and useful background information for future research about immunotherapy for appendix, stomach and small intestine neuroendocrine carcinomas.

Key words: PD-1, PD-L1, GEPNET, GEP carcinomas, RT-PCR, immunohistochemistry

EK-3 Tez ile İlişkili Poster Bildiri Özeti 1



POSTER PRESENTATION ABSTRACTS

Journal of Advanced Research in Health Sciences /
Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2022
DOI: 10.26650/JARHS2021-1133817 [PP-014]

EFFECT OF THYMOQUINONE IN COMBINATION WITH NIVOLUMAB ON EXPERIMENTAL RENAL CELL CANCER MODELS

Ahmet DİRİCAN¹, Safiye AKTAŞ², Tekincan AKTAŞ², Aylin EROL², Özde GÖKBAYRAK², Efsun KOLATAN³,
Efe SERİNAN², Zekiye Sultan ALTUN², Işıl SOMALI⁴, Osman YILMAZ³

¹Izmir Economy University, Medical Park Hospital, Department of Medical Oncology, Izmir, Türkiye

²Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, Department of Basic Oncology, Izmir, Türkiye

³Dokuz Eylül University, Department of Experimental Animal Sciences, Izmir, Türkiye

⁴Dokuz Eylül University, Institute of Oncology, Department of Clinical Oncology, Izmir, Türkiye

ABSTRACT

Objectives: Thymoquinone a bioactive component extracted from the seeds of *Nigella sativa*, has been proved to have antiinflammatory, antioxidant properties anti antitumor efficiency against breast, prostate, bladder, and renal cell cancer. We aimed to investigate the synergistic cytotoxic and apoptotic effects of thymoquinone in combination with nivolumab, an immuno-control inhibitor, and its mechanism in renal cell cancer models.

Materials and Methods: In vitro studies: Caki-1 and Renca renal cancer cell lines with mononuclear cells were cocultured and thymoquinone and nivolumab effect were analyzed by MTT and Annexin V + PI. In vivo studies: Renal cell cancer model was provided by subcutaneous injection of RENCA cells to C57BL/6, male, 8 weeks old mice in four groups. Control group, thymoquinone (1,4,7,14days,20mg/kgIP), nivolumab administered (1,6,13days10mg/kgIP), thymoquinone and nivolumab. Seven animals was randomized in each experimental group. Apoptosis, necrosis, CD4,CD8,C20,CD34,CD31,VEGF-A by immunohistochemistry, FGFR-1,PDGFRbeta,VEGFR-2,c-kit,RET,c-Met,AXL,Flt-3,TIE2, ICAM-1,VCAM-1 and E-selectin mRNA levels by quantitative real-time-PCR were evaluated on tumor tissue. Liver, kidney, brain, lung and heart tissues was evaluated for side effects. Plasma biochemistry tests were performed. Statistical analysis was performed with Mann-Whitney U test with p <0.05 value.

Results: Thymoquinone showed antitumor effect in vitro and in vivo. It also showed increase in immune cell death of nivolumab. Tumor tissue showed prominent necrosis or complete response to therapy in combination group.

Conclusions: We conclude that thymoquinone has antitumor effect on renal cell carcinoma and increases the effect of nivolumab immune, cell death effects. Besides, it does not have side effect on other organs whether alone or in combination.

Keywords: Renal Cell Cancer, Thymoquinone, Immune Check Point Inhibitors



This work is licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License

ÖZGEÇMİŞ



AHMET DİRİCAN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi
Telefon

E-posta
İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

11 Mart 2009 - 11 Mart 2013 (4 yıl 1 ay)
DİĞER (İzmir Katip Çelebi Üniversitesi), TÜRKİYE
DİĞER, DİĞER
Eğitim Alt Alanı: ONKOLOJİ
Diploma Numarası: 103703

05 Aralık 2004 - 05 Aralık 2008 (4 yıl 1 ay)
DİĞER (Ege Üniversitesi), TÜRKİYE
DİĞER, DİĞER
Eğitim Alt Alanı: İÇ HASTALIKLARI
Diploma Numarası: 78113

01 Haziran 1995 - 17 Haziran 2001 (6 yıl 1 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
TIP FAKÜLTESİ, TIP PR.
Diploma Numarası: 106657

Deneyim / İşyeri Bilgileri

06 Eylül 2022 - Şu Anda (9 ay) (Tam Zamanlı)
PROF. DR., İZMİR EKONOMİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DAHİLİ TIP BİLİMLERİ
BÖLÜMÜ İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

01 Haziran 2016 - Şu Anda (7 yıl) (Tam Zamanlı)
DOÇ. DR., DOÇ. DR., MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DAHİLİ
TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI TIBBİ ONKOLOJİ BİLİM
DALI

05 Kasım 2015 - Şu Anda (7 yıl 7 ay) (Tam Zamanlı)
YRD. DOÇ. DR., MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DAHİLİ TIP
BİLİMLERİ BÖLÜMÜ İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

01 Ocak 2013 - Şu Anda (10 yıl 5 ay) (Tam Zamanlı)
İDARİ PERSONEL, DR., DİĞER (Isparta Devlet Hastanesi)

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Sayfa 1 / 8

A. ALACACIOĞLU, A. DİRİCAN, Y. KÜÇÜKZEYBEK & I. SOMALI, cancer: otip, Kitapta Bölüm.

E. OKTAY, G. D. YALÇIN, S. EKMEKÇİ, D. S. KAHRAMAN, A. YALÇIN, M. DEĞİRMENCİ, A. DİRİCAN, Z. ALTIN, Ö. ÖZDEMİR, Z. G. SÜRMELE, A. G. DİNİZ ÜNLÜ, S. AYHAN, G. BULUT, A. P. ERDOĞAN & R. USLU, Programmed cell death ligand-1 expression in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors, Journal of BUON, 2019, 1107-0625, 24, 2, 779-790.

U. IŞIK, O. KOSTEK, A. G. DEMİRAY, A. DİRİCAN, M. ŞİMŞEK, M. BÜYÜKŞİMŞEK, G. UÇAR, U. M. GÜNAYDIN, T. SAKALAR, A. ALİYEV, A. DEMİR, S. TURHAL, K. N. PİLANCI, U. KEFELİ, A. GÖKYER, S. PAYDAŞ, D. UNCU, İ. N. OKTEN, K. UYGUN & D. ÇABUK, Real life data from Turkey regarding the impact of first-line sunitinib and pazopanib in metastatic renal cell cancer., JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY, 2019, 0732-183X, 37, 16075-16075.

A. YOLCU, A. DİRİCAN, G. GÖKSEL ÖZTÜRK, Ç. B. ÇETİN & İ. AYDOĞDU, A RARE PARASITIC INFECTION VISCERAL LEISHMANIASIS CASE AFTER GASTRIC CANCER TREATMENT, memo - Magazine of European Medical Oncology, 2018, 1865-5041, 11, 4, 345-347.

N. DİRİCAN, A. DİRİCAN, C. ANAR, Ş. ATALAY, Ö. ÖZTÜRK, H. A. BİRCAN, A. AKKAYA & M. ÇAKIR, A New Inflammatory Prognostic Index, Based on C-reactive Protein, the Neutrophil to Lymphocyte Ratio and Serum Albumin is Useful for Predicting Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cases, Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2017, 1513-7368, 17, 12, 6001-6006.

N. DİRİCAN, A. DİRİCAN, C. ANAR, Ş. ATALAY, Ö. ÖZTÜRK, H. A. BİRCAN, A. AKKAYA & M. ÇAKIR, A new inflammatory prognostic index, based on C-reactive protein, the neutrophil to protein ratio, and serum albumin is useful for predicting prognosis in non-small cell lung cancer cases., Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2017, 3539200.

N. DİRİCAN, Y. ARMAN KARAKAYA, S. GÜNEŞ, F. T. DALOĞLU & A. DİRİCAN, Association of intra-tumoral tumour-infiltrating lymphocytes and neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent prognostic factor in non-small cell lung cancer, The Clinical Respiratory Journal, 2017, 17526981, 11, 6, 789-796.

N. DİRİCAN, Ö. BAĞCI, E. UZ, Ö. ÖZTÜRK, H. A. BİRCAN & A. DİRİCAN, Evaluation of Heterozygous Deletion of TP53 Gene in Pleural Fluid Samples A Case Series of 11 Patients, Journal of Clinical and Analytical Medicine, 2016, 13090720, 7, Suppl 2.

N. DİRİCAN, A. DİRİCAN, O. SEN, A. AYSE, A. SULE, H. A. BİRCAN, Ö. ÖZTÜRK, E. SERPİL & C. MUNİRE, Thiol disulfide homeostasis A prognostic biomarker for patients with advanced non small cell lung cancer, REDOX REPORT, 2016, 1351-0002, 21, 5, 197-203.

A. DİRİCAN, O. ŞAHİN, F. TAŞLI, E. SÖĞÜT, Y. KÜÇÜKZEYBEK, A. ALACACIOĞLU, M. GÜNEŞ, G. SAĞLAM, E. COBAN, M. O. TARHAN & B. DEMİRCİ, Thymoquinone enhances cisplatin induced nephrotoxicity in high dose, Journal of Oncological Science, 2016, 24523364, 1, 17-24.

Y. KÜÇÜKZEYBEK, A. DİRİCAN, L. DEMİR, Y. SERKAN, A. MURAT, Y. YASAR, B. I. VEDAT, A. AHMET, V. UMUT, S. TARİK, İ. YILDIZ, C. HUSEYİN & M. O. TARHAN, Adjuvant Chemotherapy and Prognostic Factors in Stage II Colon Cancer İzmir Oncology Group Study, ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION, 2015,

1513-7368, 16, 6, 2413-2418.

B. VEDAT, İ. YILDIZ, V. UMUT, C. SUNA, Y. KÜÇÜKZEYBEK, A. AHMET, L. DEMİR, A. DİRİCAN, A. MURAT, Y. YILDIZ & M. O. TARHAN, Comparison of first line bevacizumab in combination with mFOLFOX6 or XELOX in metastatic colorectal cancer, *JOURNAL OF BUON*, 2015, 1107-0625.

A. DİRİCAN, K. B. BOLAT, A. AHMET, Y. KÜÇÜKZEYBEK, E. CİGDEM, V. UMUT, S. İSİL, L. DEMİR, B. İ. VEDAT, Y. YASAR, A. MURAT, K. BETUL, C. EYUP, U. EDA, U. F. ÇAKALAGAĞLU & M. O. TARHAN, Do the derived neutrophil to lymphocyte ratio and the neutrophil to lymphocyte ratio predict prognosis in breast cancer, *INTERNATIONAL JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, 2015, 1341-9625, 20, 1, 70-81.

A. MURAT, Y. KÜÇÜKZEYBEK, V. UMUT, İ. YILDIZ, Ç. SUNA, B. İ. VEDAT, Y. YILDIZ, L. DEMİR, A. DİRİCAN & M. O. TARHAN, First line cisplatin plus bolus 5 Fluorouracil combination in patients with locally advanced and metastatic esophageal cancer Izmir Oncology Group Study, *Acta Oncologica Turcica*, 2015, 0304-596X, 48, 1, 20-26.

A. DİRİCAN, H. ATMACA İLHAN, B. EMİR, E. CİGDEM, Ş. B. KARACA & R. USLU, Novel combination of docetaxel and thymoquinone induces synergistic cytotoxicity and apoptosis in DU 145 human prostate cancer cells by modulating PI3K AKT pathway, *Clinical and Translational Oncology*, 2015, 1699-048X, 17, 2, 145-151.

B. İ. V. İ. YILDIZ, V. UMUT, C. SUNA, A. ALACACIOĞLU, Y. KÜÇÜKZEYBEK, A. MURAT, L. DEMİR, A. DİRİCAN & M. O. TARHAN, Original paper Uracil tegafur as a possible salvage therapy in chemo refractory colorectal cancer patients a single institutional retrospective study, *Współczesna Onkologia*, 2015, 1428-2526.

B. İ. VEDAT, K. B. BOLAT, Y. KÜÇÜKZEYBEK, V. UMUT, İ. YILDIZ, A. AHMET, A. MURAT, L. DEMİR, A. DİRİCAN, Y. YASAR, S. TARIK & M. O. TARHAN, Prognostic value of mesothelin expression in patients with triple negative and HER2 positive breast cancers, *BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY*, 2015, 0753-3322, 70, 190-195.

A. MURAT, U. EDA, A. AHMET, Y. KÜÇÜKZEYBEK, B. VEDAT, Y. YILDIZ, İ. YILDIZ, S. TARIK, V. UMUT, L. DEMİR, A. DİRİCAN, G. ZEKİ & M. O. TARHAN, Quality of life in colorectal cancer patients an Izmir Oncology Group IZOG study, *JOURNAL OF BUON*, 2015, 1107-0625.

N. SOYER, Y. FERGUN, A. SOHRET, T. MURAT, A. DİRİCAN & Ç. SEÇKİN, Risk factors for febrile neutropenic attacks in patients who were given chemotherapy treatment for hematological malignancies, *Ege Journal of Medicine*, 2015, 0000-0000.

A. MURAT, L. DEMİR, A. AHMET, E. HULYA, K. YUKSEL, Y. YASAR, G. ZEHRA, B. VEDAT, Y. İBRAHİM, S. TARIK, V. UMUT, K. BETUL, L. DEMİR, A. DİRİCAN, S. RECEP & M. O. TARHAN, The Effects of Adjuvant Endocrine Treatment on Serum Leptin Serum Adiponectin and Body Composition in Patients with Breast Cancer The Izmir Oncology Group IZOG Study, *CHEMOTHERAPY*, 2015, 0009-3157, 61, 2, 57-64.

A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, F. LEVENT, F. LEVENT, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, U. VAROL, U. VAROL, U. KOCABAS, U. KOCABAS, O. SENÖZ, O. SENÖZ, S. V. EMREN, S. V. EMREN, L. DEMİR, L. DEMİR, E. COBAN, E. COBAN, S. AKSUN, S. AKSUN, R. SUTCU, R. SUTCU, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, Acute Cardiotoxic Effects of Adjuvant Trastuzumab Treatment and Its Relation to Oxidative Stress, *INTERNATIONAL JOURNAL OF OFFENDER THERAPY AND COMPARATIVE CRIMINOLOGY*, 2014, 0306-624X, 65, 10, 944-949.

S. ÇOKMERT, L. DEMİR, A. CAN, M. AKYOL, İ. V. BAYOĞLU, A. DİRİCAN, Y. KÜÇÜKZEYBEK, Ç. ERTEN & M. O. TARHAN, Capecitabine related increased mean corpuscular volume of redblood cell may be a predictive marker of treatment response and survival in patients with metastatic colorectal cancer, *JOURNAL OF BUON*, 2014, 1107-0625, 19, 1, 75-82.

A. DİRİCAN, Ç. ERTEN, H. ATMACA İLHAN, E. BOZKURT, Y. KÜÇÜKZEYBEK, U. VAROL, M. O. TARHAN, Ş. B. KARACA & R. USLU, Enhanced cytotoxicity and apoptosis by thymoquinone in combination with zoledronic acid in hormone and drug resistant prostate cancer cell lines, *JBUON*, 2014, 1107-0625.

U. VAROL, U. VAROL, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, İ. YILDIZ, İ. YILDIZ, E. OKTAY, E. OKTAY, M. DEGİRMENCİ, M. DEGİRMENCİ, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, S. BARUTCA, S. BARUTCA, B. KARABULUT, B. KARABULUT, R. USLU & R. USLU, First-Line Mono-Chemotherapy in Frail Elderly Patients with Metastatic Colorectal Cancer, *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION*, 2014, 1513-7368, 15, 7, 3157-3161.

A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, U. VAROL, U. VAROL, S. AKSUN, S. AKSUN, İ. V. BAYOĞLU, İ. V. BAYOĞLU, L. DEMİR, L. DEMİR, E. COBAN, E. COBAN, R. SUTCU, R. SUTCU, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, Impact of pre-angiogenic factors on the treatment effect of bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer, *MEDICAL ONCOLOGY*, 2014, 1357-0560, 31, 4.

M. AKYOL, U. VAROL, İ. YILDIZ, İ. V. BAYOĞLU, Y. YILDIZ, L. DEMİR, A. DİRİCAN, A. CAN, S. ÇOKMERT, M. T. ÖZTOP, A. ALACACIOĞLU, Y. KÜÇÜKZEYBEK & M. O. TARHAN, Isolated Liver Metastasis of Sacrococcygeal Chordoma Case Report and Review of the Literature, *Case Reports in Oncological Medicine*, 2014, 2090-6706, 2014, 1-3.

A. DİRİCAN, Y. KÜÇÜKZEYBEK, Ç. ERTEN, İ. SOMALI, A. CAN, İ. V. BAYOĞLU, M. AKYOL, A. Ö. ÇALLI, A. ALACACIOĞLU & M. O. TARHAN, Letter to Editor Cardiac rhabdomyosarcoma of the left atrium, *WSPOLCZESNA ONKOLOGIA-CONTEMPORARY ONCOLOGY*, 2014, 1428-2526, 1, 73-75.

M. AKYOL, L. DEMİR, A. DİRİCAN, N. EKİNCİ, A. CAN, İ. V. BAYOĞLU, A. ALACACIOĞLU, Y. KÜÇÜKZEYBEK, S. ÇOKMERT, Ç. ERTEN, F. ÇAKALAĞAOĞLU & M. O. TARHAN, Letter to Editor Skin and maxillary sinus involvement of colon cancer, *WSPOLCZESNA ONKOLOGIA-CONTEMPORARY ONCOLOGY*, 2014, 1428-2526, 1, 70-72.

L. DEMİR, L. DEMİR, M. AKYOL, M. AKYOL, S. BENER, S. BENER, K. B. PAYZİN, K. B. PAYZİN, C. ERTEN, C. ERTEN, İ. SOMALI, İ. SOMALI, A. CAN, A. CAN, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, V. BAYOĞLU, V. BAYOĞLU, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, A. O. CALLI, A. O. CALLI, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, Prognostic Evaluation of Breast Cancer Patients with Evident Bone Marrow Metastasis, *BREAST JOURNAL*, 2014, 1075-122X, 20, 3, 279-287.

İ. V. BAYOĞLU, İ. V. BAYOĞLU, U. VAROL, U. VAROL, İ. YILDIZ, İ. YILDIZ, U. MUSLU, U. MUSLU, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, M. AKYOL, M. AKYOL, L. DEMİR, L. DEMİR, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, S. ÇOKMERT, S. ÇOKMERT, Y. YILDIZ, Y. YILDIZ, B. KARABULUT, B. KARABULUT, R. USLU, R. USLU, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, Second-Line Capecitabine and Oxaliplatin Combination for Gemcitabine-Resistant Advanced Pancreatic Cancer, *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION*, 2014, 1513-7368, 15, 17, 7119-7123.

A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, E. ULGER, E. ULGER, U. VAROL, U. VAROL, T. YAVUZSEN, T. YAVUZSEN, M. AKYOL, M. AKYOL, Y. YILDIZ, Y. YILDIZ, İ. YILDIZ, İ. YILDIZ, V. BAYOĞLU, V. BAYOĞLU, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, L. DEMİR, L. DEMİR, T. SALMAN, T. SALMAN, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, İ. ALACACIOĞLU, İ. ALACACIOĞLU, H. CAN, H. CAN, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, Sexual

satisfaction, anxiety, depression and quality of life in testicular cancer survivors, *MEDICAL ONCOLOGY*, 2014, 1357-0560, 31, 7.

L. DEMİR, L. DEMİR, N. EKİNCİ, N. EKİNCİ, C. ERTEN, C. ERTEN, I. SOMALİ, I. SOMALİ, A. CAN, A. CAN, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, S. COKMERT, S. COKMERT, V. BAYOĞLU, V. BAYOĞLU, M. AKYOL, M. AKYOL, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, The impact of cell proliferation markers and p53 mutation status on prognosis of non-metastatic colon cancer, *JOURNAL OF SURGICAL ONCOLOGY*, 2014, 0022-4790, 109, 7, 665-675.

B. B. KÜÇÜKZEYBEK, A. Ö. ÇALLI, Y. KÜÇÜKZEYBEK, S. BENER, Y. DERE, A. DİRİCAN, K. B. PAYZIN, F. ÖZDEMİRKIRAN & M. O. TARHAN, The prognostic significance of bone marrow metastases Evaluation of 58 cases, *INDIAN JOURNAL OF PATHOLOGY AND MICROBIOLOGY*, 2014, 0377-4929, 57, 3, 396-399.

A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, U. VAROL, U. VAROL, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, C. ERTEN, C. ERTEN, I. SOMALİ, I. SOMALİ, A. CAN, A. CAN, L. DEMİR, L. DEMİR, İ. V. BAYOĞLU, İ. V. BAYOĞLU, M. AKYOL, M. AKYOL, Y. YILDIZ, Y. YILDIZ, B. KOYUNCU, B. KOYUNCU, E. COBAN, E. COBAN, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, Treatment of Metastatic Colorectal Cancer With or Without Bevacizumab: Can the Neutrophil/Lymphocyte Ratio Predict the Efficiency of Bevacizumab?, *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION*, 2014, 1513-7368, 15, 12, 4781-4786.

C. ERTEN, C. ERTEN, L. DEMİR, L. DEMİR, I. SOMALİ, I. SOMALİ, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, M. AKYOL, M. AKYOL, A. CAN, A. CAN, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, V. BAYOĞLU, V. BAYOĞLU, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, Cisplatin Plus Gemcitabine for Treatment of Breast Cancer Patients with Brain Metastases; a Preferential Option for Triple Negative Patients?, *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION*, 2013, 1513-7368, 14, 6, 3711-3717.

A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, O. TARHAN, O. TARHAN, I. ALACACIOĞLU, I. ALACACIOĞLU, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, U. YILMAZ & U. YILMAZ, Depression and anxiety in cancer patients and their relatives, *JOURNAL OF BUON*, 2013, 1107-0625, 18, 3, 767-774.

L. DEMİR, L. DEMİR, N. EKİNCİ, N. EKİNCİ, C. ERTEN, C. ERTEN, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, I. SOMALİ, I. SOMALİ, A. CAN, A. CAN, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, V. BAYOĞLU, V. BAYOĞLU, M. AKYOL, M. AKYOL, F. ÇAKALAGAOĞLU, F. ÇAKALAGAOĞLU, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, Does Immunohistochemistry Provide Additional Prognostic Data in Gastrointestinal Stromal Tumors?, *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION*, 2013, 1513-7368, 14, 8, 4751-4758.

L. DEMİR, L. DEMİR, A. CAN, A. CAN, R. OZTOP, R. OZTOP, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, V. BAYOĞLU, V. BAYOĞLU, M. AKYOL, M. AKYOL, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, C. ERTEN, C. ERTEN, I. SOMALİ, I. SOMALİ, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, Malignant epithelioid hemangioendothelioma progressing after chemotherapy and Interferon treatment: A case presentation and a brief review of the literature, *JOURNAL OF CANCER RESEARCH AND THERAPEUTICS*, 2013, 0973-1482, 9, 1, 125-127.

A. DİRİCAN, Y. KÜÇÜKZEYBEK, M. O. TARHAN, I. SOMALİ, Ç. ERTEN, L. DEMİR, A. CAN, İ. V. BAYOĞLU, M. AKYOL, N. EKİNCİ, M. MEDENİ, B. KOYUNCU & A. ALACACIOĞLU, One day DCF regimen in patients with metastatic gastric cancer, *TUMORI*, 2013, 0300-8916, 99, 145-148.

A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, M. O. TARHAN, M. O. TARHAN, I. SOMALİ, I. SOMALİ, C. ERTEN, C. ERTEN, L. DEMİR, L. DEMİR, A. CAN, A. CAN, İ. V. BAYOĞLU, İ. V. BAYOĞLU, M. AKYOL, M. AKYOL, N. EKİNCİ, N. EKİNCİ, M.

MEDENİ, M. MEDENİ, B. KOYUNCU, B. KOYUNCU, A. ALACACIOĞLU & A. ALACACIOĞLU, One-day DCF regimen in patients with metastatic gastric cancer, *TUMORI*, 2013, 0300-8916, 99, 2, 145-148.

L. DEMİR, L. DEMİR, S. YİĞİT, S. YİĞİT, H. ELLİDOKUZ, H. ELLİDOKUZ, C. ERTEN, C. ERTEN, İ. SOMALİ, İ. SOMALİ, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, S. ÇOKMERT, S. ÇOKMERT, A. CAN, A. CAN, M. AKYOL, M. AKYOL, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, V. BAYOĞLU, V. BAYOĞLU, A. A. SARI, A. A. SARI, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, Predictive and prognostic factors in locally advanced breast cancer: effect of intratumoral FOXP3+ Tregs, *CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS*, 2013, 0262-0898, 30, 8, 1047-1062.

M. O. TARHAN, M. O. TARHAN, A. GONEL, A. GONEL, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, C. ERTEN, C. ERTEN, S. CUHADAR, S. CUHADAR, S. C. YİĞİT, S. C. YİĞİT, A. ATAY, A. ATAY, İ. SOMALİ, İ. SOMALİ, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, L. DEMİR, L. DEMİR, M. KOSEOĞLU & M. KOSEOĞLU, Prognostic Significance of Circulating Tumor Cells and Serum CA15-3 Levels in Metastatic Breast Cancer, Single Center Experience, Preliminary Results, *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION*, 2013, 1513-7368, 14, 3, 1725-1729.

A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, C. ERTEN, C. ERTEN, İ. SOMALİ, İ. SOMALİ, L. DEMİR, L. DEMİR, A. CAN, A. CAN, K. B. PAYZİN, K. B. PAYZİN, İ. V. BAYOĞLU, İ. V. BAYOĞLU, M. AKYOL, M. AKYOL, Y. YİLDİZ, Y. YİLDİZ, M. KOSEOĞLU, M. KOSEOĞLU, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, Prognostic and Predictive Value of Hematologic Parameters in Patients with Metastatic Renal Cell Carcinoma: Second Line Sunitinib Treatment Following IFN- α , *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION*, 2013, 1513-7368, 14, 3, 2101-2105.

S. ÇOKMERT, L. DEMİR, A. A. SARI, Y. KÜÇÜKZEYBEK, A. CAN, M. AKYOL, İ. V. BAYOĞLU, A. DİRİCAN, Ç. ERTEN & M. O. TARHAN, Synchronous Appearance of a High Grade Neuroendocrine Carcinoma of the Ampulla Vater and Sigmoid Colon Adenocarcinoma, *Case Reports in Oncological Medicine*, 2013, 2090-6706, 2013, 1-4.

A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, İ. SOMALİ, İ. SOMALİ, C. ERTEN, C. ERTEN, L. DEMİR, L. DEMİR, A. CAN, A. CAN, K. B. PAYZİN, K. B. PAYZİN, İ. V. BAYOĞLU, İ. V. BAYOĞLU, M. AKYOL, M. AKYOL, M. KOSEOĞLU, M. KOSEOĞLU, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, The association of hematologic parameters on the prognosis of patients with metastatic renal cell carcinoma, *JOURNAL OF BUON*, 2013, 1107-0625, 18, 2, 413-419.

M. O. TARHAN, M. O. TARHAN, L. DEMİR, L. DEMİR, İ. SOMALİ, İ. SOMALİ, S. YİĞİT, S. YİĞİT, C. ERTEN, C. ERTEN, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, H. ELLİDOKUZ, H. ELLİDOKUZ, O. SESEOGULLARI, O. SESEOGULLARI, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, A. CAN, A. CAN, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, V. BAYOĞLU, V. BAYOĞLU, M. AKYOL & M. AKYOL, The clinicopathological evaluation of the breast cancer patients with brain metastases: predictors of survival, *CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS*, 2013, 0262-0898, 30, 2, 201-213.

S. CUHADAR, S. CUHADAR, M. KOSEOĞLU, M. KOSEOĞLU, A. ATAY, A. ATAY, A. DİRİCAN & A. DİRİCAN, The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples, *BIOCHEMIA MEDICA*, 2013, 1330-0962, 23, 1, 70-77.

A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, N. EKİNCİ, N. EKİNCİ, A. AVCI, A. AVCI, M. AKYOL, M. AKYOL, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, İ. SOMALİ, İ. SOMALİ, C. ERTEN, C. ERTEN, L. DEMİR, L. DEMİR, A. CAN, A. CAN, İ. V. BAYOĞLU, İ. V. BAYOĞLU, B. KOYUNCU, B. KOYUNCU, E. ULGER, E. ULGER, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, The effects of hematological parameters and tumor-infiltrating lymphocytes on prognosis in patients with gastric cancer, *CANCER BIOMARKERS*, 2013, 1574-0153, 13, 1, 11-20.

S. KALEMCİ, S. KALEMCİ, N. DİRİCAN, N. DİRİCAN, E. S. CETİN, E. S. CETİN, H. SOZEN, H. SOZEN, A. G. UNER, A. G. UNER, A. YAYLALI, A. YAYLALI, S. AKSUN, S. AKSUN, V. KARACAM, V. KARACAM, E. ULGER, E. ULGER, R. SUTCU, R. SUTCU, A. DİRİCAN & A. DİRİCAN, The efficacy of minocycline against methotrexate-induced pulmonary fibrosis in mice, *EUROPEAN REVIEW FOR MEDICAL AND PHARMACOLOGICAL SCIENCES*, 2013, 1128-3602, 17, 24, 3334-3340.

A. CAN, A. CAN, A. ALACACIOĞLU, A. ALACACIOĞLU, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, C. ERTEN, C. ERTEN, S. COKMERT, S. COKMERT, L. DEMİR, L. DEMİR, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, I. V. BAYOĞLU, I. V. BAYOĞLU, M. AKYOL, M. AKYOL, F. ASLAN, F. ASLAN, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, The relationship of insulin resistance and metabolic syndrome with known breast cancer prognostic factors in postmenopausal breast cancer patients, *JOURNAL OF BUON*, 2013, 1107-0625, 18, 4, 845-850.

U. VAROL, E. OKTAY, M. YILDIRIM, Z. G. SÜRMEİ, A. DİRİCAN, N. MEYDAN, Ş. B. KARACA, B. KARABULUT & R. USLU, Tumor characteristics and metastatic sites may predict bevacizumab efficacy in the first line treatment of metastatic colorectal cancer, *Molecular and Clinical Oncology*, 2013, 2049-9450, 2, 166-170.

A. DİRİCAN, Y. KÜÇÜKZEYBEK, I. SOMALI, Ç. ERTEN, L. DEMİR, A. CAN, İ. V. BAYOĞLU, M. ERMETE, A. A. ALTINBOĞA & M. O. TARHAN, Cutaneous and subcutaneous metastases from bladder carcinoma, *Współczesna Onkologia*, 2012, 1428-2526, 16, 5, 451-452.

L. DEMİR, L. DEMİR, C. ERTEN, C. ERTEN, S. C. YİĞİT, S. C. YİĞİT, A. CAN, A. CAN, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, V. BAYOĞLU, V. BAYOĞLU, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, I. SOMALI, I. SOMALI, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, Intramammary lymph node metastasis in a patient with ovarian carcinoma and a brief review of the literature, *WSPOLCZESNA ONKOLOGIA-CONTEMPORARY ONCOLOGY*, 2012, 1428-2526, 16, 2, 108-110.

S. OZKAYA, S. OZKAYA, S. FİNDİK, S. FİNDİK, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, A. G. ATİCİ & A. G. ATİCİ, Long-term survival rates of patients with stage IIIB and IV non-small cell lung cancer treated with cisplatin plus vinorelbine or gemcitabine, *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE*, 2012, 1792-0981, 4, 6, 1035-1038.

L. DEMİR, L. DEMİR, A. CAN, A. CAN, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, V. BAYOĞLU, V. BAYOĞLU, T. A. REZANKO, T. A. REZANKO, M. AKYOL, M. AKYOL, Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, C. ERTEN, C. ERTEN, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, Malignant Fibrous Histiocytoma of the Spermatic Cord in a Patient With Polycystic Kidney Disease; Review of the Literature, *CLINICAL GENITOURINARY CANCER*, 2012, 1558-7673, 10, 4, 280-283.

L. DEMİR, Ç. ERTEN, I. SOMALI, A. CAN, A. DİRİCAN, İ. V. BAYOĞLU, Y. KÜÇÜKZEYBEK, A. A. ALTINBOĞA, M. ERMETE, R. M. ÖZTOP & M. O. TARHAN, Metastases of renal cell carcinoma to the larynx and thyroid Two case reports on metastasis developing years after nephrectomy, *CUAJ-CANADIAN UROLOGICAL ASSOCIATION JOURNAL*, 2012, 1911-6470, 6, 5, 209-212.

A. DİRİCAN, Y. KÜÇÜKZEYBEK, I. SOMALI, Ç. ERTEN, L. DEMİR, A. CAN, İ. V. BAYOĞLU, S. Ç. YİĞİT, F. ÇAKALAĞAOĞLU, H. YETİMALAR & M. O. TARHAN, Micro metastases into the uterine leiomyoma from invasive ductal breast cancer under adjuvant tamoxifen therapy case report, *EUROPEAN JOURNAL OF GYNAECOLOGICAL ONCOLOGY*, 2012, 0392-2936, 33, 6, 652-655.

Y. KUCUKZEYBEK, Y. KUCUKZEYBEK, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, C. ERTEN, C. ERTEN, I. SOMALI, I. SOMALI, A. CAN, A. CAN, L. DEMİR, L. DEMİR, İ. V. BAYOĞLU, İ. V. BAYOĞLU, M. AKYOL, M. AKYOL, M. MEDENİ, M. MEDENİ, M. O. TARHAN & M. O. TARHAN, Second-Line Irinotecan after Cisplatin, Fluoropyrimidin and Docetaxel for Chemotherapy of Metastatic Gastric Cancer, *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION*, 2012, 1513-7368, 13, 6, 2771-2774.

S. CUHADAR, S. CUHADAR, A. ATAY, A. ATAY, M. KOSEOGLU, M. KOSEOGLU, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, A. HUR & A. HUR, Stability studies of common biochemical analytes in serum separator tubes with or without gel barrier subjected to various storage conditions, *BIOCHEMIA MEDICA*, 2012, 1330-0962, 22, 2, 202-214.

S. YİĞİT, S. YİĞİT, L. DEMİR, L. DEMİR, M. O. TARHAN, M. O. TARHAN, F. K. CABUK, F. K. CABUK, H. ELLİDOKUZ, H. ELLİDOKUZ, C. ERTEN, C. ERTEN, İ. SOMALİ, İ. SOMALİ, A. DİRİCAN, A. DİRİCAN, F. CAKALAGAOGLU & F. CAKALAGAOGLU, The clinicopathological significance of Bax and Bcl-2 protein expression with tumor infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma, *NEOPLASMA*, 2012, 0028-2685, 59, 5, 475-485.

H. ECE, H. ECE, E. CİGDEM, E. CİGDEM, K. YUKSEL, K. YUKSEL, D. AHMET, D. AHMET, E. HAKAN, E. HAKAN, T. M. OKTAY & T. M. OKTAY, Use of Oral Antidiabetic Drugs (Metformin and Pioglitazone) in Diabetic Patients with Breast Cancer: How Does It Effect on Serum Hif-1 Alpha and 8Ohdg Levels?, *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION*, 2012, 1513-7368, 13, 10, 5143-5148.

L. DEMİR, İ. SOMALİ, M. O. TARHAN, Ç. ERTEN, H. ELLİDOKUZ, A. CAN, A. DİRİCAN & İ. V. BAYOĞLU, The toxicity and efficacy of Nordic FLOX regimen as adjuvant treatment of stage III colon cancer, *JOURNAL OF BUON*, 2011, 1107-0625, 16, 682-688.

H. ÇATUK (Tez Yazarı) , A. DİRİCAN (Tez Danışmanı) , Prostat kanseri hücre hatlarında (PC-3-DU-145) dosetaksel ve acorus calamus ekstraktı uygulamasının sitotoksik ve apoptotik etkileri, 2019.

Yönetilen Tezler

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0