

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HÜCRE
HATTINDA KUERSETİN VE BEVACİZUMAB'IN
KOMBİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nesrin ÇETİNEL ŞENTÜRK

**TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Davut ALPTEKİN**

ADANA-2022

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİ HÜCRE
HATTINDA KUERSETİN VE BEVACİZUMAB'IN
KOMBİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nesrin ÇETİNEL ŞENTÜRK

**TIBBİ BİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Davut ALPTEKİN**

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TDK-2020-12902 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:.....
ADANA-2022

KABUL ve ONAY

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan

“Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hattında Kuersetin ve Bevacizumab’ın Kombine Etkisinin Araştırılması” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Davut ALPTEKİN
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Hüsnü Ümit LÜLEYAP
Çukurova Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Aykut PELİT
Çukurova Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Mustafa Ertan AY
Mersin Üniversitesi
Üye

Doç. Dr. Dilek GÖKTÜRK
Adana Alparslan Türkeş Bilim ve
Teknoloji Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana yol gösteren, çalışmamın her aşamasında beni destekleyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Davut ALPTEKİN'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Doktora eğitimime katkıda bulunan Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Prof. Dr. H. Ümit Lüleyap, Prof. Dr. Osman Demirhan, Prof. Dr. Ayfer Pazarbaşı ve Prof. Dr. M. Bertan Yılmaz'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar çalışmalarım ile tez yazımda her türlü desteklerinden ve içten yardımlarından dolayı Gülşah EVYAPAN ve İbrahim Seyfettin ÇELİK'e özellikle teşekkürlerimi sunuyorum.

Doktora programı süresince, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı dahilinde maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak bu günlere gelmemde en büyük katkıya sahip olan ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme, sevgisini ve desteğini hep hissettiğim sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması TDK-2020-12902 numaralı proje ile Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanserin Tanımı ve Tarihçesi.....	3
2.1.1. Kanser Oluşum Mekanizmaları.....	4
2.1.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri.....	5
2.1.2.1. Sınırsız çoğalma potansiyeli.....	6
2.1.2.2. Hücre ölümüne direnç.....	7
2.1.2.3. Büyüme Baskılayıcılarından Kaçış.....	8
2.1.2.4. Proliferatif Sinyali Sürdürme.....	9
2.1.2.5. Anjiyogenezi İndükleme.....	9
2.1.2.6. Doku İnvazyonu ve Metastaz Yeteneği.....	10
2.1.2.7. Enerji Metabolizmasını Yeniden Düzenleme.....	12
2.1.2.8. Genomik instabilite ve Mutasyon.....	12
2.1.2.9. İmmün Yanıttan Kaçış.....	13
2.1.2.10. Tümör Oluşumuna Katkıda Bulunan İnflamasyon.....	14
2.2. Akciğer Kanseri.....	15
2.2.1. Akciğer Kanserinin Epidemiyoloji ve Etiyolojisi.....	15
2.2.2. Akciğer Kanserinde Evreleme.....	17
2.3. PI3K (Fosfoinositid 3-Kinaz) Sinyal Yolağı.....	19
2.4. Anjiyogenez Mekanizması.....	20
2.5. Anjiyogenezde VEGF ve VEGFR.....	21
2.6. Kanserde VEGF/VEGFR Yolağının Anjiyogenik Olmayan Etkileri.....	23
2.7. VEGF aracılı PI3K/Akt Yolağı Aktivasyonu.....	24
2.8. PI3K Sinyal Yolağı Aracılı Apoptozis.....	25
2.9. Bevacizumab.....	26

2.10. Flavonoidler	27
2.10.1. Kuersetin	27
2.11. Kanser Tedavisinde Kombine İlaç Uygulamaları	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Araç ve Gereçler	31
3.1.1. Kimyasal Malzemeler	31
3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler	32
3.2. Yöntemler.....	32
3.2.1. Hücre Hatlarının Hazırlanması ve Kültürü	32
3.2.2. Hücre Canlılık Testi: MTT	34
3.2.3. Kombinasyon İndeksinin (Combination Index-CI) Hesaplanması	35
3.2.4. Hücre Canlılık Testi: Kristal Viyole Boyama.....	36
3.2.5. Yara İyileşme Deneyi (Scratch/Wound Healing Assay).....	36
3.2.6. Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	37
3.2.6.1. Trizol ile RNA İzolasyonu	37
3.2.6.2. RNA'dan cDNA Eldesi	38
3.2.6.3. Real-Time PCR aşaması.....	39
3.2.6.4. Real Time RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi	40
3.2.7. ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) Deneyi.....	40
3.2.7.1. Protein İzolasyonu	40
3.2.7.2. Protein Miktarının Ölçümü.....	41
3.2.7.3. ELISA Plakaların Hazırlanması ve Absorbans Ölçümü	42
3.3. İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	68
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>		<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1.	Çok aşamalı karsinogenez	4
Şekil 2.	Kanser hücrelerinin özellikleri	6
Şekil 3.	Metastaz Kaskadı.....	11
Şekil 4.	2020 yılına ait kadın ve erkeklerde kansere bağlı ölüm oranları	15
Şekil 5.	VEGF reseptör ve ligandları.....	22
Şekil 6.	Kanser hücrelerinde VEGF-VEGFR-2 etkileşiminin anjiyogenik olmayan etkileri	24
Şekil 7.	VEGF sinyal yolağı	25
Şekil 8.	Bevacizumab'ın etki mekanizması.....	26
Şekil 9.	Kuersetinin kimyasal yapısı.....	28
Şekil 10.	Çalışmamızda kullanılan hücre hatları ve temel özellikleri.....	33
Şekil 11.	KHDAK ve BEAS-2B hücre hatlarının Kuersetin ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda MTT yöntemiyle belirlenen hücre canlılık oranları.	46
Şekil 12.	KHDAK ve BEAS-2B hücre hatlarının Bevacizumab ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda MTT yöntemiyle belirlenen hücre canlılık oranları.	47
Şekil 13.	KHDAK ve BEAS-2B hücre hatlarının Kuersetin ve Bevacizumab kombinasyonu ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda MTT yöntemiyle belirlenen hücre canlılık oranları.	48
Şekil 14.	KHDAK ve BEAS-2B hücre hatlarının Kuersetin ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonunda kristal viyole yöntemiyle belirlenen hücre canlılık oranları.	49
Şekil 15.	KHDAK ve BEAS-2B hücre hatlarının Bevacizumab ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonunda kristal viyole yöntemiyle belirlenen hücre canlılık oranları.	50
Şekil 16.	KHDAK ve BEAS-2B hücre hatlarının Kuersetin ve Bevacizumab kombinasyonu ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonunda kristal viyole yöntemiyle belirlenen hücre canlılık oranları. ..	51
Şekil 17.	A549 hücre hattında Kuersetinin doz ve zamana bağlı olarak hücre göçü üzerine etkisi	53
Şekil 18.	A549, H1299 ve BEAS-2B hücrelerinde Kuersetin, Bevacizumab ve kombinasyonlarının hücre göçüne etkisi.....	54
Şekil 19.	VEGFA, VEGFR2, Casp9, Casp3, Bax, Bcl-2, AKT ve PIK3CA genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri.	56
Şekil 20.	VEGFA, VEGFR2 ve Casp3 genlerinin protein düzeyinde ekspresyon seviyeleri	57

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Çizelge 1. Genel TNM Evreleme Tanımlayıcıları	18
Çizelge 2. Çalışmamızdaki gruplar ve uygulanan dozlar	34
Çizelge 3. cDNA kiti bileşenleri ve kullanılan miktarlar.....	38
Çizelge 4. Çalışmamızda kullanılan primerler	39
Çizelge 5. Real Time RT-PCR reaksiyonunun bileşenleri ve miktarları	39
Çizelge 6. Real-Time PCR reaksiyonunun aşamaları.....	40
Çizelge 7. RIPA solüsyonu bileşenleri	41
Çizelge 8. Protein ölçümü için standartların hazırlanması	42
Çizelge 9. Protein ölçümü için standartların ve örneklerin 96 kuyucuklu plakalara aktarımı	42

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AKT	: Protein Kinaz B
ATP	: Adenozin 3 Fosfat
Bax	: Bcl-2 ilişkili X Proteini
Bcl-xL	: B-cell lymphoma-extra large protein
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2 protein
°C	: Santigrat Derece
Casp	: Kaspaz
cDNA	: Tamamlayıcı DNA
CD4	: Yüzey Farklılaşma Antijeni 4
CD8	: Yüzey Farklılaşma Antijeni 8
CI	: Kombinasyon indeksi
CTLA	: Sitotoksik T Lenfosit ile İlişkili Protein-4
DISC	: Ölüm Uyarıcı Sinyalleşme Kompleks
DMSO	: Dimetil sülfoksit
EMT	: Epitelyal Mezenkimal Geçiş
ER	: Endoplazmik Retikulum
FBS	: Fetal Sığır Serumu
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDG	: Flor-18 işaretli florodeoksiglukoz
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GLOBOCAN	: Küresel Kanser İnsidansı, Mortalite ve Prevalans
GWAS	: Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
HIF-1α	: Hipoksiya Uyarıcı Faktör-1 α
hTER	: İnsan Telomerazı RNA
hTERT	: Telomeraz Katalitik Alt Ünite Gen
IARC	: Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IC₅₀	: Yarı Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonu
IL-8	: İnterlökin-8
KHAK	: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

MAPK	: Mitojen Aktive Edici Proteinkinaz
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleksi
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
mRNA	: Measajcı Ribonükleik Asit
mTOR	: Memeli Rapamisin Hedefi
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
NNK	: 4-(metilnitrozoamino)-1-(3 piridil)-1-bütanon
OD	: Optik Yoğunluk
p değeri	: Olasılık (probability) Değeri
PAH	: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar
PBS	: Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	: Platelet Türevli Büyüme Faktörü
PDK1	: 3'-fosfoinositide bağımlı kinaz 1
PD-L1	: Programlı Ölüm Ligandı 1
PD-1	: Programlı Ölüm Proteini-1
PET	: Pozitron Emisyon Tomografisi
PH	: Plekstrin Homoloji
PI3K	: Fosfoinositid 3-Kinaz
PIK3CA	: Fosfotidilinositol-4,5-Bisfosfat 3-Kinaz Katalitik Altünite
PGF	: Plasenta Büyüme Faktörü
PIP₂	: Fosfatidilinositol-4,5-Bifosfat
PIP₃	: Fosfatidilinositol-3,4,5-Trifosfata
PTEN	: Fosfataz ve Tensin Homologu
rpm	: Dakikada dönme hızı
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RTK	: Reseptör Tirozin Kinaz
SDS	: Sodyumdodesilsülfat
Std	: Standart
TBS	: Tris Tampon Tuz Çözeltisi
TCR	: T hücre reseptör kompleks
TGF-α	: Transformasyon Büyüme Faktörü-Alfa

TGF-β	: Transformasyon Büyüme Faktörü-Beta
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü-Alfa
TRAIL	: TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü
VEGFR	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü Reseptörü
g	: Gram
ng	: Nanogram
μg	: Mikrogram
ml	: Mililitre
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
Std	: Standart

ÖZET

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hattında Kuersetin ve Bevacizumab'ın Kombine Etkisinin Araştırılması

Akciğer kanseri dünyada insidans ve mortalitesi en yüksek kanser türlerinden olup, metastatik yeteneklerinin yüksek olması, ilaç direnci ve geç tanıdan dolayı çoğunlukla istenen tedavi yanıtları alınamamaktadır. Bu nedenle daha etkin, seçici ve yan etkileri minimize edecek tedavi arayışları artmıştır. Bunlardan bir tanesi de iki ya da daha fazla ilaç ya da terapinin birlikte uygulanması anlamına gelen politerapilerdir. Birçok biyolojik süreçte etkili en yaygın flavonoidlerden olan Kuersetin farklı ajanlarla kombine olarak kullanıldığında, tekli uygulamalarına göre daha etkili sonuçlar verdiği ve kanser hücrelerini yüksek oranda inhibe ettiği gösterilmiştir. Tümör gelişim ve vaskülarizasyonunun inhibisyonunda önemli bir hedef olan VEGF-A, etkinliğini, ilgili VEGFR'ye bağlanarak göstermektedir. Antianjiyogenik monoklonal antikor olan Bevacizumab, VEGF-A'ya bağlanarak VEGFR-2 ile etkileşimini engellemektedir. Çalışmamızda, Kuersetin ve Bevacizumab'ın kombine tedavisinin, küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde sinerjistik etki göstereceğini düşündüğümüzden, MTT, Kristal Viyole, Scratch, Real-Time PCR ve ELISA gibi yöntemlerle hücre canlılığı, göçü, anjiyogenezi ve apoptozis üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Çalışmamız, sinerjistik etki oluşturacağı dozlarda uygulanan Kuersetin ve Bevacizumab kombinasyonunun kanser hücre canlılığı ve göçünü ciddi derecede inhibe ettiğini göstermiştir. Buna ek olarak, bu kombinasyonun VEGF-PI3K/Akt sinyal yolağını baskıladığını ve bu yolla bağlantılı apoptozisi tetikleyebileceğini belirledik.

Anahtar Sözcükler: Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri, Bevacizumab, Kuersetin, VEGF-A, PI3K sinyal yolağı

ABSTRACT

Investigation of Combined Effect of Quercetin and Bevacizumab on Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line

Lung cancer is one of the cancer types with the highest incidence and mortality worldwide, and due to its high metastatic abilities, drug resistance and usually late stage of diagnosis, the expected treatment responses cannot be obtained. Therefore, the demand for more effective, targeted treatments that will minimize side effects have gained increasing attention. One of them is combination or polytherapy, which means the combination of two or more drugs or therapies. Quercetin, which is one of the most common flavonoids involved in various biological processes, has been shown to give more effective results and inhibit cancer cells at a high rate when used in combination with different agents. VEGF-A, which is an important target in the inhibition of tumor growth and vascularization, shows its efficacy by binding to the related VEGFR. Bevacizumab, an antiangiogenic monoclonal antibody, binds to VEGF-A and prevents its interaction with VEGFR-2. In our study, the effect of combined treatment of Quercetin and Bevacizumab on cell viability, migration, angiogenesis and apoptosis was investigated by methods such as MTT, Crystal Violet, Scratch, Real-Time PCR and ELISA, since we think that the combined treatment will have a synergistic effect on non-small cell lung cancer cells. Our study showed that the combination of Quercetin and Bevacizumab, applied at doses that would create a synergistic effect, severely inhibited cancer cell viability and migration. In addition, we determined that this combination suppresses the VEGF-PI3K/Akt signaling pathway and may trigger this pathway-mediated associated apoptosis.

Keywords: Non-Small Cell Lung Cancer, Bevacizumab, Quercetin, VEGF-A, PI3K signaling pathway

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri kaynaklı ölümler, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin başında yer almaktadır. Dünyada toplam akciğer kanseri vakalarının oranlarına bakıldığında, erkeklerde akciğer kanseri vakaları %14,3 ile birinci sırada yer alırken, kadınlarda bu oran %8,4 ile üçüncü sırada yer almaktadır (1)

Akciğer kanseri tümör histolojisi bakımından 2 gruba ayrılır: küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK, tüm akciğer kanserlerinin %15'i) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK, tüm akciğer kanserlerinin %85'i). KHDAK genellikle adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom şeklinde alt kategorilere ayrılır (2).

Akciğer kanserini erken evrede teşhis etmek zordur ve genellikle ileri evrede teşhis edilmektedir. Bu nedenle hastaların tedavileri de oldukça zorlaşmaktadır. Kullanılan geleneksel tedavi yöntemlerinin sitotoksik etkilerinin yüksek olması ve istenen sonuçların elde edilememesinden dolayı, daha etkili ve hastalarda daha az yan etkilere sebep olan tedaviler büyük önem taşımaktadır (3). Özellikle de karmaşık yollara sahip kanser hastalıklarını tedavi etmek için kombine ilaç çalışmalarının daha başarılı olduğu gözlenmiştir (4).

Kuersetin, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan bir tür flavonoid bileşimidir. Daha önceki araştırmalarda, kuersetinin anti-inflamatuar, anti-oksidan ve anti-kanser gibi birçok etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda kuersetin anti-tümör etkisini, hücre proliferasyonu, anjiyogenez ve metastaz ilerlemesini inhibe ederek ve apoptozu teşvik ederek göstermektedir (5).

Anjiyogenez, önceden var olan kan damarlardan yeni damarların oluşturulduğu süreçtir ve vücudun hem fizyolojik hem de patolojik olaylarında yer almaktadır. Ayrıca tümör anjiyogenezi tümör büyümesi, ilerlemesi ve metastazı ile ilişkili çok önemli bir faktördür. Bu nedenle, tümör vaskülarizasyonunu engelleyebilecek anti-anjiyogenez stratejilerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalara büyük ilgi oluşmuştur. Bunlardan bir tanesi FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından onaylanmış, ilk anti-anjiyogenik monoklonal antikor olan Bevacizumab'tır. Tümör anjiyogenezinde anahtar rol oynayan vasküler endotelyal büyüme faktörü-A (VEGF-A), tümörlerin büyümesi ve metastazları için kritik öneme sahiptir ve endotelyal hücrelerdeki vasküler endotelyal büyüme

faktörü reseptörü-2 (VEGFR-2)'ye bağlanarak anjiyogenezi tetiklemektedir. Bevacizumab, tümör hücreleri tarafından üretilen VEGF-A'ya bağlanarak anjiyogenezi bloke etmektedir (6,7). VEGFR-2 proteininin sadece endotelial hücrelerde değil aynı zamanda meme, gastrointestinal, prostat, melanom ve KHDAK dahil olmak üzere çeşitli solid tümörlerin hücrelerinde de ifade edildiği rapor edilmiştir. Prensip olarak, bu kanserlerin tedavisinde VEGF inhibitörlerinin kullanımı, tümör anjiyogenezini inhibe edebilir ve tümör hücresi proliferasyonunu, invazyonunu baskılayarak hastaların hayatta kalma süresini uzatabilir (8).

Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/Akt yolağı hücre döngüsü, proliferasyonu, sağ kalımı, metabolizması, anjiyogenezi ve apoptozis gibi birçok normal hücrel fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynar. Bu yolak, KHDAK de dahil olmak üzere çoğu kanserde aktiftir.

Bu tez çalışmasında, klinikte anti-anjiyogenik ilaç olarak kullanılan monoklonal antikor Bevacizumab ve en yaygın flavonoidlerden olan Kuersetinin küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hatları H1299 ve A549 ile sağlıklı akciğer hücre hattı olan BEAS-2B hücreleri üzerinde kombine etkisinin anjiyogenez, proliferasyon, migrasyon ve apoptoz üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanserin Tanımı ve Tarihçesi

Tıp tarihinde kanser ile ilgili yapılmış en eski yazılı tanımlama, M.Ö. 3000 yıllarına ait Edwin Smith Papirüsünde bulunan meme kanseri ile ilgiliydi. Bu tanımlamada göğüste bulunan şişkin tümörün ciddi bir hastalık olduğu ve tedavisinin olmadığı ifadesi yer almaktadır. M.Ö. 1500 yıllarında yazıldığı düşünülen Ebers Tıp Papirüsü ise ilk yumuşak doku kanserine referans etmiş ve olası cilt, rahim, mide ve rektum kanserlerine atıfta bulunmuştur (9).

Kanser kelimesinin kökeni, M.Ö. 400'lü yıllarda, "Tıbbın Babası" olarak kabul edilen Yunan hekim Hipokrat'a dayanmaktadır. Hipokrat, kanser kelimesini yengeç anlamına gelen "Karkinos" kelimesinden türetmiştir. Bu şekilde adlandırılmasının sebebi, kanser büyümesini yengece benzetmesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca Hipokrat'a göre, insan vücudunda bulunan dört sıvının (kan, siyah safra, sarı safra ve balgam) dengesizliği çeşitli hastalıklara ve kansere neden olmaktadır. Başka bir Yunan hekim olan Galen (M.S. 130-200), kötü huylu hastalıkları ifade etmek için oncos (Yunanca "şişlik" için kullanılan bir kelime) terimini yarattı. Galen de, hastalıkların dört sıvı dengesizliğinden kaynaklandığına ve meme kanserinin kanda kara safra birikmesi nedeniyle sistemik bir yapıya sahip olduğuna inanıyordu (10).

Kanser oluşumunun temelinde, hücrelerin normal hücre davranışlarını kaybederek, sürekli ve kontrolsüz olarak çoğalması yatmaktadır. Bu hücreler normal hücre davranışının aksine, kontrolsüz bir şekilde büyür, bölünür, komşu doku ve organları istila edebilmektedir. Çoğu durumda onkogenlerin aktivasyonu veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, kontrolsüz hücre çoğalması ve apoptotik mekanizmaların devre dışı kalmasına neden olabilmektedir (11). Kanser patolojisinde tümörler iyi (benign) ve kötü (malign) huylu olarak ayrılmaktadır. İyi huylu tümörler, vücudun diğer bölgelerine yayılmadan primer konumlarında kalırlar. Ayrıca yavaş büyüme eğiliminde olup belirgin sınırları vardır. Kötü huylu tümörler ise kontrolsüz şekilde büyüeyebilen, lokal ya da kan-lenf yoluyla vücutta yayılım gösterebilen (metastaz) kanser hücreleridir. Bu hücrelerin yayılımı hızlıdır ve sınırları düzensizdir (12).

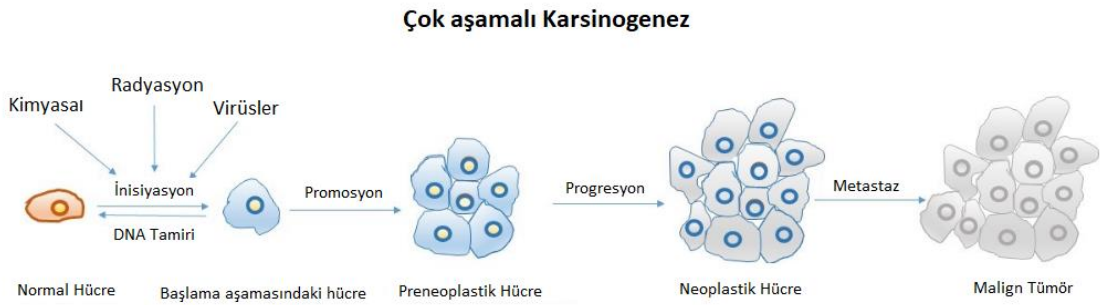
Hem iyi hem de kötü huylu tümörler ortaya çıktıkları hücre tipine göre sınıflandırılan, üç ana gruptan birine girmektedir. Bunlar; karsinomlar, sarkomlar ve

lösemiler ya da lenfomalar. İnsan kanserlerinin en yaygın türü olan ve yaklaşık %90'ını oluşturan karsinomlar, vücutların iç ve dış yüzeylerini örten epitelyal hücre maligniteleridir. İnsanlarda daha nadir görülen sarkomlar vücuttaki kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokularının solid tümörleridir. İnsan malignitelerinin ise yaklaşık %8'ini oluşturan lösemiler veya lenfomalar kan ve immün sistem hücrelerinden gelişim göstermektedirler (13).

2.1.1. Kanser Oluşum Mekanizmaları

Normal bir hücrenin tümör hücresine dönüşümü olarak adlandırılan karsinogenez, oldukça karmaşık ve çok basamaklı bir süreçtir. Bu dönüşüm inisiasyon (başlama), promosyon (artma), progresyon (ilerleme) ve son olarak metastazı da içeren çok aşamalı bir süreci kapsar (Şekil 1). Bu süreç bir anda gerçekleşmez. Çeşitli faktörler aracılığıyla normal bir hücrede meydana gelen hasarın tamir edilememesi, hasarlı hücrenin apoptozis ile imha yeteneğini kaybetmesi ve anormal şekilde çoğalmaya başlaması ile karsinogenez gerçekleşebilmektedir (14).

İnisiasyon (Başlama); Endojen ve eksojen maddeler aracılığıyla DNA'da hasarlar meydana gelebilir (14) ve protoonkogenler, tümör baskılayıcı, genom stabilitesi ile ilişkili ve hücre sinyal iletiminde yer alan genlerdeki mutasyonlar karsinojenik sürecin başlamasından sorumlu olabilmektedir. Bu aşamada hücreler normal biyolojik ve morfolojik özelliklerini kaybederler, fakat oluşan DNA hasarı onarılabılır veya anormal hücreler ortadan kaldırılabilir. Eğer bunlar gerçekleşmez ise, anormal hücrelerin birikimi artar ve ilave gen mutasyonları ile kanser oluşumunu ilerletebilmektedir (15).



Şekil 1. Çok aşamalı karsinogenez (14)

Çok aşamalı karsinogenez sürecinin ikinci aşaması olan promosyonda (artma), mutasyona uğrayan hücrelerin klonal genişlemesi gerçekleşmektedir. Bu aşama hücre ölümüne direnç, büyüme baskılayıcılarından kaçış, proliferatif sinyali sürdürme, immün yanıtta kaçış gibi kanserin temel özelliklerini içeren birçok süreci kapsamaktadır. Tüm bu özellikler, kontrolsüz hücre proliferasyonunu teşvik eder, dolayısıyla tümör gelişimini veya neoplaziyi uyarır. Promosyon fazında genel olarak 3 aşama gerçekleşir; ilk aşama olan inisiyasyon aşamasında değişime uğrayan hücreler, belirli bir boyuta gelene kadar (Tümör boyutu ~2cm) ya da anormal hale dönüşene kadar bölünürler. İkinci aşamada tümör hücreleri önemli bir boyuta ulaşmıştır (~5cm) veya anormal hücreler kolayca saptanabilecek şekilde normal sınırları aşmıştır. Kanser hücreleri bu aşamada çoğalmalarını devam ettirebilmek için yeni besinlere ihtiyaç duyarlar. Üçüncü aşama, tümörün ihtiyaç duyduğu besin kaynakları otofaji yolağının aktivasyonu ve yeni kan damarların oluşturulduğu anjiyogenez sürecini kapsar. Bu aşamada tümör boyutu 5 cm'den büyük bir boyuta ulaşmıştır ve komşu dokulara genişlemiştir (15).

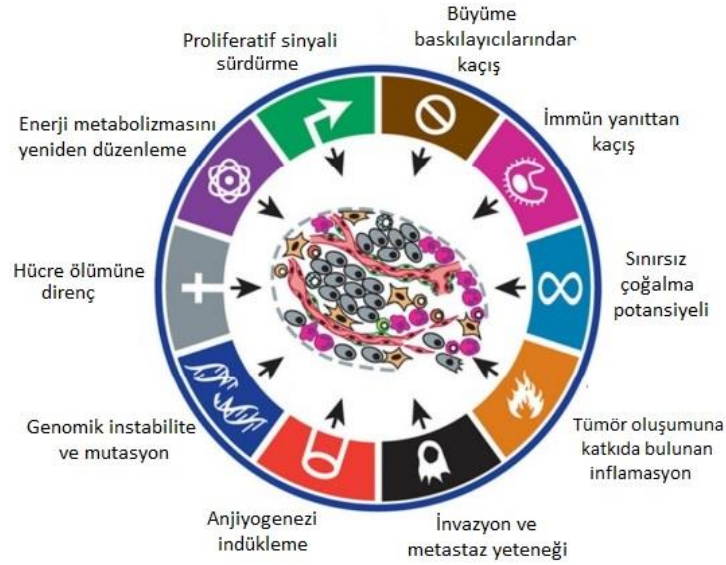
Oluşan yeni kan damarları kanserin ilerlemesinde çifte rol oynarlar: Tümörü besleyerek çoğalmalarını hızlandırırlar ve diğer yandan tümör hücrelerinin uzak bölgelere, yani metastazını kolaylaştırırlar. Tümör oluşum mekanizmalarının son aşamaları olan progresyon (ilerleme) ve metastazis ile kanser hücreleri primer tümörden bağımsız hale gelir ve yeni tümörler oluşturmak için tekrarlayan bu döngüye devam ederler.

Kanser türleri tümü aynı şekilde hareket etmese de çoğu yukarıda açıklanan modeli takip eder, bu bağlamda kanser gelişiminin davranışını anlamak için karsinogenez sürecine dahil olan moleküler mekanizmaların anlaşılması büyük önem taşımaktadır (15).

2.1.2. Kanser Hücrelerinin Özellikleri

Kanser mekanizmaları ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalar ve elde edilen bilgiler arttıkça, kanser ile ilgili bilinen temel özelliklere yenileri eklenmiştir. Kanser; sınırsız çoğalma potansiyeli, hücre ölümüne direnç, büyüme baskılayıcılarından kaçış, proliferatif sinyali sürdürme, anjiyogenezi indükleme, doku invazyonu ve metastaz yeteneği, enerji metabolizmasını yeniden düzenleme, genomik instabilite ve mutasyon, immün yanıtta kaçış ve tümör oluşumuna katkıda bulunan inflamasyon gibi temel özellikleri bulunmaktadır (16).

Her ne kadar kanser alanında çok sayıda araştırma ve çalışmalar mevcut olsa da, kanser oluşum ve gelişiminin karmaşıklığından dolayı önümüzdeki yıllarda belirlenen özelliklere yenilerin ekleneceği kaçınılmazdır.



Şekil 2. Kanser hücrelerinin özellikleri (16)

2.1.2.1. Sınırsız çoğalma potansiyeli

Normal somatik hücreler sınırlı bir proliferasyon yeteneğine sahiptir. Maksimum bölünme sayısına “Hayflick limiti” denmektedir ve bu limite ulaşan hücreler bölünmeyi durdurarak replikatif yaşlanma sürecine girerler. Bunun nedeni ise kromozom uçlarında bulunan “telomer” adı verilen, protein kodlamayan spesifik nükleotid tekrarlarının (TTAGGG) her hücre bölünmesinden sonra kısalmasıdır. Telomer uzunluğunun korunması ve sabit kalmasını sağlayan bir ters transkriptaz enzimi olan telomeraz, büyük bir enzim kompleksidir. Bu enzim kompleksi iki alt birimden oluşmaktadır. Bunlar; insan telomeraz RNA’sı hTER ve insan telomeraz revers transkriptazı hTERT’tir. Telomeraz aktivitesi somatik hücrelerde baskılanmış durumdayken, kanser ve kök hücrelerinde aktiftir. Onkogeneizde telomerazın aktif hale gelmesi önemli bir adımdır. Tümör biyopsilerinin yaklaşık olarak %85-90’ında telomeraz pozitiftir. Normal ve kanser hücrelerinde telomeraz düzenlenmesinin daha iyi anlaşılması, etkili ve güvenilir yöntemlerin geliştirilmesi kanser tedavisinde umut vadetmektedir (17).

2.1.2.2. Hücre ölümüne direnç

Programlanmış hücre ölümü anlamına da gelmekte olan apoptozis, organizmaların gelişim sürecinde veya hücrel stres sonrasında ihtiyaç duyulmayan, potansiyel olarak zararlı olabilecek veya sağlıklı hücreleri yok etmek için kullanılan biyolojik bir süreçtir. Tüm çok hücreli organizmalarda mitoz bölünme ile oluşturulan yeni hücreler ile zarar görmüş ya da işe yaramayan hücreler arasında dengenin oluşturulmasını sağlayan bir mekanizmadır.

Apoptozis 2 yolak ile aktive edilebilmektedir. Bunlar; intrinsik (içsel) ve ekstrinsik (dışsal) yolaklardır. Apoptoz hücre içinden ya da dışından gelen sinyallerle başlar, kaspazların aktivasyonu ile devam eder. İçsel yolakta kaspaz-3, kaspaz-9 aktivasyonu görülürken, dışsal yolakta kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonu görülür. Aktifleşen kaspazlar ile hedef proteinlerin yıkılması sonucu hücrede biyokimyasal ve yapısal değişiklikler gözlemlenir, apoptotik cisimcikler oluşur. Bu süreçte Bcl-2 protein ailesi üyelerinden pro-apoptotik proteinler olan Bax ve Bak ekspresyonu artarken, anti-apoptotik proteinler olan Bcl-2, Bcl-xL ekspresyonları azalmaktadır.

İçsel apoptotik yolak, mitokondriyal hasar, iyonlaştırıcı radyasyon kaynaklı genotoksik hasar, endoplazmik retikulum stresi ya da büyüme faktörü uyarılarının olmaması gibi faktörler ile aktive olabilmektedir. Bu yolak, Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) protein ailesi ve kaspazlar adı verilen sistein proteaz grubu enzimler tarafından düzenlenir. Bcl-2 ailesi; anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xL), pro-apoptotik efektör proteinler (Bax, Bak) ve pro-apoptotik sadece-BH3 proteinleri (Bid, Bad, Bim, Noxa, Puma) üyelerinden oluşmaktadır. Normal hücrelerde pro-apoptotik sadece-BH3 proteinleri (Bid, Bad gibi) etkisizdir ve pro-apoptotik efektör proteinleri ise anti-apoptotik proteinleri ile etkileşime girerek baskılanmaktadırlar. Hücre ölüm sinyali varlığında Bax ve Bak aktifleşerek mitokondri dış zarında oligomerler oluştururlar. Mitokondriyal zar geçirgenliği artarak, mitokondriyal zarlar arası boşlukta bulunan Sitokrom-c'nin sitozole salınımı gerçekleşmektedir. Sitokrom-c'nin salınımı, APAF-1 ve kaspaz-9'u içeren apoptozom kompleksini oluşturur ve böylece kaspaz kaskadı başlatılır (18).

Ekstrinsik (dışsal) apoptotik yolak ise ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (FAS, TNF), büyüme faktörlerinin yetersizliği ve dış etkenler (kimyasallar, UV, radyasyon, kemoterapötik ilaçlar) gibi hücre dışı sinyaller ile aktive olur. Ölüm sinyalleri (FasL, TNF- α , TRAIL (TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand)), hücre yüzeyinde bulunan

Fas, TNFR ve DR5 gibi ölüm reseptörlerine bağlandıklarında, reseptör trimerizasyonunu uyarırlar. Üçlü yapı kazanan reseptör; adaptör molekülleri ve prokaspazla birleşerek DISC (Ölüm Uyarıcı Sinyalleşme Kompleks) adı verilen yapıyı oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif haldeki prokaspaz-8 kesilerek aktif kaspaz-8 oluşur. Kaspaz-8 aktivasyonu efektör kaspazların kesilmesine ve aktifleşmesine neden olmaktadır. Bazı hücrelerde kaspaz-8'in aktivasyonunu takiben kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin aktivasyonu apoptozun başlaması için yeterli iken, bazı hücrelerde ölüm sinyalinin çoğaltılması gerekmektedir. Bu hücrelerde kaspaz-8, pro-apoptotik sadece BH3 proteini olan Bid'i keserek aktifleştirir ve mitokondri zar geçirgenliğine ve kaspaz-9 aktivasyonuna yol açmaktadır.

Kanser hücreleri için apoptozis bir bariyerdir. Bu nedenle kanser hücreleri apoptozdan ya da diğer hücre ölüm mekanizmalardan kaçmak için çeşitli stratejiler geliştirirler. Bunlardan bir tanesi de Bcl-2 protein ailesinin iki ana pro-apoptotik geni olan Bax ve Bak'ın baskılanmasıdır. Bir diğeri ise tümör baskılayıcı geni p53'ün etkisiz hale getirilmesi ve anti-apoptotik protein olan Bcl-2 ifadesinin artırılmasıdır.

Hücre ölümüne dirençte etkili mekanizmalardan bir diğeri ise hücre homeostazinin sağlanması ve hücre stres durumlarında hücre canlılığının korunmasında önemli rolü olan otofajidir. Otofaji, organel hasarı, anormal proteinlerin varlığı ve besin yoksunluğu dahil olmak üzere çeşitli stres koşulları altında meydana gelebilmektedir. Tümör hücreleri metabolik stres ile karşı karşıya kaldıklarında, otofaji aracılığıyla metabolizmalarını yeniden programlayarak sağ kalabilirler ve böylece hızlı hücre büyümesi ve proliferasyonu artırabilirler. Birçok çalışma otofajinin, tümör büyümesi ve gelişiminde hücre sağ kalımı ve hücre ölümünde ikili rol oynadığını bulmuştur. Otofaji genlerinin susturulduğu bazı çalışmalarda, tümör oluşumunun baskılandığı görülmüştür (19).

2.1.2.3. Büyüme Baskılayıcılarından Kaçış

Hasarlı hücrelerin çeşitli mekanizmalarla ortadan kaldırılması, normal hücrelerin devamlılığı için önemlidir. Tümör baskılayıcı genler, gerektiğinde hücre bölünmesini durduran proteinler üretirler. Hücre bölünmesini kontrol eden mekanizmalarda meydana gelen herhangi bir aksaklık, kontrolsüz hücre bölünmelerine neden olabilmektedir. Sürekli bölünme isteği olan kanser hücreleri, çoğalma ve gelişimini sürdürebilmeleri

için, büyümei engelleyicilerden kaçma eğilimindedir. İki prototipik tümör baskılayıcı gen olan retinoblastoma (RB) ve TP53 geni, hücre döngüsünü gerekli olduğunda durduran ve uygun gördüğünde apoptoza yönlendiren proteinleri kodlamaktadır. Kanser hücreleri için bu tümör baskılayıcı genler tehlike arz etmektedir. Kanser hücreleri bu tehlikeden kaçmak ve hayatta kalabilmek için, bu genlerin aktivitelerini baskılayarak ya da kaldırarak yaşamlarını sürdürebilirler (16).

2.1.2.4. Proliferatif Sinyali Sürdürme

Hücrelerin tamamı, uyanlarla çevreden bilgi alımını sağlayan sinyal iletim sistemlerine sahiptir. Bu sinyal iletim sistemlerinde, ligand (sinyal molekülü) ile reseptör etkileşerek hücrelerin birbiriyle iletişim kurması sağlanır. Hücre içi ve hücreler arası sinyal iletimlerinde çok sayıda gen ve protein görev almaktadır. Normal dokular, hücre büyüme ve bölünme döngüsüne girme ve bu döngü boyunca ilerleme talimatı veren büyümei teşvik eden sinyallerin üretimini ve salınımını dikkatli bir şekilde kontrol eder ve böylece hücre homeostazının ve fonksiyonunun korunması sağlanır. Bazı kanser hücreleri kendi büyüme reseptörlerini üretebilir ve sinyal molekülleri ile etkileşime girebilirler. Bu otokrin sinyal iletimi ile kanser hücreleri dışarıdan herhangi bir büyüme faktörüne ihtiyaç duymadan çoğalıp yaşamlarını sürdürebilirler (13,16).

2.1.2.5. Anjiyogenezi İndüklenme

Normal hücrelerde olduğu gibi tümör hücreleri de besin ve oksijen kaynağına, ayrıca atık ürünleri uzaklaştırmaya ihtiyaç duyar. Bu ihtiyaç doğduğunda anjiyogenez adı verilen ve yeni damarların oluşmasında görev alan fizyolojik süreç uyarılır (20). Anjiyogenez, aktivatör ve inhibitörler arasındaki bir denge ile düzenlenir. Tümör dokuları besin ve oksijene ihtiyaç duyduğunda, anjiyogenez uyarılır. Bununla birlikte, anjiyogenik aktivatörlerin etkinliği ile yukarı regülasyonu tek başına neoplazmanın anjiyogenezi için yeterli değildir. Damar büyümesinin negatif düzenleyicileri veya inhibitörlerinin de aşağı regüle edilmesi gerekir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), anjiyogenin, transforming büyüme faktörü- α ve β (TGF- α , TGF- β), tümör nekroz faktörü (TNF), interlökin-8 (IL-8), platelet türevli büyüme faktörü (PDGF) ve epidermal büyüme faktörü dahil olmak üzere çeşitli anjiyogenik aktivatörler tanımlanmıştır. Bu aktivatörler hipoksi, nitrik oksit ve

karbondioksit artışı gibi uyarılar ile oluşup endotel hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak anjiyogenezi uyarabilmektedir.

VEGF ailesi ve reseptörleri (VEGFR), neoplastik vaskülarizasyon alanında giderek daha fazla ilgi görmektedir. VEGF, normal dokularda olduğu gibi neoplastik dokularda da güçlü bir anjiyogenik ajandır. Bazı anjiyogenik fenotipler, büyüyen tümör hücreleri ile kılcal damarlar arasındaki mesafenin artmasından veya yeni damarların verimsizliğinden kaynaklanan hipoksi ile tetiklenebilir. Hipoksi, hipoksi ile indüklenbilir faktör-1 α (HIF-1 α) yoluyla VEGF ve reseptörünün ekspresyonunu indükler. Tümör hücreleri, VEGF üreterek ve ardından onu çevreleyen dokuya salgılanarak yeni kan damarlarını besler. Tümör hücreleri endotel hücreleriyle karşılaştığında, endotel hücrelerinin dış yüzeyindeki reseptörlere bağlanırlar. VEGF tarafından aktive edilen endotel hücreleri, matriks metalloproteinazları (MMP) üretir. MMP'ler, hücreler arasındaki boşlukları dolduran ve protein ile polisakkaritlerden oluşan hücre dışı matriksi parçalar. Bu matriks, endotel hücrelerinin göçüne izin verir. Endotel hücreleri, çevre dokulara göç ederken bölünmeye başlar (21).

2.1.2.6. Doku İnvazyonu ve Metastaz Yeteneği

Doku invazyonu, primer tümör hücrelerinin yakın çevreye yayıldığı mekanizmadır. Metastaz ise tümör hücrelerinin primer tümörden ayrılarak vücudun farklı bölümlerine yerleşip, ikincil ya da üçüncül tümörlere yol açmasına neden olan süreçtir. Kanserli hastalarda yaşamı en çok tehdit eden olaydır. Tümör hücrelerinin başarılı bir şekilde metastazı gerçekleştirebilmesi için tamamlaması gereken bir dizi olay vardır (22). Bunlar; invazyon ve migrasyon, anjiyogenez ve intravazasyon, dolaşıma geçme, ekstrasvazasyon ve kolonizasyondur.

- **İnvazyon ve migrasyon;** Hücre-hücre adezyon kapasitesinin kaybı, malign tümör hücrelerinin primer tümör kütesinden ayrılarak, çevre dokuyu istila etmesine olanak tanır. Bu aşamada tümör hücreleri ekstrasellüler matriksi mekanik olarak yeniden şekillendirir ve göç sırasında MMP'ler aracılığı ile matriksi kimyasal olarak bozar.

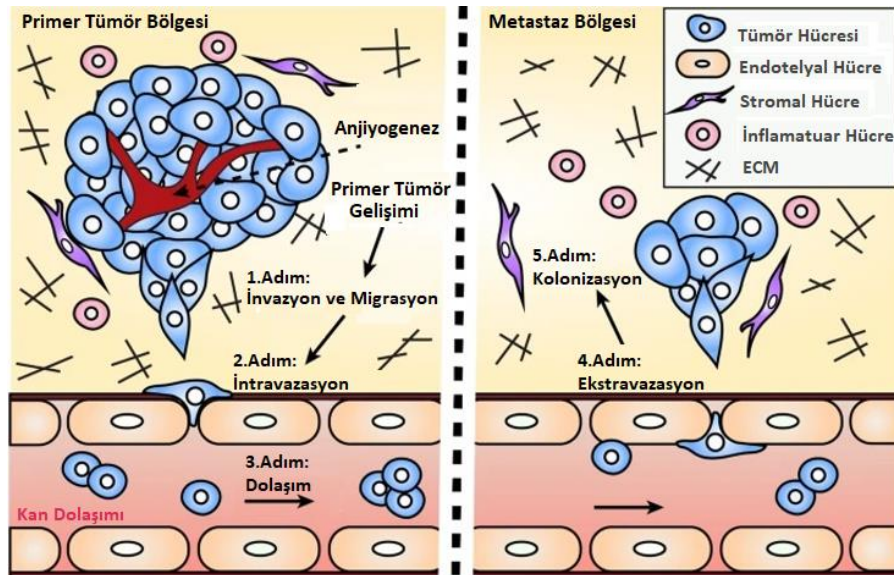
- **Anjiyogenez ve intravazasyon;** Tümör anjiyogenezi, tümörün ilerlemesi sırasında besin-oksijen ihtiyacı ve atıkların uzaklaştırılması için yeni damar oluşumunu

ifade ederken, intravazasyon tümör hücrelerinin kan ve lenf damarlarına girmesine denir. Anjiyogenez aracılığı ile yeni oluşan tümör hücrelerinin damar sistemi olgunlaşmamış ve aşırı geçirgendir. Bu durum tümör hücrelerinin intravazasyonunu kolaylaştıran plazma proteinlerinin sızıntısına neden olmaktadır. Anjiyogenez, tümör hücrelerinin vasküler ve lenf sistemleri yoluyla uzak bölgelere taşınmasını sağlayarak metastazı kolaylaştırır.

- **Dolaşım;** Kanser hücrelerinin çok azı dolaşıma ulaşsa da, orada karşılaştıkları, bağışıklık stresleri ve kırmızı kan hücresi çarpışmaları gibi sebeplerden dolayı daha da azı hayatta kalabilmektedir. Metastazın başarılı bir şekilde gerçekleşebilmesi için tümör hücrelerinin dolaşıma katıldıktan sonra hayatta kalması önem arz etmektedir.

- **Ekstravazasyon;** Dolaşımda hayatta kalabilen tümör hücreleri, hedef organların damar sistemine ulaştıktan sonra endoteli delerek hedef dokuya ulaşırlar. Tümör hücrelerinin endoteli aşıp organlara ulaşmasına ekstravazasyon adı verilmektedir.

- **Kolonizasyon;** Ekstravazasyondan sonra kanser hücrelerinin metastazı gerçekleştirebilmesi için son aşama kolonizasyondur. Bu aşamada tümör hücreleri mikro çevre ile etkileşerek metastazı gerçekleştirirler (Şekil 3) (23).



Şekil 3. Metastaz Kaskadı (23)

2.1.2.7. Enerji Metabolizmasını Yeniden Düzenleme

Normal hücreler fonksiyonel süreçlerini sürdürebilmeleri için gerekli olan enerjiyi oksidatif fosforilasyon mekanizması ile elde etmektedir. Bu mekanizma glikoliz, krebs döngüsü ve elektron taşıma sistemini (ETS) kapsamaktadır. Normal hücreler, oksidatif fosforilasyon yolu ile enerji elde edebilmek için glikozu metabolize eder ve oksijensiz koşullar altında glikolize başvururlar.

Neoplastik hücrelerin karakteristik özelliklerinden olan kontrolsüz hücre çoğalması, yalnızca hücre çoğalmasının düzensiz kontrolünü değil, aynı zamanda hücre büyümesini ve bölünmesini hızlandırmak için enerji metabolizmasının düzenlenmesini ve elverişli olarak kullanılmasını da içermektedir. Otto Warburg kanser hücrelerinin enerji metabolizmasının normal hücrelerden farklı olduğunu gözlemiŐtir. Warburg, kanser hücrelerinin oksijen varlığında bile, enerji ihtiyaçlarını glikoliz ile karŐıladığını ileri sürmüŐtür. ‘‘Aerobik glikoliz’’ olarak adlandırılan bu süreçte, tümör hücreleri glukoz alımı ve glikolitik yol üzerinden glukozun laktoza çevrilmesini sağlayan metabolik süreç ile enerji elde etmektedir. Birçok kanser türünde, glukoz alımının belirgin Şekilde arttığı ve kullanıldığı belgelenmiŐtir. Tümör hücrelerinde GLUT-1 (glukoz transporter-1) gibi hücre içerisine glukoz alımını sağlayan glukoz taŐıyıcılarının ifadelerinin yüksek olduğu, ayrıca glikolitik yola ın baskın hale gelmesinin c-myc, ras ve src gibi belirli onkogenlerin ve hipoksi ile indüklenebilir faktör-1  (HIF-1 ) gibi transkripsiyon faktörlerin aktivasyonu, ile TP53 gibi tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu ile ilgili olduğu saptanmıştır.

Günümüzde kanser hücrelerinin artmıŐ glukoz alımı ve yüksek metabolik aktiviteleri baz alınarak, tümör odaklarının tespit edilmesi amacıyla geliŐtirilmiŐ Flor-18 işaretli florodeoksiglukoz (FDG) pozitron emisyon (PET) görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır (16,24).

2.1.2.8. Genomik İnstabilite ve Mutasyon

Genomik instabilite çoğu kanser hücresinin karakteristik özelliğidir. Genomik instabilitede hücreler, hücre bölünmesi sırasında artan genom değiŐikliği eğilimi gösterirler. Tümör hücreleri, normal hücrelere göre genetik olarak daha kararsızdırlar. Genomik kararsızlık, hücrelere daha kısa bir hücre döngüsü, hücre içi ve immünolojik kontrol sistemlerini atlama olanağı ve böylece kanserli hücrelere büyüme ve kademeli

olarak ilerleme avantajı sağlar. Kanser sıklıkla hücre bölünmesinde ve tümör baskılayıcıları olarak görev yapan genlerin hasar görmesinden kaynaklanmaktadır. Genomik bütünlüğün çeşitli gözetim mekanizmaları, DNA hasar kontrol noktaları, DNA tamir mekanizmaları ve mitotik kontrol noktaları tarafından sağlandığı bilinmektedir. Bu mekanizmalardan herhangi birinde meydana gelen kusur, genellikle hücreyi malign transformasyona yatkın hale getiren genomik instabiliteye neden olur. Histon kuyruklarının posttranslasyonel modifikasyonları, kromatin yapısının yanı sıra hücre döngüsünün düzenlenmesi ile yakından ilişkilidir. Bununla birlikte, DNA metilasyon durumu da genomik bütünlük ile ilgilidir (25).

2.1.2.9. İmmün Yanıttan Kaçış

Bağışıklık sistemi, vücudu sürekli olarak karşılaştığı bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan, eksojen veya endojen çeşitli saldırılara karşı koruyarak organizma bütünlüğünün sağlanmasında önemli bir rol oynar. Patojenlere karşı korumanın yanı sıra, savunma ve kanseri önlemede güçlü bir şekilde görev almaktadır. İmmün gözetim teorisi (immune surveillance), hücrelerin ve dokuların sürekli olarak uyanık bir bağışıklık sistemi tarafından izlendiğini ve bu tür bağışıklık gözetiminin yeni başlayan kanser hücrelerinin ve dolayısıyla yeni oluşan tümörlerin büyük çoğunluğunun tanınmasından ve ortadan kaldırılmasından sorumlu olduğunu öne sürmektedir (26). Fakat tümör hücreleri çeşitli mekanizmalar aracılığıyla immün sistemden kaçabilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, bağışıklık yetersizliği olan canlılarda tümörlerin daha sık ortaya çıktığı ve daha hızlı büyüdüğü gösterilmiştir. Özellikle, CD8+ sitotoksik T lenfositlerin (CTL'ler), CD4+ Th1 yardımcı T hücrelerinin veya doğal öldürücü (NK) hücrelerin gelişimindeki veya işlevindeki kusurlar, tümör insidansında gözle görülür artışlara yol açmıştır. Ayrıca, hem T hücrelerinde hem de NK hücrelerinde kombine immün yetmezliklere sahip canlılar, kanser gelişimine daha da duyarlı olduğu gözlemlenmiştir (16).

Kanser hücreleri, immünosupresif sitokinlerin salgılarını artırarak (interlökin-10 (IL-10), tümör büyüme faktörü- β (TGF- β) gibi) ve hücre yüzeylerinde bulunan majör doku uyumluluk kompleks (MHC) ekspresyonunu azaltarak da bağışıklık gözetiminden kaçabilmektedir (27). Ayrıca inflamatuvar yanıtın önlenmesini sağlayan T hücrelerini inhibe edici uyarılar da vardır. Bu uyarın noktalarına immün kontrol noktaları denmektedir ve bu uyarınların immün sistemden kaçışta etkili olduğu gözlemlenmiştir.

Bilinen en önemli immün kontrol noktaları sitotoksik T lenfosit ile ilişkili protein-4 (CTLA-4) ve programlanmış ölümü proteini-1 (PD-1)'dir. T hücrelerinin aktivasyonu için MHC üzerinden sunulan antijenin, T lenfosit üzerindeki T hücre reseptör kompleksi (TCR) tarafından tanınması yeterli değildir. Aynı zamanda antijen sunan hücre üzerindeki CD-80/CD-86 ile CD-28'nin etkileşimi gereklidir. CD-80/CD-86, CTLA-4 ile de etkileşebilmektedir. CTLA-4 CD-80/CD-86 ile birleşirse T hücresi aktivasyonunu gerçekleştiremez, böylece immün yanıt oluşturamaz. Diğer immün denetim noktası T, B, NK hücreleri ve monositlerde eksprese olan PD-1'in aktive olması için ligandları (PD-L1 ve PD-L2) ile birleşmesi gerekmektedir. PD-L1 birçok kanser hücresinde eksprese olmaktadır. PD-L1 ile PD-1'nin etkileşimi ile tümör hücreleri immün yanıtından kaçabilmektedir (28).

2.1.2.10. Tümör Oluşumuna Katkıda Bulunan İnflamasyon

İnflamasyon, vücudun fiziksel yaralanma, iskemik yaralanma (doku ve organlara yetersiz kan akışı), enfeksiyon, toksinlere maruz kalma veya diğer travma türlerinden kaynaklanan doku hasarına verdiği tepkidir. Vücudun inflamatuvar yanıtı, hasarlı dokunun onarımı ve yaralı doku bölgesinde hücresel proliferasyon ile sonuçlanan hücresel değişikliklere ve bağışıklık yanıtlarına neden olur. İnflamasyonun nedeni devam ederse veya süreci durdurmadan sorumlu belirli kontrol mekanizmaları başarısız olursa, inflamasyon kronikleşebilir. Bu inflamatuvar yanıtlar kronik hale geldiğinde, hücre mutasyonu ve proliferasyonu ile sonuçlanabilir. Bu durum genellikle kanser gelişimine elverişli bir ortam yaratır. Kanserde kronik inflamasyon, hücresel transformasyonu, ilerleme, hayatta kalma, proliferasyon, invazyon, anjiyogenez ve metastaz dahil olmak üzere tümör oluşumunda yer alan çeşitli aşamalarla bağlantılıdır.

Kronik inflamatuvar mikroçevre, makrofajlar açısından baskındır. Bu makrofajlar, diğer lökositlerle birlikte, enfeksiyonla savaşmak için yüksek seviyelerde reaktif oksijen ve nitrojen türleri üretir. Bununla birlikte, sürekli doku hasarı ve hücresel proliferasyon ortamında, bu enfeksiyonla savaşan ajanların kalıcılığı zararlıdır. DNA ile reaksiyona giren ve çoğalan epitelyal ve stroma hücrelerinde mutasyonlara neden olan peroksinitrit gibi mutajenik ajanlar üretebilirler.

Tümör mikroçevresinde ayrıca, dendritik hücreler ve lenfositler gibi inflamatuvar hücreler de bulunmaktadır. İnflamasyondan kansere geçişte ve inflamasyonla ilişkili

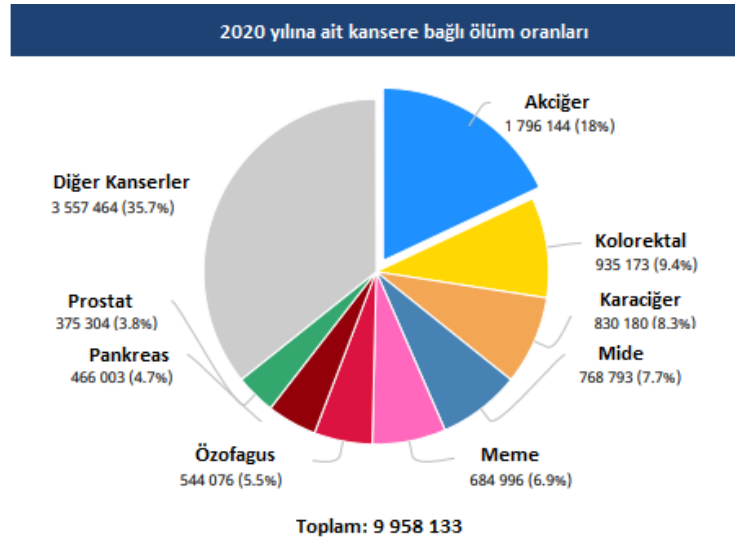
kanserlerin gelişiminde görev alan çeşitli anahtar düzenleyici moleküller vardır. Bunlar; proinflatuar sitokinler, TNF'ler, interlökinler ve kemokinlerdir (29).

2.2. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, akciğer dokusundaki belirli hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalarak tümör oluşturduğu hastalıktır (30). Agresif davranışı nedeniyle akciğer kanseri sıklıkla ileri evrede teşhis edilir ve kötü prognozla ilişkilidir. Dünya genelinde hem erkeklerde hem de kadınlarda ölüm sebeplerinin başında yer alır. Genel olarak iki ana gruptan oluşmaktadır. Bunlar; küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ile küçük hücreli dışı akciğer kanseridir (KHDAK) (31).

2.2.1. Akciğer Kanserin Epidemiyoloji ve Etiyolojisi

GLOBOCAN (Global Cancer Incidence, Mortality and Prevalence)'ın 2020 yılı verilerine göre akciğer kanseri, kansere bağlı ölümlerinin önde gelen nedeni iken, yeni kanser vakaları açısından 2. sırada yer almaktadır. Türkiye'de ise kansere bağlı mortalite ve insidans açısından ilk sıradadır (1).



Şekil 4. 2020 yılına ait kadın ve erkeklerde kansere bağlı ölüm oranları (32)

Akciğer kanseri tümör histolojisi bakımından KHAK (%15) ve KHDAK (%85) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. KHDAK, genel olarak adenokarsinom, skuamöz

(yassı) hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom olmak üzere üç alt kategoriden oluşmaktadır (2).

Adenokarsinom, bu kategorideki en yaygın akciğer kanseridir ve tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Sigara kullanımı bu kanser alt kategorisi için bir risk faktörü olsa da, diğer kategorilere kıyasla daha az ilişkilidir. Diğer risk faktörleri arasında aile öyküsü, asbest, radon ve ağır metaller sayılabilir. Kadınlarda daha sık görülen akciğer kanseridir. Genellikle periferik bronşlarda ortaya çıkan tümörlerden oluşur. Adenokarsinomlar genellikle diğer alt tiplere göre daha yavaş gelişir ve daha küçük kitleler oluştururlar. Bununla birlikte, erken bir aşamada yaygın olarak metastaz oluşturma eğilimindedirler (33,34).

Skumöz (yassı) hücreli karsinom, tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %30'unu oluşturmaktadır. Skumöz hücreler, vücudun organlarını kaplayan düz ve ince hücrelerdir. Diğer KHDAK alt kategorilerinden daha fazla sigara ile ilişkili olan kanser türüdür. Skumöz hücreli karsinom için diğer risk faktörleri yaş, aile öyküsü, pasif sigara içiciliği ve asbest sayılabilir. Erkeklerde kadınlara oranla daha sık görülmektedir. Santral bronş yerleşimlidir ve metastaz hızı düşüktür (35).

KHDAK'nin farklılaşmamış tipi olan büyük hücreli karsinom, akciğer kanserlerinin %5-10'unu oluşturur. Metastaz yapma eğilimi fazladır. Büyük hücreli karsinom, sigara kullanımı ile yakından ilişkilidir (34).

KHAK, küçük, oval şekilli hücreler olup mikroskop altında yulaf taneleri gibi görünürler. KHAK, akciğer dokularında en hızlı gelişen ve metastatik özelliği yüksek olan bir nöroendokrin akciğer kanseridir. Oldukça agresif olan bu akciğer tümörleri sigara kullanımı ile kuvvetle ilişkilidir ve KHDAK ile kıyaslandığında daha kötü prognoz göstermektedir. Tedaviden sonra nüksetme olasılığı diğer akciğer kanseri türlerinden daha fazladır (36,37).

Akciğer kanserini tetikleyen çeşitli risk faktörleri vardır. Bunlar içerisinde en önemlisi ve diğer kanser türleri için de şüphesiz risk oluşturan sigara kullanımıdır. Diğer risk faktörleri ise pasif sigara içiciliği, genetik yatkınlık, asbest, yaşam tarzı, çevresel ve mesleki maruziyetleri içermektedir.

Nikotinin kendisi kanserojen olmasa da, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve 4-(metilnitrozoamino)-1-(3 piridil)-1-bütanon (NNK) dahil olmak üzere, sigara dumanında Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından kanserojen

olarak kabul edilen 55 kadar madde vardır. Bu maddeler DNA'ya kovalent olarak bağlanarak, DNA segment amplifikasyonu ve delesyonu gibi çeşitli mutasyonlara sebep olabilmektedir (38). DNA tamir mekanizmaları normal şartlar altında, oluşan hücresel hasarları onarabilir ve gerekli gördüğünde apoptoza yönlendirebilir. Fakat DNA tamir mekanizmasında aksaklıklar meydana gelirse kalıcı mutasyonlar oluşabilir ve hücreler kontrolsüz çoğalmaya indüklenebilir. Bu ise kanser oluşumuna zemin hazırlayabilmektedir (38,39).

Sigara kullanımı ile birlikte mesleki ve çevresel faktörlere maruziyet de önemli akciğer kanseri risk faktörlerindedir. Birçok iş yerinde çalışanlar, akciğer ve diğer kanserlere sebep olabilecek ve IARC tarafından kanserojen olarak kabul edilen ajanlara maruz kalmaktadır. Bunlar; arsenik, asbest, berilyum, kadmiyum, krom, nikel, silika ve dizel dumanları gibi ajanlardır. 2000 yılında, dünya çapında erkeklerde akciğer kanseri ölümlerinin %10'unun (88.000 ölüm) ve kadınların %5'inin (14.300 ölüm) bu mesleki ajanların maruziyetinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir (40).

Sigara kullanımı akciğer kanserinin önde gelen nedeni olsa da, sigara içenlerin %20'sinden daha azı bu hastalığa yakalanması ve ailesinde kanser öyküsü olan sigara içmeyenlerin akciğer kanseri riskinin artması nedeniyle, genetik yatkınlığın da akciğer kanserine neden olabileceği öne sürülmüştür (41). Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), akciğer kanseri ile ilişkili 5p15.33 (TERT/CLPTM1L), 6p21.33 (BAT3/MSH5) ve 15q25.1 (CHRNA5/ CHRNA3/ CHRNB4) üç ana yatkınlık kromozom lokusu belirlemiştir. Aynı zamanda DNA tamir genleri (XRCC1, OGG1, XPA, XPD, XRCC3), interlökinleri kodlayan genler (IL-1, IL-8, IL-10) ve inflamasyon sırasında onarımda yer alan metalloproteazları (MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-12) kodlayan genler üzerindeki bazı polimorfizmler, akciğer kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir (40).

2.2.2. Akciğer Kanseri Evreleme

Akciğer kanserinin ölüm oranları diğer kanser türleri ile kıyaslandığında oldukça yüksektir. Bu nedenle akciğer kanserinde doğru sınıflandırmanın yanı sıra evreleme de, uygun tedavi yönteminin belirlenmesi ve prognozu açısından önem taşımaktadır (42).

Akciğer kanserinde TNM (T: Primer tümör, N: Nodül, M: Metastaz) evrelemesi kullanılmaktadır. Bu evreleme sisteminde, "T" tümörün boyutu ve kapsamı, "N"

tümörün lenf noduna metastaz yapıp yapmadığı ve “M” ise kanserin metastaz durumu ile ilgili bilgi vermektedir. Uluslararası Kanser Kontrolü Derneği (UICC), Amerikan Kanser Birliği (AJCC) ve Uluslararası Akciğer Kanseri Araştırmaları Derneği (IASLC) tarafından kabul edilen son evreleme sistemi 2017 yılında yayınlanan 8. TNM evreleme sistemidir (43,44). TNM evreleme sistemi kanser durumu ile ayrıntılı bilgiler verirken, bazı kanserlerde daha az ayrıntılı numerik evreleme sistemi de kullanılmaktadır. Bu evreleme sisteminde, 0’dan IV’e kadar bir derece kullanılmaktadır. Bu derecenin artması kanserin ilerlemesini ifade eder. Evre 0, vücudun bir bölgesinde bulunan ve yayılım göstermeyen anormal hücre varlığını ifade eder. Bu evredeki hücreler kansere dönüşebilir. Evre I-III’te kanser mevcuttur ve tümör boyutu ne kadar yüksek olursa, evre sayısı ve metastaz eğilimi de o kadar yüksek olur. Evre IV en ileri aşama olup, kanserde metastaz gözlemlendiğini ifade eder (45).

Çizelge 1. Genel TNM Evreleme Tanımlayıcıları

T Tanımlayıcısı (Tümör boyutu ve kapsamı)	
Tx	Tümör değerlendirilemiyor
Tis	Karsinoma in situ
T0	Primer tümör kanıtı yok
T1	Tümör boyutu ≤ 3 cm
T2	$3\text{cm} < \text{Tümör Boyutu} \leq 5\text{cm}$
T3	$5\text{cm} < \text{Tümör Boyutu} \leq 7\text{cm}$
T4	$7\text{cm} < \text{Tümör boyutu}$
N Tanımlayıcısı (Tümörün lenf nodlarına yayılım durumu)	
Nx	Bölgesel lenf nodu değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	İpsilateral pulmoner veya hiler nodlarda metastaz
N2	Aynı taraf mediastinal veya subkarinal nodlarda metastaz
N3	Kontralateral mediastinal, hiler veya supraklaviküler nodlarda metastaz
M Tanımlayıcısı (Uzak metastaz durumu)	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var

2.3. PI3K (Fosfoinositid 3-Kinaz) Sinyal Yolağı

PI3K (Fosfoinositid 3-kinaz) sinyal yolağı hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde, hücre proliferasyonu, hücre büyümesi, hücre farklılaşması, invazyon, apoptozis, migrasyon ve hücre sağ kalımı gibi çeşitli süreçlerde kilit rol oynamaktadır (46,47).

PI3K'ler, inositol fosfolipidlerinde inositol halkası 3'-OH grubunu fosforile etme yeteneği ile karakterize edilen bir lipid kinaz ailesini oluşturur. Üç PI3K sınıfı vardır: I, II ve III. Sınıf I PI3K'ler, bir katalitik (p110) ve bir düzenleyici (p85) alt birimden oluşan heterodimerlerdir ve IA ile IB olmak üzere iki alt sınıfa ayrılmaktadır. Protein tirozin kinaz aktivitesine sahip reseptörler tarafından aktive edilen IA alt sınıfı PI3K α , β ve δ şeklinde izoformları bulunmakta ve sırasıyla PIK3CA, PIK3CB ve PIK3CD genlerinden kodlanmaktadır. IB alt sınıfı ise G-protein aracılı reseptörler tarafından aktive edilmektedir. Sınıf II PI3K'ler, P13KC2 α , P13KC2 β ve P13KC2 γ olmak üzere üç üyeden oluşurken, Sınıf III, VpS34 geni tarafından kodlanan yalnızca bir üye içermektedir (48,49).

Büyüme faktörü veya ligandların, özgül reseptör tirozin kinazlara (RTK) bağlanması, tirozin kalıntıları üzerinde otofosforilasyona neden olur. Daha sonra PI3K aktive olmuş tirozin kinaz reseptörlerine kendi SH2 bölgesinden bağlanır. Bu bağlanma ile PI3K, fosfatidilinositol-4,5-bifosfat substratından (PI-4,5 yani PIP₂) ikinci haberci fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfata (PI3,4,5-P3 yani PIP₃) çevrilmesine yol açar. PIP₃, Akt (Protein kinaz B (PKB) olarak da bilinmektedir) ve 3'-fosfoinositide bağımlı kinaz 1 (PDK1) gibi serin/treonin kinazların plekstrin homoloji (PH) bölgeleri ile etkileşime girer (49,50). Akt, PIP₃'e bağlandığında PDK1 tarafından Thr308 ve mTORC2 kompleksi tarafından Ser473 rezidülerinden fosforillenerek aktive olur. Akt fosforilasyonu, hücre sağ kalımı ve hücre döngüsü ilerlemesinde yer alan birkaç hücre sürecini düzenler (51). Hücre hayatta kalması söz konusu olduğunda, Akt, Bad ve Procaspase-9 gibi proapoptotik faktörlerin yanı sıra Fas-ligand (FasL) gibi diğer proapoptotik faktörlerin ekspresyonunu indükleyen Forkhead transkripsiyon faktörleri ailesini etkisiz hale getirebilmektedir (49,50).

mTOR (memeli rapamisin hedefi) da bir serin/treonin kinazdır. Bu yolak hücre büyümesini düzenler. Ayrıca HIF-1 α translasyonunu artırır, dolayısıyla VEGF'nin ekspresyonunu da arttırmaktadır. Yapısal ve işlevsel olarak farklı iki kompleks,

mTORC1 ve mTORC2 oluşturmak için farklı proteinlerle birleşir. mTORC1, Akt tarafından aktive edilir. mTORC1, S6K'yı aktive, eIF4E'yi ise inhibe ederek protein translasyonu ve hücre büyümesini destekler. mTORC2 kompleksi ise Akt'yi fosforile eden ve aktivasyonunu sağlayan protein kinazlardan bir tanesidir.

Buna ek olarak, kromozom 10 üzerinde silinmiş fosfataz ve tensin homologu (PTEN), hücre proliferasyonu, hücre döngüsü ilerlemesi ve hayatta kalma gibi çoklu hücre fonksiyonlarda PI3K/Akt sinyalinin moleküler bir inhibitörü olarak görev almaktadır. PTEN tümör baskılayıcı geni birçok kanserde delesyon ya da mutasyona uğramıştır (52).

PI3K/Akt/mTOR yolu küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde çoğu zaman aktiftir (53).

2.4. Anjiyogenez Mekanizması

Kan damarları vücudun tüm bölgelerine oksijen ve besin sağladığı gibi, tümör dokularını da beslemektedir. Yeni kan ve lenf damarların oluşum süreci anlamına gelen anjiyogenez 4 adımda gerçekleşmektedir: 1) Proteazlar aracılığıyla bazal membran ve ekstrasellüler matriksin yıkılması, 2) Endotel hücrelerinin komşu stromaya göçü, 3) Endotel hücrelerinin proliferasyonu, 4) Lümen oluşumu ve olgunlaşması, damar stabilizasyonu ve ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi (54).

Fizyolojik koşullar altında anjiyogenez, oldukça sıkı düzenlenmiş bir süreç olup embriyogenez, yara iyileşmesi ve menstrual döngüde çok önemli roller oynamaktadır. Yeni damar oluşumu, tümör hücrelerine besin-oksijen sağlama ve metabolik atıkların uzaklaştırılmasına ek olarak, kanser hücrelerinin metastazını ve çoğalmalarını da sağlamaktadır. Öte yandan, yeterli besin kaynağının olmaması, tümör büyümesini durdurabilir ve hatta tümörün küçülmesine ve bazen ölümüne yol açabilmektedir (55). Anjiyogenezin olmadığı durumlarda, tümörler 1-2mm³ boyutuna ulaştıktan sonra büyümesi dururken, anjiyogenezin mümkün olduğu koşullarda tümör boyutları 2mm³'ten fazla büyüebilmektedir (21,55).

Normal dokuda neovaskülarizasyon süreci sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Anjiyogenez, birkaç büyüme faktörü uyarıcısı (pro-anjiyogenik) ve inhibitörü (anti-anjiyogenik) tarafından kontrol edilir. Anjiyogenik (uyarıcı) büyüme faktörleri arasında FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü), anjiyogenin, GCSF (Granülosit

Koloni Uyarıcı Faktör), IL-8, TGF- α / β , TNF- α ve VEGF yer alır. Anjiyogenik inhibitörler arasında ise Anjiostatin, Interferonlar (alfa, beta ve gama), Endostatin, IL-12 ve retinoidler bulunur. Tümör anjiyogenezinde pro- ve anti-anjiyogenik faktörler arasındaki denge bozularak, artan pro-anjiyogenik ve azalan anti-anjiyogenik faktörlerin varlığı görülmektedir (21,55,56).

Pro-anjiyogenik faktörler arasında VEGF hem fizyolojik hem de patolojik anjiyogenez sürecinin ana düzenleyicisidir. VEGF, otokrin ve parakrin sinyal iletimi aracılığıyla; karmaşık süreçlerde etkili olabilmektedir (55). VEGF'nin VEGFR-2'ye bağlanması, tümör anjiyogenezinde önemli rol oynamaktadır ve otokrin VEGF-VEGFR-2 sinyal iletim yolağı, tümör ilerlemesini ve göçünü destekleyebilmektedir. Tümör metastazında görev alan Matriks Metalloproteinaz (MMP) ailesi, kollajeni bozar ve hücre dışı matriks ve bazal membrandan matriks moleküllerini uzaklaştırır. VEGF otokrin sinyal iletimi ile, Epitelyal Mezenkimal Geçişin (EMT) aktivasyonuna katkıda bulunarak tümör oluşumunu başlatabilmektedir. EMT, epitel hücrelerinin epitel özelliklerini kaybettiği ve mezenkimal özellikler kazandığı bir süreçtir (57). EMT, hücre-hücre adezyon kaybı ve hücre iskeleti değişikliklerine yol açabilmekte, aynı zamanda hücre dışı matriksi (ECM) yıkımını sağlayan matriks metalloproteazlar ve serin proteazlar dahil olmak üzere çeşitli proteolitik enzimlerin üretimini sağlar. Böylece EMT de, kanser hücrelerinin invazyon ve metastazına katkıda bulunmaktadır (55).

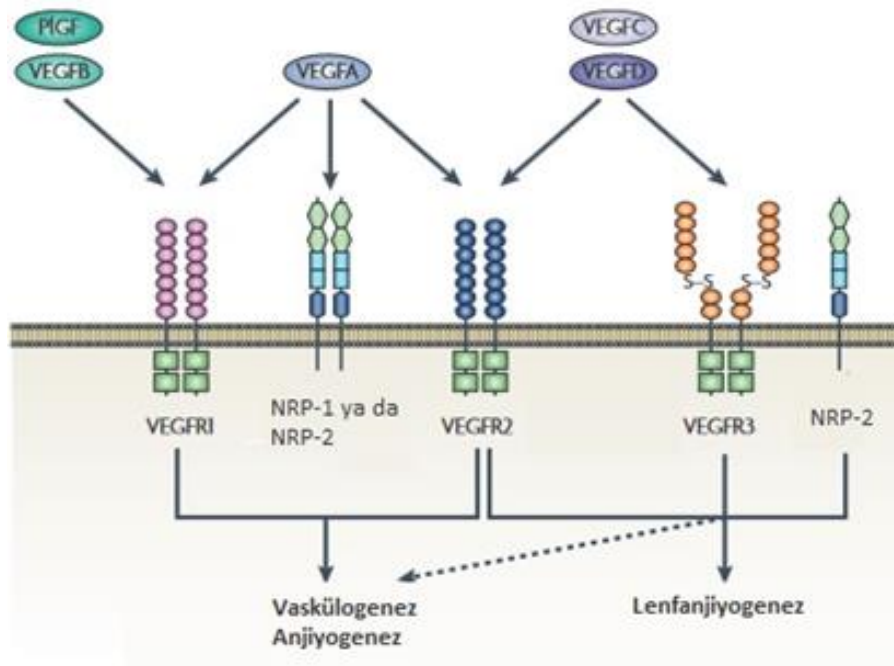
2.5. Anjiyogenezde VEGF ve VEGFR

Anjiyogenezin indüklenmesi, kanser hücrelerinin temel özelliği olmakla birlikte, hastalığın ilerlemesinde oldukça önemli bir süreçtir. VEGF (Vasküler endotelial büyüme faktörü) ve VEGF reseptörleri (VEGFR'ler), anjiyogenezde merkezi bir rol oynar. Endotelial hücre proliferasyonunu, göçünü ve invazyonunu teşvik eder. VEGF, mevcut damarların vasküler geçirgenliğini uyararak, üzerinde aktive edilmiş endotel hücrelerinin göç ettiği geçici bir iskele oluşturan plazma proteinlerinin ekstravazasyonunu artırır (31).

VEGF ailesi, VEGF-A (ya da sadece VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D (FIGF) ve plasenta büyüme faktörü (PlGF ya da PGF) olarak adlandırılan beş glikoproteinden oluşur (31,58). VEGF-B kalp, iskelet kası ve pankreas gibi dokularda

oldukça fazla bulunur ve endotel hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır (59). VEGF-C ve VEGF-D lenfanjiyogenezin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (60). VEGF ailesi üyesinin en önemlileri, alternatif splayzing aracılığı ile 121-, 165-, 189- ve 206- gibi çeşitli izoformlara da sahip VEGF-A'dır. VEGF-165, çeşitli insan tümörlerinde aşırı eksprese olan esas izoformdur. VEGF-A geni, kromozomun 6p21.2 bölgesinde lokalizedir ve sekiz ekzon ile yedi introndan oluşmaktadır (31,58). Ayrıca insanlarda bulunmayan VEGF-E ve VEGF-F gibi glikoproteinler de vardır. VEGF-E parapox virüslerinde bulunurken, VEGF-F yılan zehrinde kodlanmaktadır (61,62).

VEGF ligandları, üç tip RTK'ya bağlanabilmektedir: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR, Flk-1) ve VEGFR-3 (Flt-4). Bu üç tip arasında VEGFR-1 ve VEGFR-2 esas olarak endotel hücrelerinde işlev görürken, VEGFR-3 lenfatik endotelde bulunur. Ayrıca VEGFR'ler için koreseptörler olarak işlev gören transmembran reseptörler de vardır. Bunlar Nöropilinler (NRP-1, NRP-2) olarak bilinmektedir ve VEGF'nin VEGFR'ye bağlanma afinitesini arttırmaktadır (58). VEGF ve VEGF-B, VEGF reseptörü-1'e (VEGFR-1 veya Flt-1) bağlanır. VEGF, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E, Flk-1/KDR olarak da adlandırılan VEGFR-2'ye bağlanırken, VEGF-C ve VEGF-D de Flt-4 olarak bilinen VEGFR-3'e bağlanır (Şekil 5) (58,63).



Şekil 5. VEGF reseptör ve ligandları (58)

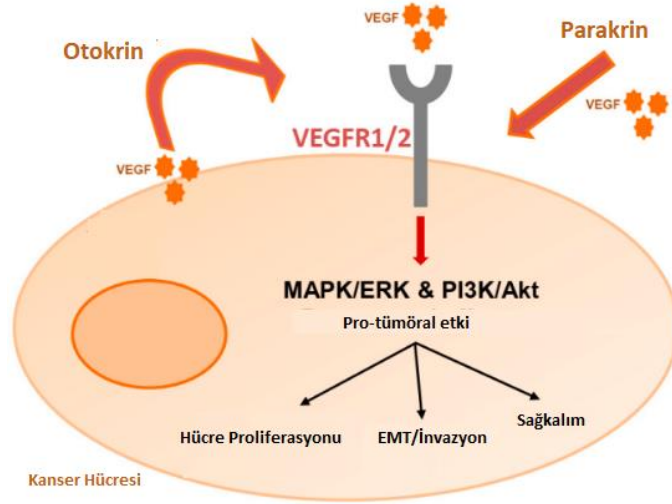
VEGFR'nin hücre dışı alanı VEGF'ye bağlanır ve hücre içi tirozin kinaz alanının dimerizasyonu ve fosforilasyonu ile aşağı yönde proteinlerin aktivasyonuna yol açar. Bu nedenle, VEGFR'ler neovaskülarizasyonda, hücre sağ kalımını ve göçünü destekler. Benzer şekilde VEGF, tümör metastazı ve anjiyogeneze aracılık etmek için PI3K/Akt yolunu aktive eden VEGF/VEGFR-2 dimerlerini oluşturur.

PI3K/Akt sinyal yolunun VEGFR-2 aracılı aktivasyonu, tümörün hayatta kalması için önemlidir. Ligandın VEGFR-2'ye bağlanması, PI3K'yı aktive eder ve PIP2'nin fosforilasyonunu sağlar, bu da PI3K/Akt sinyal yolunu aktive etmek için PIP3'ün birikmesi ve yeniden aktivasyonu ile sonuçlanır. PI3K/Akt/mTOR sinyal yolu inhibitörleri ile kombinasyon halinde kullanılan VEGFR inhibitörleri, etkili bir terapötik stratejiyi temsil eder (64).

Çeşitli çalışmalarda en önemli anjiyogenik faktörlerden olan VEGF-A ile VEGFR-2'nin akciğer kanseri hücrelerinde eksprese olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda akciğer tümör hücrelerinin otokrin sinyal yolunu kullanarak çeşitli yollar üzerine etkisi olduğu belirtilmiştir (65–67) .

2.6. Kanserde VEGF/VEGFR Yolağının Anjiyogenik Olmayan Etkileri

Pro-anjiyogenik faktörlerden VEGF'nin salınımı birçok solid tümör ve hematolojik malignitelerde tanımlanmıştır. Başlangıçta VEGF sinyalizasyonu üzerine yapılan araştırmalar, endotelial hücreler üzerine yoğunlaşmıştır. Bu hücrelerdeki VEGF sinyal iletiminin anjiyogenezi uyarmasının, kanser ilerlemesi ve metastazın birincil mekanizması olduğu düşünülüyordu (67). Fakat yıllar içinde endotelial olmayan hücrelerde de VEGFR-2'nin ifade edildiği tespit edilmiştir (65,68–71). Bu tespitler VEGF'nin sadece parakrin sinyal iletimini değil aynı zamanda otokrin sinyal iletimini de kullanarak tümör büyümesini uyarabildiğini göstermiştir. Otokrin sinyal iletimi EMT, MAPK/ERK ve PI3K sinyal yolağını tetikleyebilmektedir. KHDAK'de VEGF/VEGFR-2'nin otokrin sinyal iletimi MAPK/ERK ve PI3K sinyal yolağını indüklemektedir(67,72). Otokrin VEGF sinyali ve ardından VEGFR dimerizasyonu ile bu yolların aktivasyonu, kanser hücrelerinin sağkalımı, çoğalması ve invazyonunu teşvik etmektedir. Ayrıca NRP-1 ifade eden hücrelerin tümör büyümesini ve proliferasyonunu uyarmaktadır (67).



Şekil 6. Kanser hücrelerinde VEGF-VEGFR-2 etkileşiminin anjiyogenik olmayan etkileri (67).

2.7. VEGF aracılı PI3K/Akt Yolağı Aktivasyonu

PI3K/Akt yolağı, sadece normal hücrelerin sinyal iletiminde değil, aynı zamanda kanser gelişimi için de önemlidir. Bu yolak hücre proliferasyonu, migrasyon, invazyon, metabolizma, sağ kalım ve anjiyogenez dahil olmak üzere çok sayıda hücre fonksiyonunda kilit bir rol oynamaktadır (48).

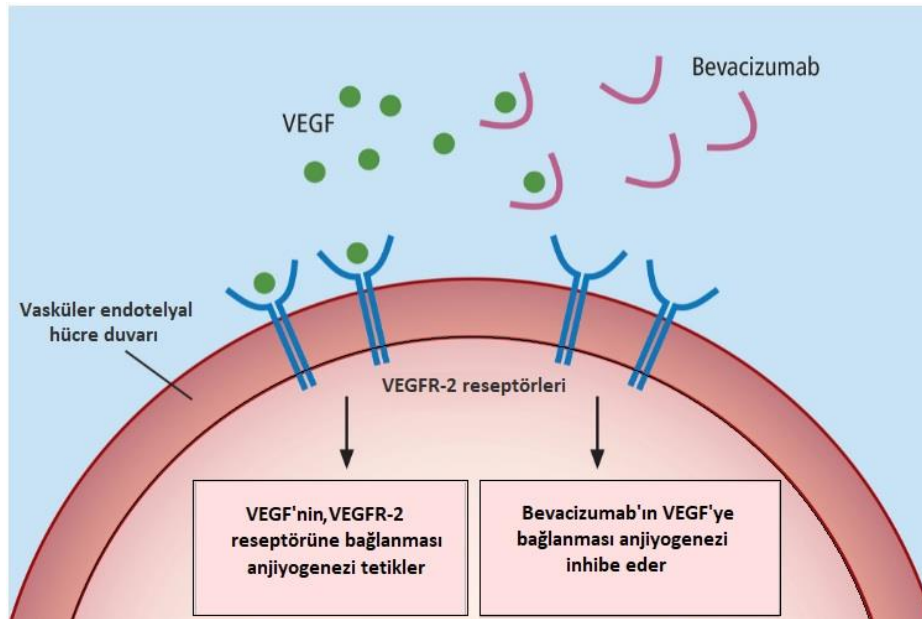
Tümör hücreleri tarafından salgılanan VEGF, etkinliğini VEGFR-2'ye bağlanarak göstermektedir (63). VEGFR-2'nin endotelial hücrelerde VEGF tarafından yönlendirilen yanıtların ana aracısı olduğuna dair çok sayıda kanıt vardır ve hem fizyolojik hem de patolojik anjiyogenezde çok önemli bir sinyal dönüştürücü olduğu kabul edilmektedir. VEGF'nin VEGFR-2'ye bağlanması, hücrelerin sağ kalımı, proliferasyonu, anjiyogenez ve migrasyonu olmak üzere çeşitli sinyal yollarının regülasyonunda görev almaktadır. Örneğin, VEGF'nin VEGFR-2'ye bağlanması, reseptörün dimerizasyonuna ve ardından mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve PI3K/Akt gibi yolların aktivasyonuna neden olabilmektedir (Şekil 7) (73).

arasındaki dengenin, bir hücrenin hayatta kalacağını mı yoksa apoptoza mı gideceğini belirlemektedir (75).

2.9. Bevacizumab

Kanser hücreleri oksijen ve besin ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla anjiyogenez mekanizmasıyla yeni damar oluşturma yeteneğine sahiptir. Tümör hücreleri VEGF gibi çok sayıda büyüme faktörü salgılayabilmektedir. VEGF, endotel hücre yüzeylerinde bulunan reseptörlerine (VEGFR-1 ve VEGFR-2 gibi) bağlanarak anjiyogenezi tetiklemektedir. Bu özellik kanser hücrelerinin metastazını ve dolayısıyla daha malign hale gelmesine neden olmaktadır. Bu nedenle kanser hücrelerinin bu özelliğini inhibe edecek stratejiler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bunlardan bir tanesi de anti-anjiyogenik ajan olarak kullanılan Bevacizumab'tır.

Bevacizumab, FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) onaylı ilk anti-anjiyogenik monoklonal antikordur. VEGF'ye bağlanarak VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörlerine bağlanmayı inhibe eden rekombinant, humanize bir IgG1 monoklonal antikordur.



Şekil 8. Bevacizumab'ın etki mekanizması (6)

Bevacizumab, VEGF-A proteinine spesifik olarak bağlanır ve böylece anjiyogenez sürecini inhibe eder (Şekil 8). Çalışmalar, anti-VEGF ajanlarının mevcut mikrodamarların gerilemesi, hayatta kalan olgun damar sisteminin normalleşmesi ve

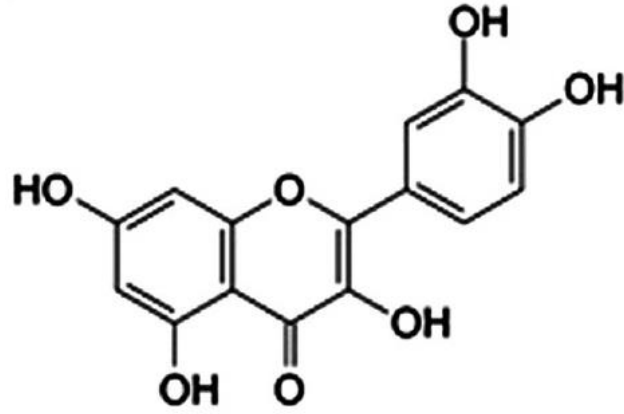
damar büyümesi ve neovaskülarizasyonun inhibisyonu ile sonuçlandığını göstermiştir. VEGF ligand inhibisyonunun sürdürülmesi, tümör büyümesini önleyebilir ve zamanla tümörün küçülmesine neden olabilir (6).

2.10. Flavonoidler

Flavonoidler, bitkilerde renk, tat ve farmakolojik aktivitelerden sorumlu biyoaktif ikincil metabolitler olarak sentezlenen polifenolik bileşiklerdir. Ana flavonoid kaynakları meyve ve sebzelerdir. Ayrıca kakao ürünleri (kakao tozu, çikolata), siyah çay, yeşil çay ve kırmızı şarapta da bol miktarda bulunurlar. Meyveler arasında çilek, erik, kiraz ve elma flavonoidler açısından en zenginken, tropikal meyveler flavonoidler açısından fakirdir. Sebzeler arasında en yüksek flavonoid seviyeleri soğan, bakla, zeytin ve ıspanakta bulunur. Flavonoidler, bitkileri olumsuz çevre koşullarından koruyan güçlü antioksidanlardır, bu nedenle dikkat çekmişler ve birçok akut ve kronik insan hastalığında olası yararlı etkilerini değerlendirmek için çok sayıda epidemiyolojik ve deneysel çalışmada kullanılmıştır. Flavonoidler 6 gruba ayrılan polifenolik bileşiklerdir: izoflavonoidler, flavanonlar, flavanoller, flavonoller, flavonlar ve çeşitli bitkilerde bulunan antosiyanidinler. *In vitro* ve *in vivo* çalışmalar, flavonoidlerin anti-inflamatuar, immünomodülatör ve güçlü antikanser aktiviteleri gösterebileceğini göstermiştir. Ayrıca flavonoidlerin, serbest radikalleri temizleme, hücre metabolizmayı düzenleme ve oksidatif stresle ilişkili hastalıkları önleme yetenekleri olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Flavonoidler arasında meyve ve sebzelerde en fazla bulunan kuersetindir (76).

2.10.1. Kuersetin

Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) (Şekil 9), flavonoidler grubuna ait bir antioksidan flavonoldür. Antioksidanlar, serbest radikallerin neden olduğu patolojik koşulları iyileştirmeye yardımcı olan doğal veya sentetik takviyelerdir. Meyve ve sebzelerde en bol bulunan flavonoidlerdendir (77).



Şekil 9. Kuersetinin kimyasal yapısı (77)

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif stres, kanser başta olmak üzere birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. Oksidatif stres, vücuttaki oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. ROS'ların çeşitli nedenlerden dolayı aşırı üretimi veya antioksidan sistemlerin yetersizliği bu radikallerin birikimine ve hücre membranında hasar, proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında bozulma ve DNA'da yapısal hasarlara da neden olmaktadır. Kuersetin oksidan ve antioksidan arasındaki dengeyi düzenleyerek oksidatif stresi engelleme yeteneğine sahiptir (78,79).

Ticari olarak da temin edilebilen Kuersetinin, oral yoldan günlük önerilen dozu 1 g'dır. Kuersetinin antioksidan, diyabet ve iltihap önleyici dahil olmak üzere çeşitli farmakolojik etkileri rapor edilmiştir. Fakat üzerinde durulan ve çeşitli çalışmalar yapılan en önemli etkisi, antikanser özelliğidir (80).

Kuersetin, tümör oluşumunu inhibe etmek ya da tersine çevirmek için modülatörler olarak sinyal iletim yolları üzerinde etki eden bir kanser koruyucusu olarak kabul edilmektedir. Bu aktivitesi ile kuersetin apoptoz, hücre göçü, farklılaşma ve çoğalma, oksidatif denge, inflamasyon ve yara iyileşmesi gibi birçok süreçte etki göstermektedir (81).

Kuersetin ayrıca kan damar büyümesini engelleyerek anti-anjiyogenezde de rol oynamaktadır. Kuersetin, VEGFR-2 aracılı anjiyogenez yolunu hedefler, akış aşağı düzenleyici faktör AKT'nin ekspresyonunu baskılar ve tümör büyümesini sınırlamaktadır. Kuersetin, ilaca dirençli hücrelerin anjiyogenezini sınırlayabilir ve kanser önleyici ilaçların etkisini artırabilir (5).

Kuersetinin ayrıca kanser hücrelerinde VEGF/VEGFR-2 ve PI3K/Akt sinyal yollarını baskılayarak mitokondriye hücre ölümü sinyalini ilettiğine ve nihayetinde kaspaz bağımlı hücre ölümüne de yol açtığı öne sürülmüştür (82).

Daha önceki araştırmalar, kuersetinin anti-inflamatuar, anti-oksidan ve anti-kanser gibi birçok etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda, kuersetinin hücre döngüsü ilerlemesini değiştirmesi, apoptozu teşvik etmesi, hücre proliferasyonunu, anjiyogenezi ve metastaz ilerlemesini inhibe etmesi ve otofajiyi etkilemesi gibi anti-tümör etkileri gösterildiğinden, gelecekte kuersetinin kanser tedavilerinde potansiyel tedavi fırsatı olması beklenmektedir (5).

2.11. Kanser Tedavisinde Kombine İlaç Uygulamaları

Malign hastalıkları tedavi etmek için kaydedilen girişimler çok eskilere dayanmaktadır. Ancak modern kemoterapinin doğuşu II. Dünya Savaşı'nda kükürtlü hardal gazının kimyasal silah olarak kullanılmasıyla başlamıştır. O dönemde hardal gazına maruz kalan birey ve askerlerde lenfosit sayısının düştüğü ve bu gazın hücre öldürücü özelliklerinin, hücre çoğalma hızı ile doğru orantılı olduğu gözlenmiştir. Hardal gazının bu fizyolojik özelliği, ilk antikanser ilacı olarak hardal azotunun uygulanmasına yol açmıştır. Kanserli hücrelerin toksik ajanlar için tercih edilen bir hedef olduğunun keşfi umut vericiydi, ancak vakaların büyük çoğunluğunda hardal gazı türevlerinin kanser hastaları üzerindeki terapötik etkisi geçiciydi ve hastalığın kısa bir süre sonra tekrar nüksettiği gözlenmiştir (4).

Günümüzde kullanılan kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel mono-terapötik yöntemler, nonspesifik olarak hem sağlıklı hem de kanserli hücrelerin yok edilmesine neden olmaktadır. Bu nedenle hastalarda ciddi yan etkilere sebep olmakta ve kemik iliği hücrelerini de etkileyerek immün sisteminin faaliyetini azaltabilmektedir.

Monoterapötik uygulamalarda, tek bir bileşikle gerçekleştirilen sürekli tedavinin, kanser hücrelerini alternatif kurtarma yollarını kullanmaya teşvik etmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan monoterapötik geleneksel yöntemlerin hastalarda istenen sonucu karşılayamaması ve ilaç direnci nedeniyle başarısız olması farklı tedavi yöntemlerine yönelimi arttırmıştır. Bunlardan bir tanesi de kombine tedaviler ya da politerapidir. İki ya da daha fazla terapötik ajanın kullanımı ile gerçekleştirilen kombine tedavi, kanser hücrelerin hedeflenmesinin temel taşıdır. Kanser önleyici ilaçların birleştirilmesi,

monoterapi uygulamalarına kıyasla etkinliğinin daha fazla olması beklenmektedir. Bunun sebebi ise bazı kombine ilaÇ uygulamalarının farklı yolları hedeflemesi ve sinerjik olarak çalışabilmesidir. Ayrıca kombine tedavi, kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etkilere sebep olurken normal hücre üzerindeki toksik etkileri önleyebildiği ileri sürülmektedir (83).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araç ve Gereçler

Çalışmamız Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Bu çalışmada kullanılan kimyasallar, cihazlar ve teknik malzemeler temin edildikleri firmalarla birlikte aşağıda verilmiştir.

3.1.1. Kimyasal Malzemeler

- Trypan Blue (VWR Life Science)
- Besiyeri (DMEM ve RPMI Medium 1640- Gibco)
- Tripsin-EDTA (Hyclone)
- MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide -VWR Life Science)
- SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) -Fisher Bioreagents
- 1M Tris- HCl pH8 (Tris Hydrochloride 1M Solution- Fisher Bioreagents)
- ddH₂O (AMBION)
- Kristal viyole (Fisher Scientific)
- Metanol (Fisher Scientific)
- FBS (Fetal Sığır Serumu-Hyclone)
- Penisilin/Streptomisin Solüsyonu (Hyclone)
- Tris Hydrochloride (Fisher)
- PBS (Phosphate Buffered Saline-Hyclone)
- Primerler (Macrogen)
- Trizol (Thermo Fisher Scientific)
- Kloroform (Fisher)
- İzopropanol (Fisher)
- Bevacizumab (Altuzan)
- Kuersetin (Sigma)

3.1.2. Cihazlar ve Teknik Malzemeler

- Biyogüvenlik Kabini Sınıf II (Thermo Fisher Scientific)
- Thoma Lamı
- Hassas Terazı (Sartorius)
- CO₂ inkübatörü (Thermo Scientific HERAcell vıos 160i)
- Işık Mikroskobu (Nikon)
- İnverted Faz Kontrast Mikroskop (Leica)
- Santrifüj (Eppendorf)
- Soğutmalı Santrifüj (Sigma)
- +4/-20 °C (Fisher Scientific)
- -80 °C (Thermo Sientific)
- Mikrosantrifüj (Eppendorf)
- Thermal Cyclers (BioRad)
- Real Time PCR cihazı (Applied Biosystem)
- Vortex (VWR)
- Otoklav (Trans)
- Isı Bloğu (BioRad)
- Nanodrop (Thermo Scientific Spektofotometre)
- Blotlama cihazı (İnvitrogen iBlot)
- ELISA Plaka Okuyucu (Biochrom EZ Read 400)


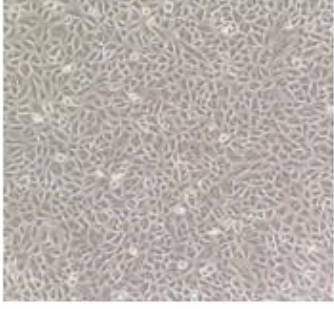
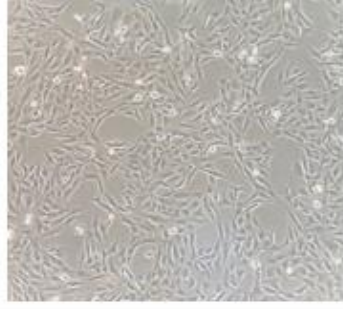
3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre Hatlarının Hazırlanması ve Kültürü

Çalışmamızda 3 farklı insan akciğer hücre hattı ile çalışıldı. Bunlardan A549 ve H1299 KHDAK hücre hattı olup, BEAS-2B normal akciğer hücre hattıdır. H1299 hücre hattı Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden, BEAS-2B hücre hattı Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, A549 hücre hattı ise Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'mızın koleksiyonundan temin edilmiştir.

Hücre hatları çalışılmak üzere -80°C'den çıkarılarak, hücre çözme işlemine tabi tutulmuştur. Daha sonra T75'lik flasklarda kültüre edilmiştir. A549 ve H1299 hücre hatları için DMEM, BEAS-2B için ise RPMI-1640 besiyeri kullanıldı. Bu hücre hatları,

%10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin ve streptomisin ilave edilmiş besiyerlerde 37°C’de, %5 CO₂ ortamında kültüre edilmiştir. %80-90 yoğunluğa ulaşan hücreler, hücre dondurma işlemine tabi tutularak, -80°C’de stoklanmıştır. Hücre hatlarının dondurulmasında %90 FBS ve %10 DMSO kullanılmıştır.

Çalışmamızda Kullanılan İnsan Akciğer Hücre Hatları		
		
A549	H1299	BEAS-2B
Epitelyal	Epitelyal	Epitelyal
KHDAK hücre hattı	KHDAK hücre hattı	Normal akciğer hücre hattı
Adherent	Adherent	Adherent

Şekil 10. Çalışmamızda kullanılan hücre hatları ve temel özellikleri

Çalışmamızda her hücre hattı için; kontrol (herhangi bir ilaç uygulanmayan grup), Kuersetin uygulanan, Bevacizumab uygulanan ve Kuersetin+Bevacizumab (Kue+Bev) kombinasyonu olacak şekilde 4 grup oluşturulmuştur (Çizelge 2).

Çizelge 2. Çalışmamızdaki gruplar ve uygulanan dozlar

Gruplar/Hücre Hatları	Kontrol	Kuersetin	Bevacizumab	Kue+Bev
A549	-	5-400 μ M	5- 400 μ g/ml	10 μ M Kue+100 μ g/ml Bev 20 μ M Kue+75 μ g/ml Bev 20 μ M Kue+100 μ g/ml Bev 50 μ M Kue+50 μ g/ml Bev
H1299	-	5-400 μ M	5- 400 μ g/ml	10 μ M Kue+100 μ g/ml Bev 20 μ M Kue+75 μ g/ml Bev 20 μ M Kue+100 μ g/ml Bev 50 μ M Kue+50 μ g/ml Bev
BEAS-2B	-	5-400 μ M	5- 400 μ g/ml	10 μ M Kue+100 μ g/ml Bev 20 μ M Kue+75 μ g/ml Bev 20 μ M Kue+100 μ g/ml Bev 50 μ M Kue+50 μ g/ml Bev

3.2.2. Hücre Canlılık Testi: MTT

Sitotoksosite ve hücre canlılığın belirlenmesi amacıyla kullanılan en yaygın yöntemlerden bir tanesidir. Bu test mitokondriyal bir enzim olan dehidrojenaz aktivitesini ölçmektedir. Mevcut canlı ve proliferasyona uğrayan hücrelerin artan mitokondriyal dehidrojenaz enzim aktivitesi sarı renkli MTT'yi mor renkli formazan kristallerine indirgemektedir. Bu testin aşamaları aşağıdaki gibidir;

- Thoma lamı ile hücre sayımı yapıldı.
- Her kuyucuğa 10000 hücre gelecek şekilde 96'lık plakaya her doz için 3 tekrar olacak şekilde ekim yapıldı.
- Plaka 37 °C, %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde 1 gün süre ile büyümeye bırakıldı.
- 24 saatlik inkübasyondan sonra ilaç uygulaması yapıldı ve kullanılan ilaca bağlı olarak plaka 1-3 gün boyunca inkübatörde bekletildi.
- MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide) boyası 5g/ml olacak şekilde PBS'te hazırlandı ve filtreden geçirildi.
- Belirlenen bekleme süresi (24, 48 ve 72 saat sonra) tamamlandıktan sonra her kuyucuğa 10 μ l 5g/ml MTT solüsyonu eklendi.

- Boya eklendikten sonra 96 kuyucuklu plaka 37 °C' de %5 CO₂ ortamında 4 saat inkübe edildi.
- 4 saatlik bekleme süresinin sonunda boyanın üzerine 100 µl çözünürleştirme solüsyonu eklendi.
- Çözünürleştirme solüsyonu: 10 ml %20 SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 200 µl 1M Tris- HCl pH8 (Tris Hydrochloride 1M Solution), 9.8 ml ddH₂O karışımından oluşur.
- Yaklaşık 12 saatlik inkübasyondan sonra ELISA plaka okuyucuda 570 nm'de absorbans değeri ölçüldü.
- MTT verilerini değerlendirmek ve canlı hücrelerin yüzdesini hesaplamak için aşağıdaki formül kullanıldı:

$$\text{Canlılık (\%)} = \frac{(\text{Örnek absorbans değeri} - \text{Blank absorbans değeri})}{(\text{Kontrol absorbans değeri} - \text{Blank absorbans değeri})} \times 100$$

Örnek: Besiyeri + Hücre + İlaç uygulaması + MTT solüsyonu + Çözünürleştirme solüsyonu

Kontrol: Besiyeri + Hücre+MTT solüsyonu+ Çözünürleştirme solüsyonu

Blank: Besiyeri+MTT solüsyonu+Çözünürleştirme solüsyonu

3.2.3. Kombinasyon İndeksinin (Combination Index-CI) Hesaplanması

Bevacizumab ve Kuersetin uygulamalarının A549 ve H1299 hücrelerindeki kombinasyon indeksi, aşağıdaki formülle hesaplandı;

$$CI = \frac{A \text{ ilacın konsantrasyonu}}{A \text{ ilacın IC}_{50} \text{ değeri}} + \frac{B \text{ ilacın konsantrasyonu}}{B \text{ ilacın IC}_{50} \text{ değeri}}$$

Hesaplamadan sonra bulunan CI değeri için;

CI > 1 ise antagonizm,

CI = 1 ise güçlendirici ve

CI < 1 ise sinerjizm olduğunu gösterir (84).

A549 ve H1299 hücrelerine uygulanan Kuersetinin 24 saat sonraki IC₅₀ değeri sırasıyla 80.0536 µM ve 80.3845 µM iken, Bevacizumab için sırasıyla 219.6916 µg/ml ve 190.7717 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu hesaplamaya göre sinerjik etki sağlayabilecek kombine dozlar Çizelge 2'de belirtildiği gibidir.

3.2.4. Hücre Canlılık Testi: Kristal Viyole Boyama

Hücre canlılığının belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntemdir. Bu yöntemde kristal viyole boyası adherent ve canlı hücrelerin DNA ve proteinlerine bağlanabilmektedir. Ölen hücreler adherent özelliklerini kaybettikleri için kristal viyole bu hücrelere bağlanamamaktadır. Dolayısıyla renk şiddetinde azalma ile sonuçlanmaktadır. Bu yöntemin aşamaları aşağıdaki gibidir;

- 12 kuyucuklu plakalara 3'lü tekrar olacak şekilde 70000 hücre ekildi.
- Plakalar 1 gün süre ile 37 °C, %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- 24 saat inkübasyondan sonra yeterli yoğunluğa ulaşan hücrelere belirlenen dozlarda ilaç uygulaması yapıldı. İlaç uygulamasından sonra hücreler 37°C, %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde 24 ve 48 saatlik inkübasyona bırakıldı.
- Plakalarda yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler iki kere PBS ile yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 400-500 µl kristal viyole eklendi. Plakalar 30 dakika oda koşullarında inkübe edildi.
- Kristal viyole solüsyonunun hazırlanması:
 - 0,5g kristal viyole tozu
 - 80 ml distile H₂O
 - 20 ml metanol

(Kristal viyole distile suda çözünür ve üzerine metanol eklenir. Boya karanlıkta oda sıcaklığında yaklaşık 2 ay saklanabilmektedir)

- Boyayı ortamdan uzaklaştırmak için iki kere PBS veya distile su ile yıkama yapıldı. Plakalar kurumaya bırakıldı.
- Verilerin değerlendirilmesi: Plakalar kuruduktan sonra fotoğrafları çekildi. Elde edilen fotoğraflardan Adobe Illustrator CS4 Programı ile hücre yoğunluğu hesaplandı.

3.2.5. Yara İyileşme Deneyi (Scratch/Wound Healing Assay)

Hücrelerin migrasyonunu izlemek ve ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin aşamaları aşağıda belirtildiği gibidir;

- 12 kuyucuklu plakalara 3'lü tekrar olacak şekilde 80000 hücre ekildi.

- Plakalar 1-2 gün süre ile 37 °C, %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde inkübasyona bırakıldı.
- Yeterli yoğunluğa ulaşan hücrelerdeki besiyeri aspire edildi ve PBS ile yıkandıktan sonra %0,05 FBS'li besiyerinde 37°C, %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde 16 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon süresinden sonra steril 200 µl pipet ucu ile vertikal olacak şekilde düz çizikler ile yara açıldı. Ardından %0,05 FBS'li besiyerinde belirlenen dozlarda ilaç uygulaması yapıldı ve mikroskop altında 0, 4, 8 ve 24 saat sonraki hücre göçlerini gözlemlemek amacıyla fotoğraflandı.
- Yara alanındaki kapanmalar, dolayısıyla hücre göçünü hesaplamak için ImageJ programı kullanıldı.

3.2.6. Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

Çizelge 4'te belirtilen genlerin ekspresyon miktarları RT-PCR (reverse transkriptase polimerase chain reaktion) yöntemi ile belirlendi. RT-PCR aşamaları aşağıdaki sırayla gerçekleştirildi.

3.2.6.1. Trizol ile RNA İzolasyonu

- 6 kuyucuklu plakalara ekilen %80 yoğunluktaki hücreler RNA izolasyonu için kullanıldı.
- Hücreler 2 ml PBS ile yıkandı.
- Hücrelerin üzerine buz üzerinde 1 ml Trizol eklendi.
- Trizol ile 5 dakika oda sıcaklığında homojenize edilen hücreler eppendorflara aktarıldı.
- Eppendorflara 1 ml trizol için 0.2 ml kloroform eklendi ve el yardımı ile karıştırılıp 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Oda sıcaklığında maksimum hızda (13000 rpm) 10 dakika santrifüj yapıldı.
- En üstte bulunan şeffaf faz yeni bir eppendorfa aktarıldı.
- Şeffaf fazın 1 mililitresi için üzerine 0.5 ml izopropanol eklendi. Vortex ile karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- 4 °C'de maksimum hızda (13000 rpm) 10 dakika santrifüj yapıldı.

- Üst faz atıldı ve pellet, kullanılan her 1 ml trizol için 1ml %75 etanol kullanılarak 2 kere yıkandı.
- Yıkama işlemi 4 °C’de maksimum hızda (13000 rpm) 5 dakika santrifüj ile gerçekleştirildi.
- Pellet oda sıcaklığında hafif nemli kalacak şekilde kurutuldu ve DEPC’li (diethyl pirokarbonat) suda çözdürüldü.
- RNA miktarı nanodrop ile ölçüldü A260/280 değeri 2 ve 2’ ye yakın çıkan RNA’lar -20 °C’de saklandı.

3.2.6.2. RNA’dan cDNA Eldesi

- RNA’dan cDNA (complementary DNA) elde edebilmek için Applied Biosystems High Capacity cDNA kiti kullanıldı. Reaksiyon aşağıdaki aşamalara uygun olarak buz üzerinde gerçekleştirildi.
- Kit bileşenleri buz üzerinde çözdürüldü.
- 20 µl reaksiyon için 500 ng RNA kullanıldı.
- Bileşenlerin volumü her bir örnek için aşağıda yer alan tabloda belirtildiği gibi hesaplandı.

Çizelge 3. cDNA kiti bileşenleri ve kullanılan miktarlar

Bileşen	Bileşen Volümü\Reaksiyon (µl)	
	+RT reaksiyonu	-RT kontrol
2x RT tampon	10.0	10.0
20x Enzim Karışımı	1	-
RNA Örneği	9 µl’ye kadar	9 µl’ye kadar
Nükleaz içermeyen H ₂ O	20 µl’ye tamamlayacak kadar	20 µl’ye tamamlayacak kadar
Her bir reaksiyon toplamı	20.0	20.0

- Reaksiyonlar PCR tüplerinde hazırlandıktan sonra vortex ve kısa süreli santrifüj yapıldı.
- Reaksiyon döngüleri termal cyclerda 37 °C’de 60 dakika 95 °C’de 5 dakika ve sonrasında 4°C’de bekletilecek şekilde ayarlandı.
- Örnekler uzun süreli kullanım için -20 °C’de saklandı.

3.2.6.3. Real-Time PCR aşaması

Çalışmamızda Real-Time PCR Reaksiyonunda kullanılan primerler Çizelge 4'te gösterilmiştir.

Çizelge 4. Çalışmamızda kullanılan primerler

Gen	Sekans (5' → 3')
Bcl-2	F: GGTGGGGTCATGTGTGTGG R: CGGTTTCAGGTA CT CAGTCATCC
Bax	F: CCCGAGAGGTCTTTTTCCGAG R: CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
Casp3	F: GTGAGGCGGTTGTAGAAGAGTT R: TCACGGCCTGGGATTTCAAG
Casp9	F: CTGTCTACGGCACAGATGGAT R: GGGACTCGTCTTCAGGGGAA
VEGFA	F: AGGGCAGAATCATCACGAAGT R: AGGGTCTCGATTGGATGGCA
VEGFR2	F: GTGATCGGAAATGACACTGGAG R: CATGTTGGTCACTAACAGAAGCA
PIK3CA	F: AGTAGGCAACCGTGAAGAAAAG R: GAGGTGAATTGAGGTCCCTAAGA
Akt	F: TCCTCCTCAAGAATGATGGCA R: GTGCGTTCGATGACAGTGGT
GAPDH	F: TTCACCACCATGGAGAAGGC R: GGCATGGACTGTGGTCATGAG

- Çalışmamızda SYBR green boyası kullanıldı.
- Her bir örnek için 3 reaksiyon hazırlandı.
- Bileşenlerin volümü her bir örnek için aşağıda yer alan tabloda belirtildiği gibi hesaplandı.

Çizelge 5. Real Time-PCR reaksiyonunun bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Bileşen Volümü/Reaksiyon µl
SYBR green	7.5 µl
Reverse+Forward Primer	4.5 µl (1 µM forward + reverse primer karışımından)
cDNA	1 µl (500ng RNA ile hazırlanan cDNA' dan)
Nükleaz içermeyen H ₂ O	2 µl
Her bir reaksiyon toplamı	15 µl

- Reaksiyonlar 96 kuyucuklu plakalara aktarıldı. Üzeri adheziv film ile kapatılan plakalar Real-Time PCR reaksiyonu gerçekleştirmek üzere Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR cihazına aktarıldı.

- Real-Time PCR döngüleri Çizelge 6’da belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

Çizelge 6. Real-Time PCR reaksiyonunun aşamaları

Isı Döngüsü Koşulları		
Aşama	Sıcaklık (°C)	Zaman (dd:ss)
Holding	50	2:00
	95	10:00
Döngü (40 Döngü)	95	0:15
	57	1:00
Melting Curve Aşaması	95	0:15
	40	1:00
	95	0:15
	80	1:00

3.3.6.4. Real Time RT-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Ekspresyon düzeylerini belirlemek için Threshold Cycle (CT) veya crossing points (Cp) değerleri arasındaki farklılıklar ölçülür. Eşik-değer döngü (Threshold Cycle = CT) değeri bize; üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. CT; sistem başladığından itibaren, üstel oranda ürün oluşması ve logaritmik lineer faza geçiş noktasıdır. Gen ekspresyon düzeylerini belirlemek için ΔC_p yöntemi kullanıldı. Sonuçlar aşağıdaki formül kullanılarak değerlendirildi:

$$\Delta C_p = C_p \text{ hedef gen} - C_p \text{ referans gen}$$

$$\Delta \Delta C_p = \Delta C_p \text{ muamele edilen} - \Delta C_p \text{ kontrol}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta \Delta C_p}$$

3.2.7. ELISA (EnzymeLinked ImmunoSorbent Assay) Deneyi

Çalışmamızda FineTest markalı Human Caspase-3, VEGF-A ve VEGFR-2 ELISA kitleri ile çalışılmıştır.

3.2.7.1. Protein İzolasyonu

- 6 kuyucuklu plakalara 250.000 hücre ekildi. Hücreler 37 °C, %5 CO₂'de inkübe edildi.

- %70-80 yoğunluğa ulaşan hücrelerden besiyeri uzaklaştırıldı.
- Plaka buz üzerine alındı ve hücreler soğuk ve magnezyum içeren PBS ile 2 kere yıkandı.
- Üzerlerine 500 µl soğuk PBS eklenen hücreler hücre kazıyıcısı ile kaldırılarak ependorfa aktarıldı.
- 6000 rpm'de 4 °C'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
- Üst kısım uzaklaştırıldı ve pellet üzerine pellet miktarına göre 100-150 mikrolitre RIPA solüsyonu eklendi. RIPA solüsyonu kullanılmadan önce 10 ml'ye 1 adet olacak şekilde proteaz inhibitör tableti eklendi. Proteinaz inhibitörü olarak complete Mini Protease Inhibitör Coctail tableti kullanıldı.

Çizelge 7. RIPA solüsyonu bileşenleri

RIPA SOLÜSYONU	
150 mM sodium chloride stok: 5M	1500 µl
1.0% Triton X-100 stok: %100	500 µl
0.5% sodium deoxycholate stok: %10	2500ml
0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate) stok: %20	250 µl
50 mM Tris Cl, pH 8 stok. 1M	2500 µl
ddH ₂ O	42,750 ml
Toplam	50 ml

- 3-4 sn sonikasyon yapılan örnekler 15 dakika buz üzerinde bekletildi.
- 20 dakika 10000 rpm'de 4 °C'de santrifüj yapıldı.
- Üst kısım (yaklaşık 100-130 µl) yeni bir tüpe aktarıldı ve protein örnekleri -80°C de saklandı.

3.2.7.2. Protein Miktarının Ölçümü

Protein Miktarı Bradford Assay kullanılarak ölçüldü. Bradford Assay Protokolü aşağıda belirtildiği gibi uygulandı.

- Çizelge 8'de özetlenen şekilde 6 farklı standart oluşturuldu

Çizelge 8. Protein ölçümü için standartların hazırlanması

Standart	Su (µl)	BSA (10mg/mL)	Son Konsantrasyon µg/mL
1	495	5µl BSA	100
2	250	250 µl standart 1	50
3	250	250 µl standart 2	25
4	250	250 µl standart 3	12,5
5	250	250 µl standart 4	6,25
6	250	-	0

- Düz zemine sahip 96 kuyulu mikroplate'lere duplike olacak şekilde 100 µl standart dağıtıldı. Boşta kalan kuyulara duplike olacak şekilde 98 µl su + 2 µl protein örneği duplike olacak şekilde eklendi. Plaka dizaynı aşağıdaki tablodaki gibi yapıldı:

Çizelge 9. Protein ölçümü için standartların ve örneklerin 96 kuyucuklu plakalara aktarımı

Kuyu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std1	Std1	Std2	Std2	Std3	Std3	Std4	Std4	Std5	Std5	Std6	Std6
B	Örnek1	Örnek1	Örnek2	Örnek2	Örnek3	Örnek3	Örnek4	Örnek4	Örnek5	Örnek5	Örnek6	Örnek6

- 5X stok Bio- Rad Protein Assay reaktifinden nükleaz içermeyen su kullanılarak 2x konsantrasyonu elde edildi ve standart ile örnekleri içeren kuyulara bu boyadan 100 µl eklendi.
- Plaka alüminyum folyo ile kaplanarak 37 °C'de 20 dakika bekletildi.
- Protein miktarını ölçmek için plaka okuyucu kullanıldı. 595 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.
- Sonuçlar excell'de değerlendirildi.
- Örnekler – 80 °C'de saklandı.

3.2.7.3. ELISA Plakalarının Hazırlanması ve Absorbans Ölçümü

Çalışmamızda Caspase-3, VEGF-A ve VEGFR-2 ELISA kitleri ile çalışılmıştır.

- Kit içerisinden çıkan standart solüsyonlar ve örnekler talimatlara göre hazırlandı. Çalışmaya başlamadan önce tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Çalışma, oda sıcaklığında gerçekleştirilirdi.
- Standart ve numuneler eklenmeden önce plaka 2 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı.

- Önceden hazırlanmış yedi ependorf tüpüne 300 µl dilüsyon tamponu eklendi. Kitin protokolünde belirtilen standart konsantrasyonları hazırlandı. 200 pg/mL stok standart çözeltisinden 300 µl alındı ve 300 µl standart solüsyonu ile seyreltildi. Bu çözeltiden de 300 µl alınıp ve üzerine 300 µl standart solüsyonu eklenerek seri dilüsyonlar ile konsantrasyonları (78.125, 156.25, 312.5, 625, 1250 ve 2500 pg/mL) olacak şekilde 6 standart hazırlandı.
- Hazırlanan standartlar ve hücre lizatından plakadaki her bir kuyucuğa 100 µl ilave edildi. Blank kuyucuğuna 100 µl standart solüsyonu eklendi.
- Plakanın üzeri yapışkan koruyucu membran ile kapatılarak, 37°C ve 90 dakika inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 100 µl biotin ile işaretlenmiş antikor solüsyonu eklendi ve tekrar 37°C ve 60 dakika inkübe edildi.
- Yıkama solüsyonu distile su ile 1:25 oranında dilüe edilerek hazırlandı. Bu solüsyon ile plaka 3 defa yıkandı.
- HRP-Streptavidin, HRP-Streptavidin dilüenti ile 1:100 oranında dilüe edildi. Bu karışımdan her bir kuyucuğa 100 µl eklendi. Plakanın üzeri koruyucu membran ile kapatılarak, 37°C ve 30 dakika inkübe edildi.
- Koruyucu membran kaldırılarak plaka 5 defa yıkama solüsyonu ile yıkandı ve daha sonra her bir kuyucuğa 90 µl TMB substratı ilave edildi.
- Plakanın üzeri koruyucu membran ile kapatılarak 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Bu esnada mavi renk oluşumu gözlenecektir.
- Plakanın üzerindeki koruyucu membran kaldırıldı. Oluşan mavi rengi, sarıya dönüştürmek için her bir kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklendi.
- Durdurma solüsyonunu ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropate okuyucu kullanarak her bir kuyucuğun optik yoğunluğu (OD değeri) hemen belirlendi.
- Standartların konsantrasyonlarına karşılık okunan OD değerlerine bağlı olarak standart grafiği çizildi ve parametre denklemi bulundu. Bu denklemden yola çıkılarak örneklerin konsantrasyonları hesaplandı.

3.3. İstatistiksel Analiz

Tüm uygulamalar, en az üç tekrar olacak şekilde çalışıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar, çift yönlü ANOVA testi ve Tukey'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analiz için GraphPad Prism 8.0 ve Windows Office-Excel programlarından faydalanıldı. İstatistiksel anlamlılık değeri olarak $p < 0.05$ kabul edildi. Bulguların gösterildiği grafiklerde farkın istatistiksel olarak önemli olup olmadığını göstermek için kullanılan simgelerin anlamları şu şekildedir:

* $p < 0.05$, kontrol ile kıyaslandığında

** $p < 0.01$, kontrol ile kıyaslandığında

*** $p < 0.0001$, kontrol ile kıyaslandığında

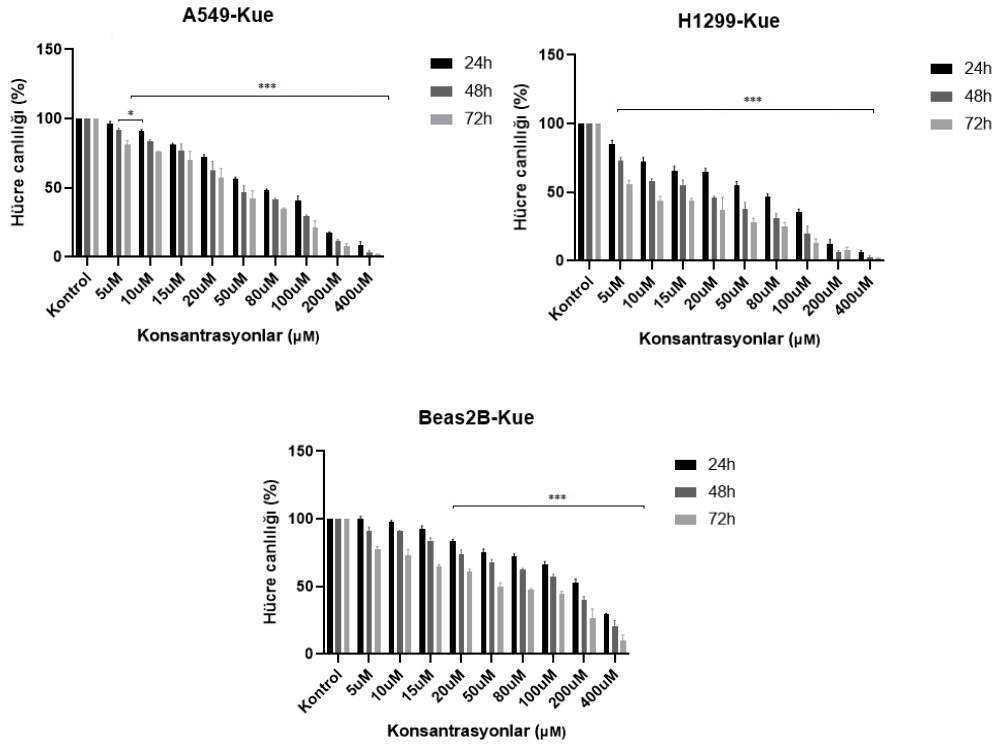
4. BULGULAR

Çalışmamızda Kuersetin ile Bevacizumab'ın KHDAK hücre hatlarındaki kombine etkisini araştırmak amacıyla 2 KHDAK hücre hattı (A549 ve H1299) ve bu ilaçların sağlıklı hücreleri ne derecede etkilediğini araştırmak ve kanserli hücre hattı ile kıyaslamak amacıyla da sağlıklı akciğer hücre hattı BEAS-2B kullanıldı.

Bu hücre hatlarında MTT, kristal viyole boyama, scratch (yara iyileşme) deneyi, real-time PCR ve ELISA gibi yöntemler kullanılarak uygulanan ilaçların anjiyogenez, proliferasyon migrasyon ve apoptozis üzerine etkisi araştırılmış ve elde edilen bulgular maddeler halinde aşağıdaki gibi özetlenmiştir.

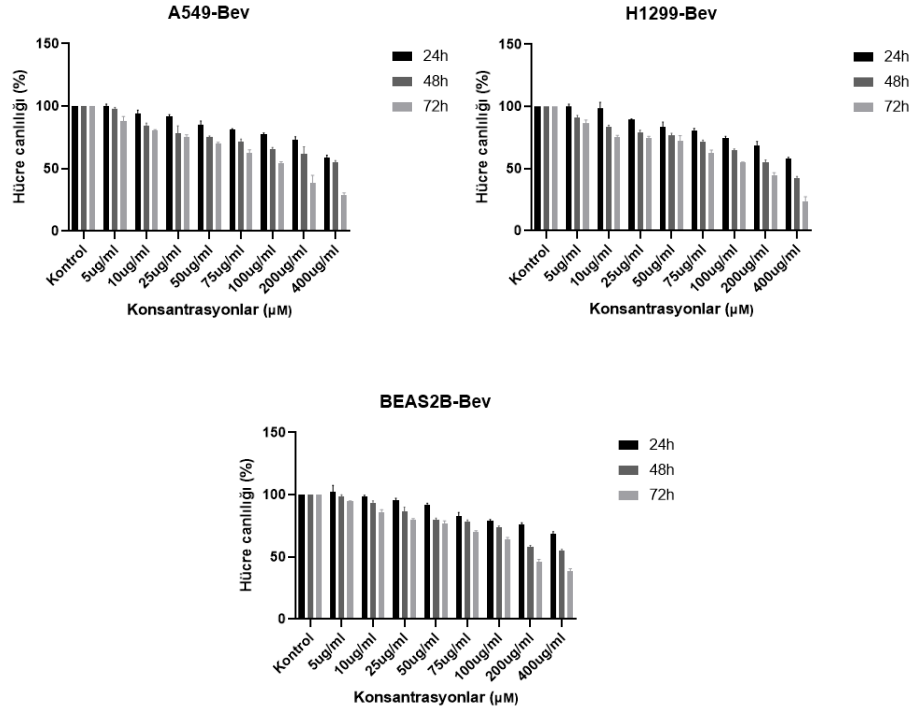
1. **MTT yöntemi ile elde edilen bulgular:** Hücre hatlarında kullanılan Kuersetin ile Bevacizumab'ın tekli ve kombine uygulamalarının doz ve zamana bağlı olarak hücre canlılığı üzerine etkisini gözlemek amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. Hücre hatları belirlenen dozlarda, 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyona maruz bırakılmıştır.

- Sadece Kuersetin ile muamele edilmiş grupları kontrol (hiçbir uygulama yapılmayan hücreler) ile kıyasladığımızda, zaman ve doza bağlı olarak A549 ve H1299 hücre hattında hücre canlılığın önemli derecede inhibe edildiği gözlenmiştir. Bu inhibisyon, BEAS-2B hücre hattında belirli ve daha yüksek dozdan (20µM) sonra gözlenmiştir. Ayrıca KHDAK hücre hatları ile sağlıklı hücre hattını kıyasladığımızda, hücre canlılığın doza ve zamana bağlı olarak BEAS-2B hücre hattında daha yüksek olduğunu saptadık. Farklılıklar *p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001 seviyelerinde olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir (Şekil 11).



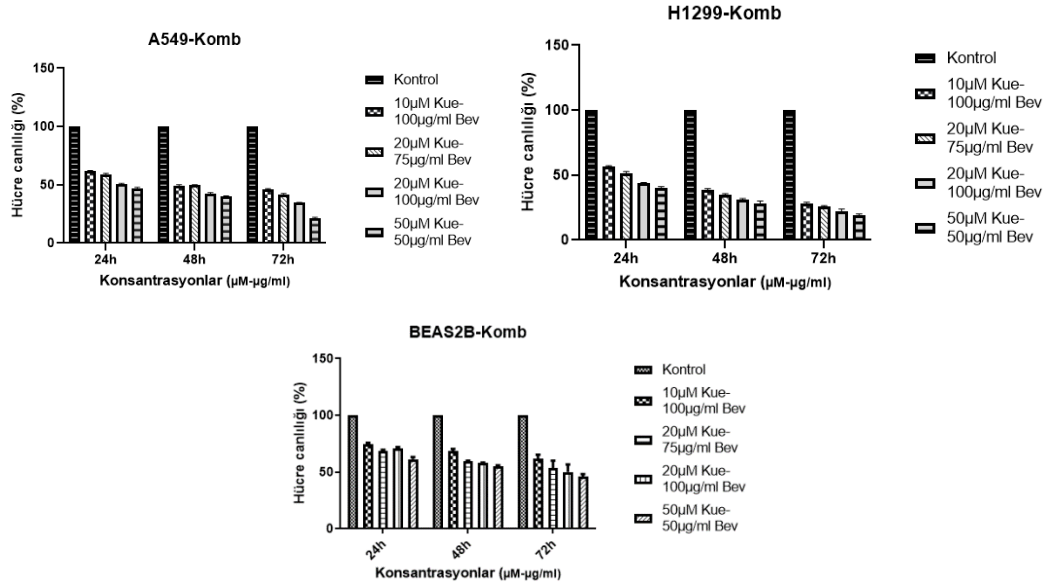
Şekil 11. KHDAK ve BEAS-2B hücre hatlarının Kuersetin ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda MTT yöntemiyle belirlenen hücre canlılık oranları.

- Tekli Bevacizumab uygulamalarında ise zaman ve doza bağlı olarak hücre canlılığın belirli dozlardan sonra azaldığı gözlemlendi. İlaç uygulanan grupları kontrol ile kıyasladığımızda A549 ve H1299 hücre hatlarında 24 saatte 5 ve 10 µg/ml, 48 saatlik muamelede ise 5 µg/ml dozları hariç, diğer dozlarda istatistiksel olarak anlamlı hücre inhibisyonu tespit edilmiştir. BEAS-2B hücre hattında ise 24 saatte 50 µg/ml'den itibaren anlamlı hücre inhibisyonu gözlemlendi. 48 saatte 5 µg/ml hariç diğer dozlarda anlamlı hücre inhibisyonu saptanmıştır (***) $p < 0.001$). Bevacizumab A549, H1299 ve BEAS-2B hücre hatlarında hücre canlılığını inhibe etse de, Kuersetinin hücre inhibisyonu üzerinde daha etkili olduğu gözlenmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. KHDAK ve BEAS-2B hücre hatlarının Bevacizumab ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda MTT yöntemiyle belirlenen hücre canlılık oranları.

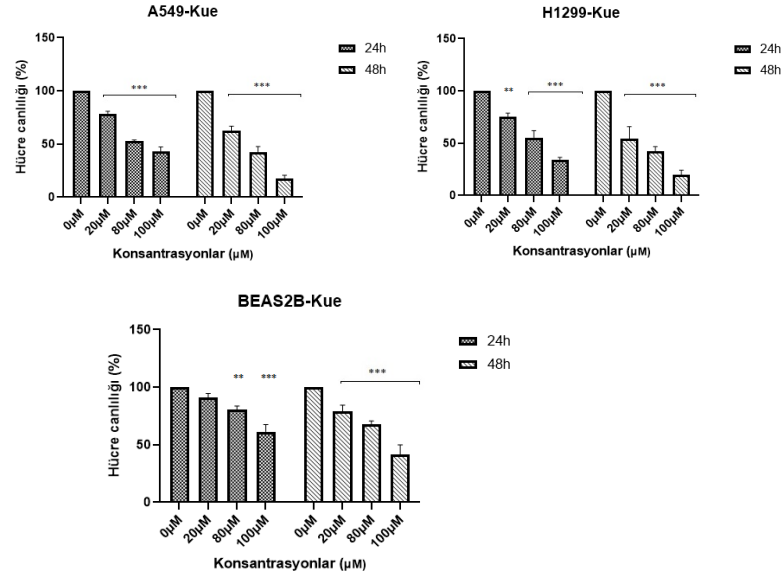
- Kombine olarak uygulanan ilaçların (Bevacizumab + Kuersetin) sinerjik etki sağlayacak dozları, Kombinasyon indeksi (CI-Combination Index) ile belirlenmiştir. Kombinasyon indekslerinin hesaplanması için öncelikle IC_{50} değerleri tespit edildi. Bunun için MTT yöntemi ile elde edilen 24 saatlik uygulama sonuçlarına göre A549 ve H1299 hücre hatlarında IC_{50} değeri Kuersetin için sırasıyla 80,0536 µM ve 80,3845 µM iken, Bevacizumab için sırasıyla 219,6916 µg/ml ve 190,7717 µg/ml olarak belirlenmiştir. Kombine olarak kullanılan ilaçlar A549, H1299 ve BEAS-2B hücre hattında hücre canlılığını inhibe ettiği, KHDAK hücre hattında hücre inhibisyonunun BEAS-2B kıyasla daha fazla olduğu gözlemlendi. Ayrıca tekli ilaç kullanımları ile kıyaslandığında, kombine ilaç uygulamalarının daha etkili olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. KHDAK ve BEAS-2B hücre hatlarının Kuersetin ve Bevacizumab kombinasyonu ile 24, 48 ve 72 saat inkübasyonu sonunda MTT yöntemiyle belirlenen hücre canlılık oranları.

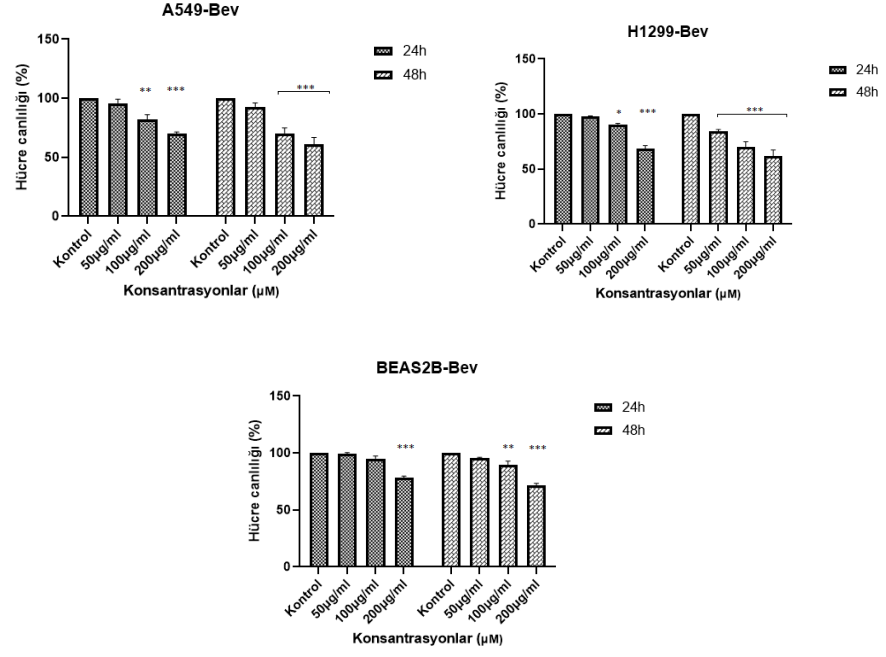
2. **Kristal Viyole Boyaması ile elde edilen bulgular:** Hücre canlılığın tespit edilmesini amaçlayan diğer bir yöntemimiz ise kristal viyole boyama yöntemidir. Bu yöntemde hücre canlılığın gözlemlenmesi için, her hücre hattı için ilaç içermeyen kontrol grubunun yanı sıra, 3 farklı tekli ve kombine ilaç dozu belirlenerek 24 ve 48 saat olarak besiyeri ortamına kültüre edilmiştir.

- Tekli Kuersetin uygulamalarında hücrelerin canlılık yüzdelerinin, kontrol ile kıyaslandığında daha az olduğu gözlemlendi. Ayrıca KHDAK hücre hatları BEAS-2B ile kıyaslandığında, hücre canlılığın KHDAK hücrelerinde daha fazla inhibe olduğu belirlendi. Elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılık değerleri Şekil 14'te gösterilmiştir (**p<0.01, ***p<0.001).



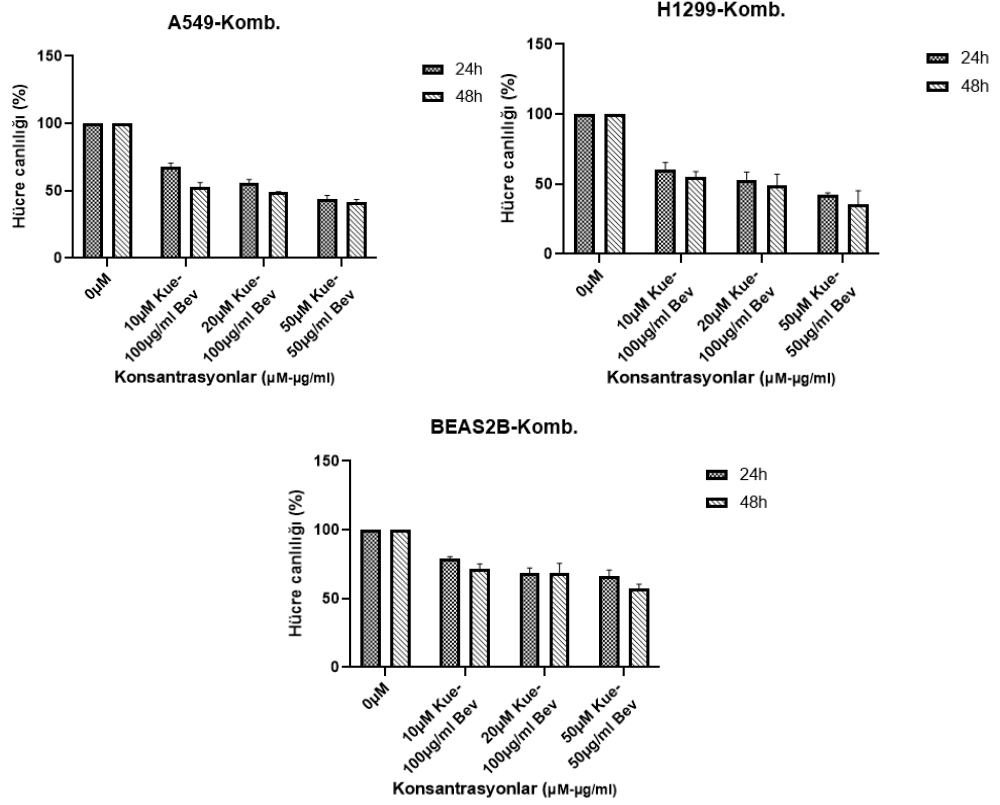
Şekil 14. KHDAK ve BEAS-2B hücre hatlarının Kuersetin ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonunda kristal viyole yöntemiyle belirlenen hücre canlılık oranları.

- Tekli Bevacizumab uygulamalarında, hücre canlılık oranları kontrol ile kıyaslandığında daha az olduğu tespit edildi. Tekli Bevacizumab uygulanan grupları Kuersetin ile kıyasladığımızda ise Bevacizumab'ın hücreleri daha az inhibe ettiği belirlendi. Ayrıca hücre canlılığı KHDAK hücrelerinde BEAS-2B'ye göre daha az olduğu görüldü. İstatistiksel anlamlılık değerleri Şekil 15'te gösterilmiştir (*p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001).



Şekil 15. KHDAK ve BEAS-2B hücre hatlarının Bevacizumab ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonunda kristal viyole yöntemiyle belirlenen hücre canlılık oranları.

- Kombine uygulamalarda, her hücre hattı için hücre canlılığın doza ve zamana bağlı olarak azaldığı gözlemlendi. Hücre canlılığı, KHDAK hücrelerinde normal hücre hattına kıyasla daha azdı. Ayrıca tekli uygulamalara kıyasla, kombine uygulamaların hücre canlılığı üzerinde daha etkili olduğu tespit edildi. Kombine ilaç uygulanan grupların tümü, kontrol ile kıyaslandığında anlamlı sonuçlar elde edildi (**p<0.001) (Şekil 16).



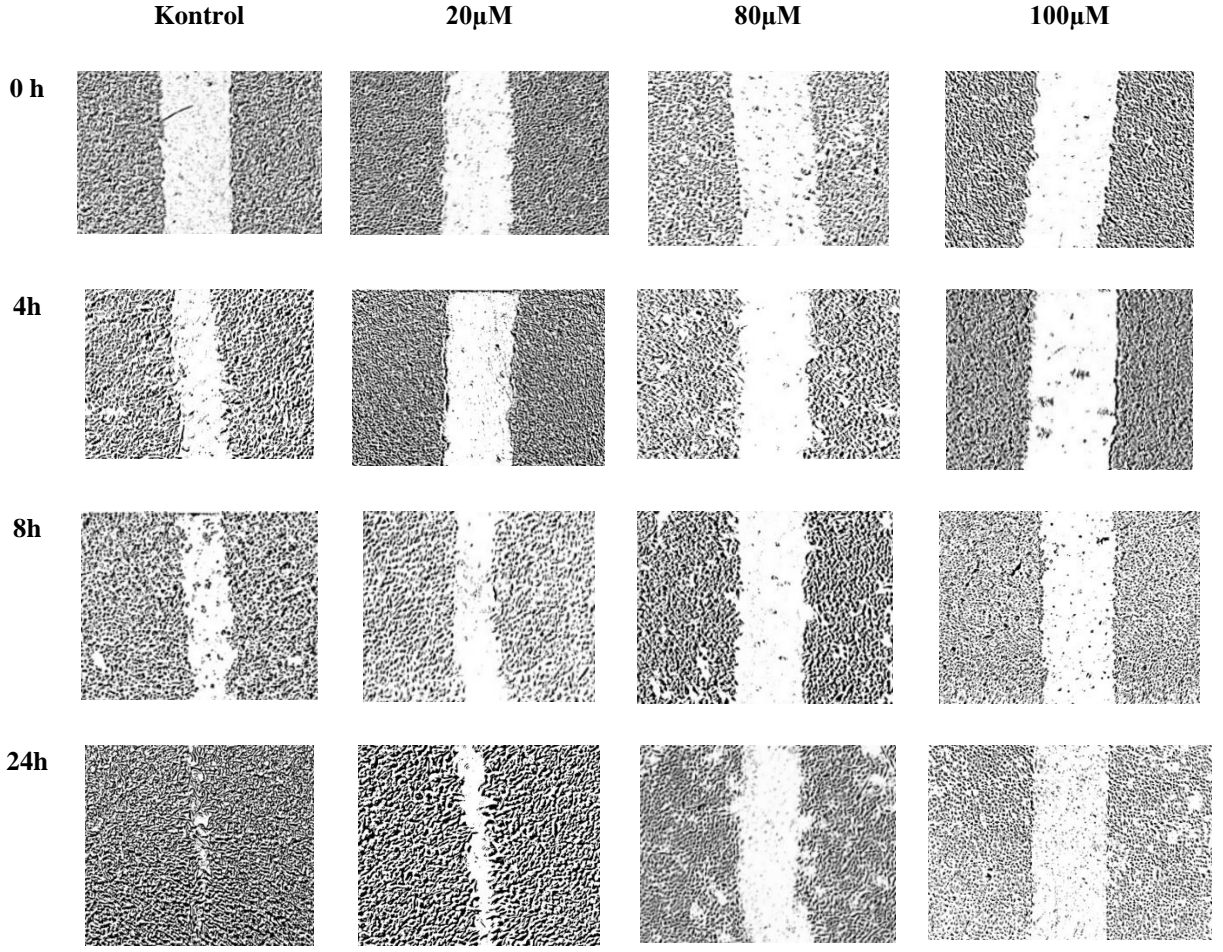
Şekil 16. KHDAK ve BEAS-2B hücre hatlarının Kuersetin ve Bevacizumab kombinasyonu ile 24 ve 48 saat inkübasyonu sonunda kristal viyole yöntemiyle belirlenen hücre canlılık oranları.

3. Yara iyileşme deneyi (Scratch/Wound Healing Assay) ile elde edilen bulgular:

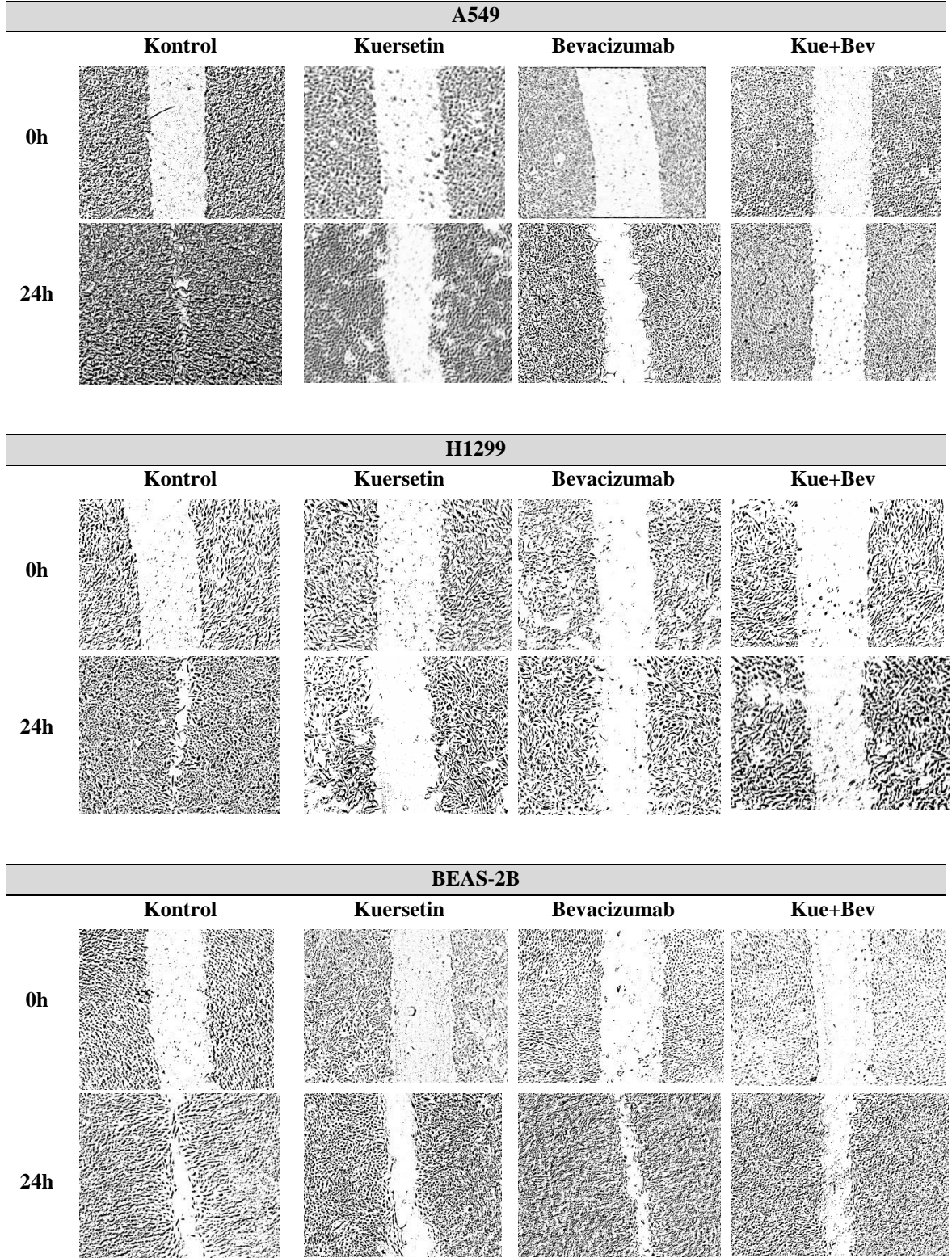
Kuersetin ve Bevacizumab'ın tekli ve kombine uygulanmasının A549, H1299 ve BEAS-2B hücrelerinin migrasyon sürecine olan etkisini araştırmak amacıyla, bu hücre hatlarında yara iyileşme deneyi uygulandı. Belirli yoğunlukta hücrelerin bulunduğu kuyucuklara 200 µl'lik mikropipet ucu ile lineer bir çizik çizildikten sonra, belirlenen dozlarda ilaç uygulanarak, hücre göçü ya da yara kapanma hızını incelemek amacıyla 0.,4.,8. ve 24. saatlerdeki fotoğrafları çekildi. Fotoğraflar Nikon-NIS-Elements D programı ile çekilmiştir (Mikroskop büyütme gücü: 10X). Yara iyileşme yönteminde her bir grup üçlü tekrar olarak çalışılmıştır

- KHDAK hücrelerinin tekli Kuersetin ve Bevacizumab ile uygulamalarında hücre migrasyonunun kontrol ile kıyaslandığında daha az olduğu ve doz arttıkça hücre migrasyonunun azaldığı belirlendi.

- Kombine ilaç uygulanan KHDAK ve BEAS-2B hücrelerindeki yara kapanma yüzdesini kontrol ile kıyasladığımızda, kombine ilaç uygulanan gruplardaki yara kapanma hızının daha az olduğu saptanmıştır ($p<0.001$, $p<0.01$) (Şekil 18).
- Tekli Kuersetin ve kombine ilaç uygulanan BEAS-2B hücrelerinde yara kapanma hızının kontrole göre az, fakat KHDAK hücrelerine göre daha fazla olduğu belirlenmiştir. Fakat tekli Bevacizumab uygulanan BEAS-2B hücrelerinin yara kapanma yüzdesini kontrol ile kıyasladığımızda anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 18).
- Kombine ilaç uygulanan hücrelerdeki yara kapanma yüzdesini, Bevacizumab'ın tekli uygulamaları ile kıyasladığımızda, kombine ilaç uygulanan gruplarda yara kapanma hızının daha az olduğu görülmüştür ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.01$, $p<0.001$). Fakat tekli Kuersetin uygulaması ile kombine tedavinin yara kapanma yüzdesini kıyasladığımızda anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Şekil 18).
- Genel olarak ilaç uygulanan KHDAK hücrelerinde migrasyonun zamana bağlı olarak doz arttıkça azaldığı görülürken, ilaç uygulanmayan kontrol gruplarında hücre göçünün yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 17). Ayrıca ilaç uygulanan KHDAK ve BEAS-2B hücrelerini kıyasladığımızda, KHDAK hücrelerinde yara kapanma hızının normal hücrelere kıyasla daha düşük olduğu saptanmıştır.



Şekil 17. A549 hücre hattında Kuersetinin doz ve zamana bağlı olarak hücre göçü üzerine etkisi



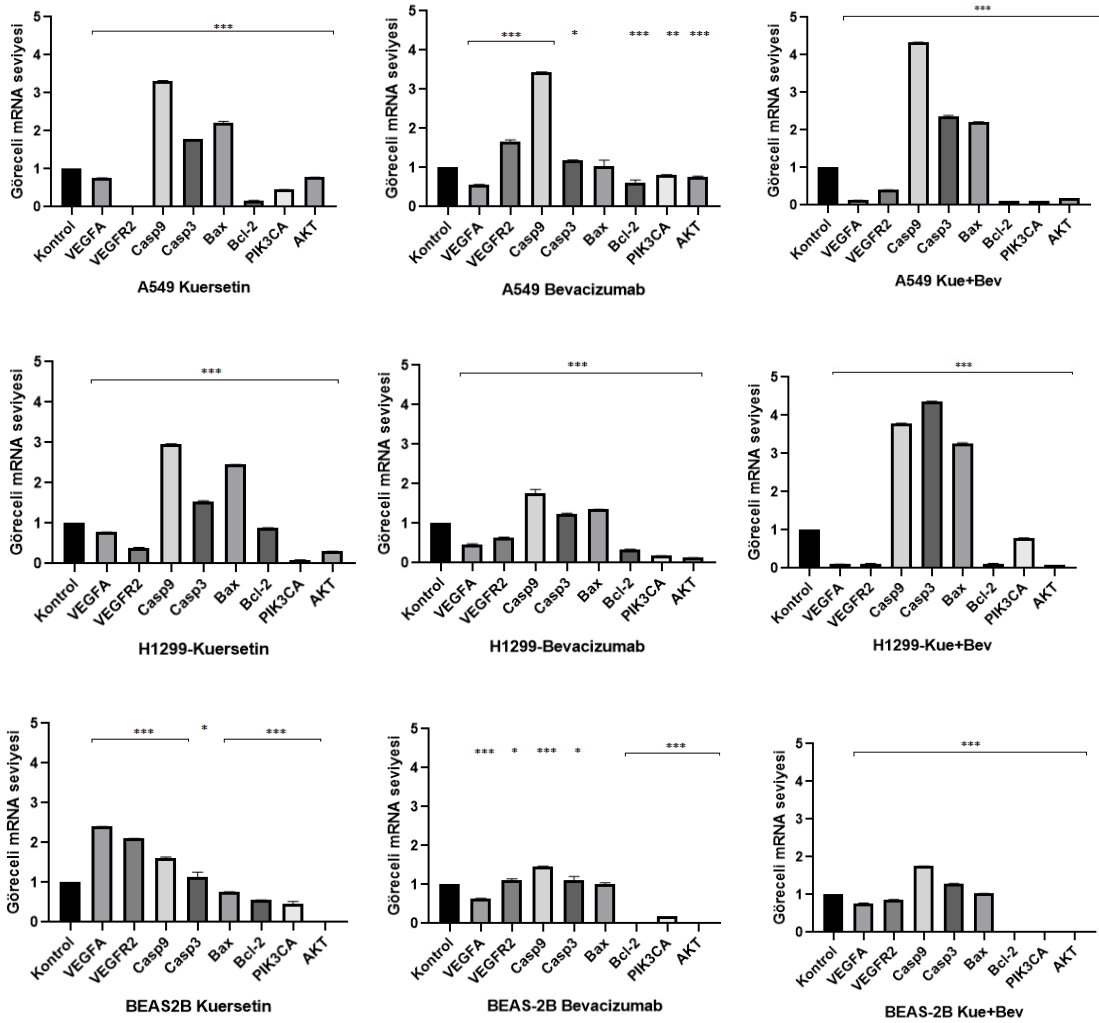
Şekil 18. A549, H1299 ve BEAS-2B hücrelerinde Kuersetin, Bevacizumab ve kombinasyonlarının hücre göçüne etkisi

4. **Real-Time PCR yöntemiyle elde edilen bulgular:** Bütün Real-time PCR deneyleri 3 tekrar halinde gerçekleştirildi. Çalışmamızda kontrol ve ilaç uygulanan gruplarda VEGFA, VEGFR2, Casp9, Casp3, Bax, Bcl-2, AKT1 ve PIK3CA mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri qRT-PCR analizi ile belirlendi. Normalizasyonda Housekeeping gen olarak GAPDH geni kullanılmıştır. Real-Time PCR için kullanılan dozlar Kuersetin için 80 µM, Bevacizumab için 200 µg/ml iken, Kue+Bev için ise 50 µM+ 50 µg/ml şeklindedir.

- Tekli Kuersetin ve Bevacizumab ilaç uygulamalarının apoptozis, anjiyogenez ve proliferasyon ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeylerine ilişkin bulgular Şekil 19’da gösterilmiştir.
- Apoptozis ile ilişkili genlerinin ekspresyon seviyelerini kontrol grubu ile kıyasladığımızda Casp9 geninin ifade düzeyi, ilaç uygulanan tüm hücre hatlarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artarken, Bcl-2 geninin ifadesinde azalma gözlenmiştir. Kombine tedavi uygulamalarında Casp9’un artışı ve Bcl-2’nin azalışı tekli uygulamalarına göre daha anlamlı olduğu tespit edildi (**p<0.001).
- KHDAC hücrelerinin tümünde Bax ve Casp3 genlerinin ifadeleri artarken, Bevacizumab uygulanan A549 hücrelerinde Bax geninin artışı istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05).
- BEAS-2B hücre hattında ilaç uygulanan tüm hücrelerde Casp3, Casp9 ve Bax genlerinin ifade düzeyleri artış, Bcl-2 geni ise azalış gösterirken, Bevacizumab uygulanmış hücrelerde Bax geninin artışı istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05).
- Genel olarak kombine ilaç uygulanan gruplarda Casp9, Casp3 ve Bax genlerinin ifadesinde artış ve Bcl-2 genindeki azalışların tekli uygulamalara göre daha anlamlı olduğu gözlemlendi.
- PI3K yolağı ile ilişkili PIK3CA ve AKT genlerinin ifade düzeyleri, kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı saptandı. Kombine ilaç uygulanan hücrelerdeki PI3K ve AKT genlerinin ifadesindeki

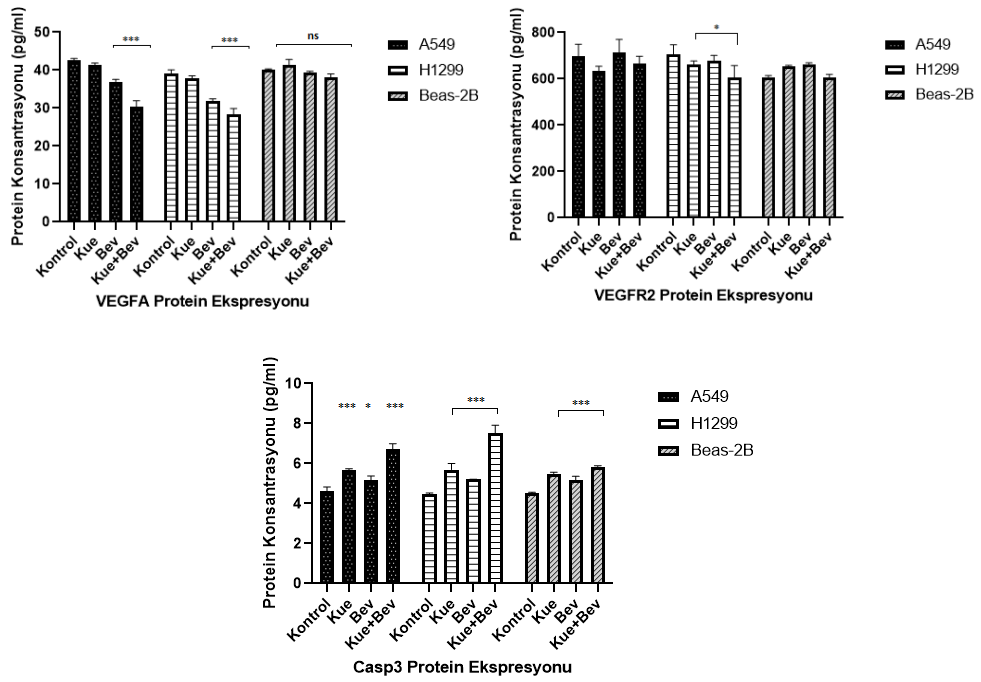
azalış (kombine ilaç uygulanan H1299 hücre hattındaki PIK3CA geni dışında), tekli uygulamalarına göre daha anlamlı olduğu görüldü (** $p < 0.001$).

- VEGFA geninin ekspresyon seviyesi, Kuersetin uygulanmış BEAS-2B hücreleri dışında tüm hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür (** $p < 0.001$). Kombine ilaç uygulanan KHDAK hücrelerinde bu azalışın tekli uygulamalarına göre daha anlamlı olduğu görülmüştür. VEGFR2 geninin ekspresyon seviyesindeki azalış ve artışlar Şekil 19'da gösterildiği gibidir.



Şekil 19. VEGFA, VEGFR2, Casp9, Casp3, Bax, Bcl-2, AKT ve PIK3CA genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyon seviyeleri.

5. **ELISA yöntemiyle elde edilen bulgular:** Kuersetin, Bevacizumab ve Kue+Bev uygulanmış hücrelerde VEGFA, VEGFR2 ve Casp3 genlerinin ekspresyon seviyelerine protein düzeyinde bakıldı ve elde edilen sonuçlar Şekil 20'de gösterildiği gibidir. VEGFA ve Casp3 genlerin protein düzeyindeki ifadeleri mRNA sonuçları ile uyumlu olduğu gözlemlendi. Fakat VEGFR2 geninin protein düzeyindeki ifadeleri mRNA seviyeleri uyumlu olmamakla birlikte, H1299 hücreleri dışında bu seviyelerin kontrol ile kıyaslandığında pek değişmediği görülmüştür.



Şekil 20. VEGFA, VEGFR2 ve Casp3 genlerinin protein düzeyinde ekspresyon seviyeleri

5. TARTIŞMA

Akciğer kanseri dünyada hem kadınlarda hem de erkeklerde kansere bağlı ölümlerin başında gelmektedir (85). Dünyada toplam akciğer kanseri vakalarının oranlarına bakıldığında, akciğer kanserinin erkeklerde birinci sırada, kadınlarda ise meme ve kolorektal kanserinden sonra üçüncü sırada yer aldığı görülmektedir (1). Kötü prognoza sahip akciğer kanserinde, 5 yıllık sağkalım oranı %18 civarındadır (34). Histolojik olarak 2 ana gruba ayrılan akciğer kanserinde en yüksek oranı %85 ile KHDAK oluşturmaktadır (2).

Günümüzde akciğer kanserinin tedavisinde radyoterapi ve kemoterapi gibi geleneksel yöntemler kullanılsa da, hastada oluşturduğu yan etkiler, etkisizlik, tedaviye gelişen direnç ve toksisite gibi etkenlerden dolayı istenen sonuçlara ulaşılamamaktadır. Bundan dolayı alternatif tedavi yöntemlerine yönelim artmıştır (86). Son zamanlarda yapılan çalışmalar, doğal bileşiklerin potansiyel tedavi yöntemleri olarak kullanılabilirliğini göstermiştir (87). Dikkat çeken yöntemlerden bir tanesi de birden fazla ilaç veya terapinin kombine edilmesi ile uygulanan politerapilerdir. Mevcut veriler, ilaç direnci sorunuyla mücadelede iki veya daha fazla ilaçla kombine tedavilerinin, monoterapiden daha etkili olduğunu desteklemektedir. Bunun sebebi ise bazı kombine ilaç uygulamalarının farklı yolları hedeflemesi ve sinerjistik etki göstermesidir (83,88,89).

Meyve ve sebzelerde bol bulunan bir flavonoid olan Kuersetinin birçok biyolojik süreci etkilediği gözlenmiştir. Kuersetinin kanser hücrelerinde proliferasyon, migrasyon, invazyon ve anjiyogenezi inhibe ettiği, apoptozu da indüklediği rapor edilmiştir (90,91). Çeşitli *in vivo* ve *in vitro* kanser çalışmalarında, Kuersetinin farklı ajanlarla kombine olarak kullanıldığında, tekli uygulamalarına göre daha etkili sonuçlar verdiği ve kanser hücrelerini daha yüksek oranda inhibe ettiği gösterilmiştir. Kuersetinin uygun dozlarda sağlıklı hücrelere zarar oluşturmadığı ve çeşitli mekanizmalarla kanser hücrelerini hedefleyerek inhibisyona indüklediği bildirilmiştir (80,92,93). Bundan dolayı diğer kanser önleyici ajanlarla birlikte kullanımı, kanser tedavilerinde etkili bir tercih olarak görülmektedir. Ayrıca birçok çalışma, Kuersetinin farklı ajanlarla kombine olarak kanser hücrelerine uygulandığında, sinerjistik etkisinin olduğunu (79) ve çeşitli kanser hücrelerinde P-glikoprotein (P-gp) ekspresyonunu

inhibe ettiği gözlenmiştir (94). Bir hücre membran proteini olan P-gp, ilaç moleküllerini kanser hücrelerinden dışarı pompalayarak, hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltmaktadır. Böylece kemoterapi etkinliğinin azalmasına neden olmaktadır. Kanser hücreleri, kemoterapi aracılı hücre ölümünden kaçınmak için adaptif bir yanıt olarak P-gp ekspresyonunu arttırmaktadır (95).

Tümör büyümesinin biyolojik mekanizmalarının anlaşılmasındaki son gelişmeler, kanser tedavisi için belirli moleküler hedeflerin tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Bunlardan bir tanesi de anti-anjiyogenik ilaç olarak kullanılan humanize monoklonal antikör Bevacizumab'tır. Bevacizumab, tümör anjiyogenezinde görev alan VEGF-A'ya bağlanarak, VEGFR-2 ile etkileşimini inhibe etmektedir. Dolayısıyla anjiyogenezi inhibe etmektedir (96). Günümüzde Bevacizumab hastalara yaygın olarak paklitaksel ve karboplatin gibi kemoterapik ilaçlarla birlikte uygulanmaktadır. Klinikte Bevacizumab'ın kemoterapik ajanlarla kombine kullanılması tekli uygulamalarına kıyasla daha etkili olduğu ve hasta sağ kalım oranını arttırdığı rapor edilmiştir (97,98). Fakat kemoterapik ajanların hastada oluşturduğu yan etkiler ve sağlıklı hücreleri de etkilemesinden dolayı alternatif tedavi yöntemleri aranmaktadır (99).

Bevacizumab'ın asıl hedefi olan Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), çoğu tümör hücreleri tarafından üretilir ve anjiyogenez sürecinde önemli bir rol oynayarak, yeni kan damarların büyümesini uyarmaktadır. VEGF etkinliğini ağırlıklı olarak, endotelyal hücrelerde eksprese edilen VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2 (KDR) gibi spesifik tirozin kinaz reseptörlerine ek olarak, tirozin olmayan kinaz reseptörlerinden Neuropilin-1 (NRP-1) ve Neuropilin-2 (NRP-2)'ye bağlanarak da göstermektedir (65). Fakat birçok çalışmada, tümör hücrelerinin de bu reseptörleri eksprese ettiği saptanmıştır (63,65). Barr ve ark.'nın, çeşitli KHDAK hücre hatlarında (H460, H647, A549 ve SMES1), VEGF ligand ve VEGFR-1, VEGFR-2, NRP1 ve NRP2 gibi reseptörlerinin mRNA ve protein düzeyinde ekspresyonunu tespit etmek amacıyla yaptığı bir çalışmada, VEGF₁₆₅ izoformunun mRNA ve protein seviyesinde, çalıştıkları tüm hücre hatlarında ifade edildiğini tespit etmişlerdir. Bu hücrelerde VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörünün mRNA seviyesinde ekspresyonu düşük olmasına rağmen, protein seviyesinde VEGFR-2'nin daha yüksek olduğuna dair veriler de elde edilmiştir. Bu çalışmada tüm hücre hatları, VEGFR-2'yi protein seviyesinde ifade ederken, VEGFR-1 proteinini saptanamamıştır. NRP1 protein ekspresyonu, H460 hariç

tüm hücre hatlarında gözlenirken, NRP2 proteini sadece adenokarsinom A549 ve skuamöz SKMES1 hücrelerinde eksprese edilmiştir (65). VEGFR-2 ve VEGF'nin akciğer kanserlerinde ifade edildiğine dair başka çalışmalar da mevcuttur (63,100,101). VEGF salınımı normal hücrelerde de gözlene de, bu ligandın salınımı kanser hücrelerinde oldukça fazla olduğu saptanmıştır (102).

VEGFR-2 reseptörünün endotelial hücreler dışında, birçok solid tümörde de eksprese edilmesi (68,103,104), VEGF-A'nın tümör anjiyogenezi üzerindeki etkisinin, parakrin sinyal iletimi dışında otokrin sinyal yoluyla tümör biyolojisinde ek bir rol oynadığını düşündürmektedir (63,68,103,105). Graells ve ark.'ları, melanoma hücrelerinden salınan VEGF₁₆₅'in otokrin sinyal yolu ile kendi VEGF reseptörüne bağlanarak, PI3K ve MAPK yolağı ile hücre sağkalımı ve büyümesini desteklediğini rapor etmişlerdir (72).

Applanat ve Benedetto'nun yaptıkları bir çalışmada ise, meme tümör hücrelerinin, yüzeyinde bulunan VEGF reseptörlerinin VEGF ligandı bağlanması ile fosforilasyonu ve aktivasyonu ile kendi büyüme, sağ kalımı ve göçünü tetikleyen otokrin sinyalleşme döngüsünü kullandıklarını belirtmişlerdir. Dolayısıyla VEGF, meme tümör hücreleri için bir otokrin sağkalım faktörü olarak görev yaptığı saptanmıştır (106). Ayrıca yapılan bazı çalışmalarda, VEGF nötralize edici antikolar veya siRNA-VEGF aracılığıyla VEGF ekspresyonu azaltılarak, PI3K aktivitesine bakılmıştır. Bu çalışmalarda, VEGF ekspresyonundaki azalışın, PI3K aktivitesini düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Ayrıca PI3K aktivitesinin düşürülmesi, Bcl-2 ekspresyonunda azalış ve Bad proteini ekspresyonunda artışa neden olarak apoptozisi tetiklediği bulunmuştur (107–110).

Yaptığımız literatür taramasında A549, H1299 ve BEAS-2B'nin de VEGF-A ve VEGFR-2'yi mRNA ve protein düzeyinde ifade ettiğini gördük (65,111–113).

Çalışmamızda, değinilen bu noktalardan yola çıkarak, sinerjistik etki oluşturduğunu düşündüğümüz Kuersetin ve Bevacizumab kombinasyonunun küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde proliferasyon, anjiyogenez, migrasyon ve apoptozis üzerinde etkisini araştırmayı hedefledik. Bu ilaç kombinasyonunun, KHDAK'de VEGF/PI3K/Akt sinyal yolağının düzenlenmesindeki rolü ve PI3K aracılı apoptozisin tetiklenip tetiklenmediği araştırılmıştır. KHDAK hücrelerinin VEGF-A ve VEGFR-2 ifade etmeleri, hücrelerin çeşitli biyolojik süreçlerde otokrin sinyal döngüsünü

kullandıklarını düşündürmüştür. Nitekim bu konuyla ilgili yapılmış birçok kanser çalışması bunu desteklemiştir (8,65,66,114–117). KHDAK hücreleri, otokrin sinyal döngüsü aracılığıyla kendi sağkalımı, anjiyogenezi, migrasyonu ve proliferasyonu indükleyip, apoptozu inhibe edebilmektedir (65,66,71,100,116). Bundan dolayı biz de, bu süreçlerde önemli görevi olan PI3K sinyal yolağı üzerinde yoğunlaşarak, VEGF inhibisyonunun bu yolak üzerinde oluşturabileceği etki ve belirli genlerin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Literatürde Bevacizumab ve Kuersetin kombinasyonu ile ilgili çalışmalar yer almadığı için, bu ilaçların hem tekli hem de farklı ilaçlar ile yapılmış kombinasyon çalışmaları ile karşılaştırılma yapılacaktır.

Çalışmamızın ilk aşamasında, uygulanan ilaçların hücre canlılığı üzerine etkisini belirlemeye çalıştık. Bu nedenle hücre canlılığın tespit edilmesinde yaygın olarak kullanılan MTT ve Kristal Viyole boyama yöntemlerini uyguladık. Farklı konsantrasyonlarda tekli ilaç uygulanan hücreler, MTT yöntemi için 24, 48 ve 72 saat ve Kristal Viyole için ise 24 ve 48 saat inkübe edilmiştir. Tekli Kuersetin ve Bevacizumab uygulamalarının, hücre canlılığı dolayısıyla hücre inhibisyon oranları tespit edildikten sonra, kombine ilaç uygulamalarının sinerjistik etki göstereceği uygun dozların belirlenmesi amacıyla IC₅₀ değeri tespit edildi. A549 ve H1299 hücrelerine uygulanan Kuersetinin 24 saat sonraki IC₅₀ değeri sırasıyla 80,0536 µM ve 80.3845 µM iken Bevacizumab için sırasıyla 219.6916 µg/ml ve 190.7717 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu değerleri kullanarak kombinasyon indeksi (CI) hesaplandı ve sinerjistik etki oluşturacakları uygun kombine dozları belirlenmiştir (Çizelge 2). Bu testlerden elde ettiğimiz bulgulara göre Bevacizumab ve Kuersetinin tekli ve kombine uygulamalarının zaman ve doza bağlı olarak kanser hücrelerini inhibe ettiği gözlenmiştir. Özellikle de kombine olarak ilaç uygulanan gruplarda inhibisyonun tekli uygulamalara göre daha fazla olduğu ve kanser hücrelerini daha ciddi derecede inhibe ettiğini saptadık. Ayrıca Bevacizumab ile Kuersetinin tekli uygulamalarını kıyasladığımızda, Kuersetin'in kanser hücre inhibisyonunda daha etkili olduğunu saptadık. Kuersetin'in kanser hücrelerinin inhibisyonunda Bevacizumab'a göre daha etkili olmasının birkaç sebebi olabilir. Bunlardan bir tanesi de Kuersetin'in "Anti-Warburg" etkisidir (118). Warburg Etkisi, tümör hücrelerinin oksijen varlığında bile enerji ihtiyaçlarını glikoliz ile karşılaması olarak tanımlanır. "Aerobik glikoliz" olarak adlandırılan bu süreçte, tümör hücreleri glukoz alımı ve glikolitik yol üzerinden

glukozun laktoza çevrilmesini sağlayan metabolik süreç ile enerji elde etmektedir (119). Yapılan araştırmalar Kuersetin'in PI3K/Akt yolağını doğrudan inhibe ederek glikolizi engellediğini göstermiştir. Kuersetin glikoliz ve glukoz alımı ile ilişkili önemli enzimleri inhibe etmekte, ayrıca kanserde mitokondriyi hedef alır ve intrinsik apoptozu tetikleyebilmektedir. Kuersetin'in glukoz metabolizması ve hücrenel enerji üretimi üzerindeki etkisi, kanser hücrelerinde hücre canlılığının azalması, metastaz inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu üzerindeki etkisine katkıda bulunmaktadır. Buna ek olarak, laktik asit varlığında VEGF salınımının arttığı bilinmektedir (120). HIF-1 α bağımlı ya da bağımsız mekanizmalarla PI3K sinyal yolağının aktivasyonu, VEGF salınımını indükleyebilmektedir. Kuersetinin PI3K sinyal yolağını inhibe edebilmesi, VEGF salınımını da engelleyebilmektedir (121). Kuersetinin Bevacizumab'tan daha etkili olmasının bir diğer nedeni de Kuersetin oksidan ve antioksidan arasındaki dengeyi düzenleyerek oksidatif stresi engelleme yeteneğine sahip olması olabilir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ile bir organizmanın antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulması, oksidatif strese neden olan ROS birikimine yol açar. Oksidatif stres, hücrenin hayatta kalması, çoğalması ve göçü için sinyal yollarının hiperaktivasyonunun yanı sıra tümör mikro-ortamının metabolik adaptasyonları ile bağlantılıdır (78,79). Kuersetinin PI3K sinyal yolağını inhibe etme özelliği ve anti-Warburg etkisi gibi çoklu etkisi, hücre inhibisyonunda Bevacizumab'tan daha etkili olmasının nedeni olabilir.

Kuersetinin, doza bağlı olarak çeşitli kanser hücrelerinde inhibisyona neden olduğunu gösteren çok sayıda çalışma vardır. Örneğin, Guo ve arkadaşları Kuersetinin hem A549 hem de H1299 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozisi indüklediğini tespit etmişlerdir (122). Chang ve ark.'ları, çeşitli KHDAK'de Kuersetinin sitotoksik olmayan dozlarda hücre canlılığını, invazyonu ve hücre göçünü inhibe ettiğini saptamışlardır. Bu çalışma, Kuersetinin KHDAK hücrelerinde Snail-bağımlı Akt aktivasyon yolağını inhibe ederek EMT (epitelyal-mezenkimal geçiş)'yi baskıladığını ve hücrelerin invazyon ile metastazını engelleyebileceğini göstermiştir (123).

Xiong ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, Bevacizumab'ın survivin inhibisyonu yoluyla hepatosellüler karsinoma (HCC) duyarlılığını artırıp arttırmadığını belirlemeye çalışmışlardır. Bu çalışmada, Bevacizumab ile muamele edilen HUVEC

hücrelerinde VEGF-PI3K/Akt-survivin sinyal reaksiyon dizisinin inhibe edildiği ve aynı zamanda hepatosellüler kanser hücrelerinde adriamisin duyarlılığının arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada yapılan hayvan deneyleri, bevacizumab ile adriamisin kombine uygulamasının HCC tedavisinde monoterapiden daha etkili olduğunu ve proliferasyonu büyük ölçüde azalttığını saptamışlardır (124). Farklı bir çalışmada, Bevacizumab uygulanan retinoblastoma hücrelerinde, *in vitro* ve *in vivo* olarak anjiyogenezi ve büyümesini baskıladığı bulunmuştur (125). Buna karşın Bevacizumab'ın, kanser hücrelerinde proliferasyona etkisinin olmadığını savunan çalışmalar da mevcuttur. Mabuchi ve arkadaşları Bevacizumab'ın, yumurtalık kanseri hücrelerinin proliferasyonu üzerinde *in vitro* hiçbir etkiye sahip değilken, *in vivo* çalışmalarında anjiyogenezi önemli ölçüde inhibe ettiği ve yara iyileşmesini geciktirdiğini saptamışlardır (126).

Kanser hücrelerinin önemli özelliklerinden biri olan metastaz, hücre göçü ve invazyonunu da içeren çok aşamalı bir süreçtir (127). Bundan dolayı, kanser hücrelerinin migrasyonunu engelleyen tedavilerin geliştirilmesi önem taşımaktadır. Uygulanan ilaçların KHDAK ve BEAS-2B hücre göçüne etkisini belirlemek amacıyla yara iyileşme (Scratch Assay) yöntemini uyguladık. Yara iyileşme yönteminde belirlenen dozlar ile muamele yapıldıktan sonra belirli sürelerde hücrelerin yara kapatma oranları belirlendi. Çalışmamızda Kuersetin, Bevacizumab ve bunların kombinasyonu ile yapılan migrasyon testinde 0., 4., 8. ve 24. saatte çekilen fotoğraflara göre değerlendirme yaptığımızda, hücre göçünün kontrol ile kıyaslandığında, doza ve zamana bağlı olarak hücre göçünü önemli derecede inhibe ettiğini saptadık. Ayrıca tekli kullanımına kıyasla, kombine uygulamalarının hücre göç hızını daha fazla inhibe ettiği gözlemlendi. Yapılan çalışmalarda, Kuersetin'in KHDAK hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak hücre göçünü anlamlı derecede inhibe ettiği saptanmıştır (123,128–130). Bevacizumab ve PD-L1 inhibitörü olan Atezolizumab kombinasyonunun araştırıldığı bir çalışmada, birlikte uygulanan ilaçların cisplatin dirençli A2780cis yumurtalık kanseri hücre hattında proliferasyon, hücre göçü ve invazyonunu kontrol ile kıyaslandığında sinerjistik olarak inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Bu inhibisyonun, Bevacizumab'ın STAT3'ü hedefleyerek EMT ve PD-L1 ekspresyonunu baskılanmasından kaynaklandığı öne sürülmüştür (131). Buna karşın Hein ve arkadaşları, akciğer kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser hücrelerinde tekli

Bevacizumab etkisini inceledikleri çalışmada, Bevacizumab'ın potansiyel parakrin/otokrin sinyal iletimi aracılığıyla ne değişmiş göç ne de VEGFR-1/2 ve ligand regülasyonu gözlediklerini rapor etmişlerdir (132).

PI3K sinyal yolağı hücrelerin sağkalımı, büyümesi, proliferasyonu, invazyonu ve hücre göçü gibi önemli süreçlerde görev almaktadır (133,134). Bu yolak akciğer kanseri dahil çeşitli kanserlerde sürekli aktiftir. Bu nedenle PI3K sinyal yolağını hedefleyen tedavi yöntemleri üzerine odaklanıldı. PI3K sinyal yolağının düzenlenmesinde önemli bir protein olan AKT fosforilasyonu agresif kanser davranışları ile ilişkilidir. Bu sinyal yolu ile ilgili çeşitli faktörler arasında Bcl-2 ailesi, X'e bağlı apoptoz proteini inhibitörü (XIAP), fare çift dakika 2 homologu (MDM-2) ve Forkhead box O3 (FOXO3a) transkripsiyon faktörü yer alır (135,136).

Apoptoziste, Bcl-2 protein ailesi, kanser sağkalımına ve çoklu ilaç direncine katkıda bulunan ana faktördür. Bcl-2 ailesi proteinleri, mitokondriyal membranın geçirgenliğini değiştirir, bu da Sitokrom-C'nin salınmasına ve kaspaz aktivasyonunun aracılık ettiği hücre ölümüne yol açar. AKT sinyal yolunun bileşenlerinin aşırı ekspresyonu, Bcl-2 ailesi proteinlerinin dengesini bozar. AKT, Bad'in (Bcl-2 ile ilişkili hücre ölümü agonisti) fosforilasyonunu indükler, bu da Bcl-xL ve Bcl-2 proteinlerinin heterodimerizasyonunun bozulmasına neden olur ve böylece apoptozu önler (136–138). Çalışmamızda kullandığımız ilaçların kombine uygulamalarının, kanser tedavisinde potansiyel seçenek olarak değerlendirilebilmesi için kanser hücrelerini apoptozis ile ölüme sürüklemesi önemliydi. Bundan dolayı çalışmamızda apoptozisin önemli belirteçlerinden olan Casp3, Casp9, Bax ve Bcl-2 genlerin ekspresyonları incelenmiştir. İlaçların hem tekli hem de kombine uygulamaları, kanser hücrelerinde apoptozisi tetiklemiştir. Casp3, Casp9 ve Bax genlerinin mRNA düzeyinde ekspresyonunu incelediğimizde hem tekli hem de kombine tedavilerinde kontrole kıyasla istatistiksel anlamda önemli bir yükseliş gözlemlendi ($p < 0.001$). Buna ek olarak, kombine uygulamalarında Casp3, Casp9 ve Bax'ın ekspresyonu tekli uygulamalarına göre daha fazla eksprese olduğu görülmüştür. Ayrıca Bcl-2 ekspresyon seviyesindeki düşüşte de aynı durum gözlenmiştir.

Zhaorigetu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, A549 hücre hattında Kuersetin uygulamasının Bax ve Casp3 ekspresyonunun arttırıp, Bcl-2 ekspresyonunu düşürerek apoptozun tetiklendiğini saptamışlardır (139). Zheng ve arkadaşlarının Kuersetinin

antikanser etkisini araştırdığı çalışmada yine aynı şekilde A549 hücrelerinde Bcl-2 ekspresyonun azaldığı, Bax geninin ekspresyonunun ise arttığı bulunmuştur (140). Flavonoidler ile ilgili yapılan geniş çaplı bir çalışmada, Kuersetinin hem H1299 hem de A549 hücrelerinde apoptozisi tetiklediğini bildirmişlerdir (141).

Literatürde Bevacizumab'ın kanser hücrelerindeki proliferasyon, migrasyon ve apoptozis gibi biyolojik süreçler üzerindeki etkisini araştırıldığı çok kısıtlı çalışmalar mevcuttur. Zao ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Bevacizumab ile sıtma tedavisinde kullanılan Klorokin kombinasyonunun kolorektal kanser hücrelerinde apoptozisi indüklediğini bulmuşlardır. Tekli Bevacizumab uygulamasının da incelendiğı bu çalışmada, kolorektal kanser hücrelerinde hem hücre canlılığın önemli derecede inhibe edildiğini ve kontrol ile kıyaslandığında apoptozisi indüklediğini saptamışlardır (142). Farklı bir çalışmada ise Bevacizumab'ın A549 hücre hattında apoptozisi ER stresi ile tetiklendiğini saptamışlar. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarla Bevacizumab ile muamele edilen hücreler 24 saatlik inkübasyondan sonra XBP-1, CHOP ve caspase-4 ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. XBP-1 ekspresyon seviyesi belirgin şekilde artarken, CHOP ve caspase-4'n ekspresyonu daha az artış göstermiştir (143).

Real-time PCR yöntemiyle elde edilen diğerk bulgular incelendiğinde, Bevacizumab uygulanan her hücre hattında VEGF-A ifadesinin kontrole kıyasla azaldığı görülmüştür. KHDAK hücrelerinde ilaçların kombine uygulanması, VEGF-A ekspresyonunu tekli uygulamalarına nazaran daha da düşürmüştür. Buradan kombine tedavinin VEGF-A inhibisyonundaki rolünün tekli ilaç uygulamalarına göre daha etkili olduğuna söyleyebiliriz. Kuersetinin KHDAK hücrelerinde VEGF-A ifadesini kontrole göre düşürse de, tekli Bevacizumab ve kombine ilaç uygulamalarındaki VEGF-A ifadesinin daha da düştüğü görülmüştür. Sağlıklı hücre hattı BEAS-2B hücrelerinde ise Kuersetinin VEGF-A ekspresyonunu arttırdığını saptadık. Bazı alışmalarda VEGF'nin normal hücreleri apoptoza karşı koruduğ bildirilmiştir (102,144,145). Kuersetin uygulanan BEAS-2B hücrelerinin mRNA düzeyindeki ekspresyonunu incelediğimizde apoptozis varlığını gösteren Casp3 ve Casp9 ekspresyonu yüksek iken Bcl-2 ekspresyonu düştüğü gözlemlenmiştir. BEAS-2B hücreleri de apoptozise karşı koruma sağlamak amacıyla VEGF-A ekspresyonunun buna cevap olarak salınımın arttırmış olabilir.

VEGFR-2 geninin ekspresyon seviyeleri, kombine ilaç uygulanan hücre hatlarında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir düşüşün olduğunu belirledik. Literatür taramaları yapıldığında genelde VEGF-A düşüşü ile VEGFR-2 ile korelasyon içerisinde olduğunu fark ettik. Fakat çalışmamızda Bevacizumab uygulanan A549 ve BEAS-2B hücrelerinde VEGFR-2 geninin ekspresyon seviyesinde kontrol ile kıyaslandığında bir artışın olduğu görülmektedir. Yapılan birçok çalışmada VEGF-A inhibisyonunun VEGFR-2 ekspresyonunu da düşürdüğü bildirilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgunun olası sebebini araştırırken Mahfouz ve ark.'larının 2017 yılında gastrointestinal kanser ile ilgili yaptığı bir çalışmaya rastladık. Bu çalışmada Bevacizumab ile VEGF inhibisyonunun hTERT aracılığıyla, VEGFR1 ve VEGFR2 ekspresyonunda bir artışı tetiklediğini gözlemlemiştirlerdir. Bu nedenle VEGF ve hTERT'nin hem gastrointestinal kanser hücrelerinde hem de endotelial hücrelerde kombine inhibisyonunun daha iyi bir anti-anjiyogenik terapötik sonuca yol açabileceğini savunmuşlardır (146). Biz de Kuersetinin olası hTERT inhibisyonu üzerindeki etkisini araştırdığımızda, Kuersetinin çeşitli kanserlerde hTERT ekspresyonunu inhibe edip, telomeraz aktivitesini düşürdüğünü destekleyen çalışmalar tespit ettik (80,147,148). Nitekim çalışmamızda Bevacizumab ve Kuersetinin kombine uygulandığı A549 hücrelerinde VEGFR-2 ekspresyon seviyesinde ciddi bir düşüş yaşanırken, bu düşüşün BEAS-2B hücrelerinde daha az olduğu gözlemlendi.

PI3K sinyal yolağının önemli düzenleyicileri olan PIK3CA ve AKT ekspresyon bulgularına bakıldığında, KHDAK hücrelerinde VEGF inhibisyonunun, PIK3CA ve AKT genlerindeki ekspresyon seviyelerindeki düşüş ile korelasyon içerisinde olduğu görülmektedir. Bu çalışma aynı zamanda KHDAK hücrelerinde VEGF-A inhibisyonunun PI3K/Akt sinyal yolağını inhibe ederek apoptozu tetiklediğini düşündürmektedir.

Casp3, VEGFA ve VEGFR2 genlerinin protein düzeyindeki ekspresyon seviyeleri incelendiğinde, Casp3 ve VEGFA ekspresyon seviyelerinin mRNA bulguları ile uyumlu olduğunu söyleyebiliriz. Fakat VEGFR2 geninin protein düzeyindeki ifadeleri mRNA seviyeleri uyumlu olmamakla birlikte, H1299 hücreleri dışında bu seviyelerin kontrol ile kıyaslandığında pek değişmediği görülmüştür. Bu gözlem için olası bir açıklama, VEGFR-2 proteininin bu hücrelerde doğal olarak stabil bir protein olması ve hücre içinde kapsamlı bozulma veya geri dönüşüme uğramamasıdır. Bu nedenle, VEGFR-2

mRNA seviyelerinin, kararlı durum seviyelerinde nispeten düşük olması doğal olarak beklenmektedir.

Son olarak çalışmamızda uygulanan ilaçların hem tekli hem de kombine uygulamalarının BEAS-2B hücrelerinde etkisini incelediğimizde, bu ilaçların sitotoksik etkisinin KHDAK hücrelerine göre daha az olduğunu gözlemledik. Bazı çalışmalarda Kuersetinin normal hücrelere doza bağlı olarak zarar oluşturmadığı ileri sürülmüştür (80,93). Buna karşın Kuersetinin sağlıklı hücreler üzerinde minimal seviyede de olsa sitotoksik etkisinin olduğu bildirilmiştir (149,150). VEGF salınımının normal koşullarda sağlıklı hücrelerde daha az salınması nedeniyle, Bevacizumab'ın BEAS-2B hücrelerinde sitotoksik etkisinin de az olması beklenmektedir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Klinikte anti-anjiyogenik ilaç olarak kullanılan monoklonal antikör Bevacizumab ve en yaygın flavonoidlerden olan Kuersetin kombinasyonunun KHDAK hücre hatları H1299 ve A549 hücreleri üzerinde etkilerinin araştırıldığı çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir.

1. Kuersetin ve Bevacizumab'ın kombine uygulamaları, tekli uygulamalarına göre KHDAK hücrelerinin inhibisyonunda daha etkili olabilir.
2. Kuersetin ve Bevacizumab'ın tekli ve kombine uygulamaları sağlıklı hücreleri KHDAK hücrelere kıyasla daha az inhibe edebilir.
3. Kuersetin ve Bevacizumab'ın kombine uygulamaları tekli uygulamalarına göre KHDAK hücrelerinin migrasyonunu daha fazla baskılayabilir.
4. Kuersetin ve Bevacizumab kombinasyonu KHDAK hücrelerinde VEGF-A'yı baskılayabilir.
5. Kuersetin ve Bevacizumab kombinasyonu KHDAK hücrelerindeki VEGF-A inhibisyonu, PI3K/Akt sinyal yolağının inhibisyonuna neden olabilir.
6. Kuersetin ve Bevacizumab kombinasyonu, KHDAK hücrelerinde VEGF-A aracılı PI3K sinyal yolağı inhibisyonu apoptozisi indükleyebilir.
7. VEGF-A'nın Bevacizumab ile inhibisyonu, A549 ve BEAS-2B hücrelerinde VEGFR-2 ekspresyonunu arttırmıştır. Kuersetin ve Bevacizumab'ın kombine uygulamaları, bu hücre hatlarındaki VEGFR-2 ekspresyonunu düşürebilir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz veriler ile Bevacizumab ve Kuersetinin KHDAK tedavisinde sinerjistik etkisinin olabileceğini saptadık. Bu sayede ilacın etkinliği artırılarak ve daha düşük dozlar kullanıldığından toksisite ve olası yan etkileri de minimize edilebilir. Daha öncesinde literatürde yer almayan bu kombine çalışmasının daha iyi anlaşılabilmesi için araştırmaların artırılması ve kliniğe uyarlanabilmesi için ksenograft hayvan modelleri ile desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. **GLOBOCAN 2020:** New Global Cancer Data | UICC. Erişim: <https://www.uicc.org/news/globocan-2020-new-global-cancer-data>. Erişim Tarih: 01.03.2022
2. **Inamura K.** Lung Cancer: Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification. *Front Oncol.* **2017**;7:193.
3. **Zhang Z, Shi J, Nice EC, Huang C, Shi Z.** The Multifaceted Role of Flavonoids in Cancer Therapy: Leveraging Autophagy with a Double-Edged Sword. **2021**;15.
4. **Gilad Y, Gellerman G, Lonard DM, O'Malley BW.** Drug Combination in Cancer Treatment—From Cocktails to Conjugated Combinations. *Cancers.* **2021**;13(4):669.
5. **Tang SM, Deng XT, Zhou J, Li QP, Ge XX, Miao L.** Pharmacological basis and new insights of quercetin action in respect to its anti-cancer effects. *Biomed Pharmacother.* **2020**;121:109604.
6. **Mukherji SK.** Bevacizumab (Avastin). *Am J Neuroradiol.* **2010**;31(2):235-6.
7. **Teleanu RI, Chircov C, Grumezescu AM, Teleanu DM.** Tumor Angiogenesis and Anti-Angiogenic Strategies for Cancer Treatment. *J Clin Med.* **2019**;9(1):84.
8. **Devery AM, Wadekar R, Bokobza SM, Weber AM, Jiang Y, Ryan AJ.** Vascular endothelial growth factor directly stimulates tumour cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* **2015**;47(3):849-56.
9. **Hajdu SI.** A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. *Cancer.* **2011**;117(5):1097-102.
10. **Ades F, Tryfonidis K, Zardavas D.** The past and future of breast cancer treatment—from the papyrus to individualised treatment approaches. *Ecancermedicalsecience.* **2017**; 11:746.
11. **Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, et al.** Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *Int J Mol Sci.* **2013**;14(10):21087-113.
12. **Patel A.** Benign vs Malignant Tumors. *JAMA Oncol.* **2020**;6(9):1488.
13. **Cooper GM.** The Development and Causes of Cancer. *Cell Mol Approach 2nd Ed* [Internet]. 2000 [a.yer 25 Mart 2022]; Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9963/>
14. **Carcinogenesis.** Medicine LibreTexts. 2017. Erişim adresi: [https://med.libretexts.org/Courses/American_Public_University/APUS%3A_An_Introduction_to_Nutrition_\(Byerley\)/APUS%3A_An_Introduction_to_Nutrition_1st_Edition/07%3A_Nutrition_and_Cancer/7.02%3A_Carcinogenesis](https://med.libretexts.org/Courses/American_Public_University/APUS%3A_An_Introduction_to_Nutrition_(Byerley)/APUS%3A_An_Introduction_to_Nutrition_1st_Edition/07%3A_Nutrition_and_Cancer/7.02%3A_Carcinogenesis). Erişim Tarihi: 28.04.2022.
15. **Guamán-Ortiz LM.** From Mutagenesis to Metastasis: A General Description of Cancer Development. **2018**;7.
16. **Hanahan D, Weinberg RA.** Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* Mart **2011**;144(5):646-74.
17. **Shay JW, Wright WE.** Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol.* **2011**;21(6):349-53.
18. **Fernald K, Kurokawa M.** Evading apoptosis in cancer. *Trends Cell Biol.* **2013**;23(12):620-33.

19. **Yun C, Lee S.** The Roles of Autophagy in Cancer. *Int J Mol Sci.* **2018**;19(11):3466.
20. **Lugano R, Ramachandran M, Dimberg A.** Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol Life Sci.* **2020**;77(9):1745-70.
21. **Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M.** Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag.* **2006**;2(3):213-9.
22. **Martin TA, Ye L, Sanders AJ, Lane J, Jiang WG.** Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. *Madame Curie Bioscience Database.* Landes Bioscience; 2013. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/>. Erişim Tarihi: 21.03.2022
23. **Hapach LA, Mosier JA, Wang W, Reinhart-King CA.** Engineered models to parse apart the metastatic cascade. *Npj Precis Oncol.* **2019**;3(1):20.
24. **Adekola K, Rosen ST, Shanmugam M.** Glucose transporters in cancer metabolism. *Curr Opin Oncol.* **2012**;24(6):650-4.
25. **Wei Dai YY.** Genomic Instability and Cancer. *J Carcinog Mutagen.* **2014**;5:1000165.
26. **M. Candeias S, S. Gaip U.** The Immune System in Cancer Prevention, Development and Therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* **2015**;16(1):101-7.
27. **Prodeus A, Abdul-Wahid A, Fischer NW, Huang EHB, Cydzik M, Gariépy J.** Targeting the PD-1/PD-L1 Immune Evasion Axis With DNA Aptamers as a Novel Therapeutic Strategy for the Treatment of Disseminated Cancers. *Mol Ther - Nucleic Acids.* **2015**;4:e237.
28. **Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD.** Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol.* **2015**;33(17):1974-82.
29. **Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB.** Inflammation and cancer. *Ann Afr Med.* **2019**;18(3):121-6.
30. **Lung cancer:** MedlinePlus Genetics. Erişim adresi: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/lung-cancer/>. Erişim Tarihi: 31.03.2022
31. **Frezzetti D, Gallo M, Maiello MR, D'Alessio A, Esposito C, Chicchinelli N, et al.** VEGF as a potential target in lung cancer. *Expert Opin Ther Targets.* **2017**;21(10):959-66.
32. **Cancer today.** Erişim adresi: <http://gco.iarc.fr/today/home>. Erişim Tarihi: 01.03.2022
33. **Myers DJ, Wallen JM.** Lung Adenocarcinoma. İçinde: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519578/>. Erişim Tarihi: 31.03.2022
34. **Zappa C, Mousa SA.** Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* **2016**;5(3):288-300.
35. **Sabbula BR, Anjum F.** Squamous Cell Lung Cancer. İçinde: *StatPearls.* Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022. Erişim adresi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564510/>. Erişim Tarihi: 31.03.2022
36. **Koinis F, Kotsakis A, Georgoulas V.** Small cell lung cancer (SCLC): no treatment advances in recent years. *Transl Lung Cancer Res.* **2016**;5(1):12.
37. **Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J.** Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primer.* **2021**;7(1):3.

38. **Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP.** Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Health.* **2019**;85(1):8.
39. **de Groot PM, Wu CC, Carter BW, Munden RF.** The epidemiology of lung cancer. *Transl Lung Cancer Res.* **2018**;7(3):220-33.
40. **Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA.** Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clin Chest Med.* **2011**;32(4):605-44.
41. **Wang J, Liu Q, Yuan S, Xie W, Liu Y, Xiang Y, et al.** Genetic predisposition to lung cancer: comprehensive literature integration, meta-analysis, and multiple evidence assessment of candidate-gene association studies. *Sci Rep.* **2017**;7(1):8371.
42. **UyBico SJ, Wu CC, Suh RD, Le NH, Brown K, Krishnam MS.** Lung Cancer Staging Essentials: The New TNM Staging System and Potential Imaging Pitfalls. *RadioGraphics.* **2010**;30(5):1163-81.
43. **Hsin Feng S, Yang ST,** Department of Radiology, China Medical University Hospital, Taichung, Taiwan, School of Chinese Medicine, China Medical University, Taichung, Taiwan. The new 8th TNM staging system of lung cancer and its potential imaging interpretation pitfalls and limitations with CT image demonstrations. *Diagn Interv Radiol.* **2019**;25(4):270-9.
44. **Lim W, Ridge CA, Nicholson AG, Mirsadraee S.** The 8th lung cancer TNM classification and clinical staging system: review of the changes and clinical implications. *Quant Imaging Med Surg.* **2018**;8(7):709-18.
45. **Cancer Staging** - National Cancer Institute. 2015. Erişim adresi: <https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/staging>. Erişim Tarihi: 02.04.2022
46. **Lin J, Yan L, Wang X, Wu Z, Ke K, Lin X, et al.** Administration of Iodine-125 Seeds Promotes Apoptosis in Cholangiocarcinoma through the PI3K/Akt Pathway. Xia C, editör. *Adv Polym Technol.* **2022**;1-6.
47. **Yip HYK, Papa A.** Signaling Pathways in Cancer: Therapeutic Targets, Combinatorial Treatments, and New Developments. *Cells.* **2021**;10(3):659.
48. **Karar J, Maity A.** PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. *Front Mol Neurosci.* **2011**; 2;4:51.
49. **Porta C, Paglino C, Mosca A.** Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol.* 2014 Apr 14;4:64.
50. **Cooper GM.** The cell: a molecular approach. Eighth edition. Oxford; New York: Sinauer Associates, an imprint of Oxford University Press; **2019**.
51. **Wei Y, Zhou J, Yu H, Jin X.** AKT phosphorylation sites of Ser473 and Thr308 regulate AKT degradation. *Biosci Biotechnol Biochem.* **2019**;83(3):429-35.
52. **Carracedo A, Pandolfi PP.** The PTEN–PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene.* **2008**;27(41):5527-41.
53. **Cheng H, Shcherba M, Pendurti G, Liang Y, Piperdi B, Perez-Soler R.** Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway: potential for lung cancer treatment. *Lung Cancer Manag.* **2014**;3(1):67-75.
54. **Gupta MK.** Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol.* **2003**;9(6):1144.

55. **Saman H, Raza SS, Uddin S, Rasul K.** Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches. *Cancers*. **2020**;12(5):1172.
56. **Yadav L.** Tumour Angiogenesis and Angiogenic Inhibitors: A Review. *J Clin Diagn Res*. **2015**;9(6): XE01-XE05.
57. **Chen L, Lin G, Chen K, Liang R, Wan F, Zhang C, et al.** VEGF promotes migration and invasion by regulating EMT and MMPs in nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer*. **2020**;11(24):7291-301.
58. **Ellis LM, Hicklin DJ.** VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*. **2008**;8(8):579-91.
59. **Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH.** Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. **2005**;9(4):777-94.
60. **Apte RS, Chen DS, Ferrara N.** VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. **2019**;176(6):1248-64.
61. **Bose D, Banerjee S, Singh RK, Wise LM, Robertson ES.** Vascular endothelial growth factor encoded by Parapoxviruses can regulate metabolism and survival of triple negative breast cancer cells. *Cell Death Dis*. **2020**;11(11):996.
62. **Shaik F, Cuthbert G, Homer-Vanniasinkam S, Muench S, Ponnambalam S, Harrison M.** Structural Basis for Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Activation and Implications for Disease Therapy. *Biomolecules*. **2020**;10(12):1673.
63. **Tanno S, Ohsaki Y, Nakanishi K, Toyoshima E, Kikuchi K.** Human small cell lung cancer cells express functional VEGF receptors, VEGFR-2 and VEGFR-3. *Lung Cancer*. **2004**;46(1):11-9.
64. **He Y, Sun MM, Zhang GG, Yang J, Chen KS, Xu WW, et al.** Targeting PI3K/Akt signal transduction for cancer therapy. *Signal Transduct Target Ther*. **2021**;6(1):425.
65. **Barr MP, Gray SG, Gately K, Hams E, Fallon PG, Davies AM, et al.** Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor, signaling through neuropilin-1 in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer*. **2015**;14(1):45.
66. **Chatterjee S, Heukamp LC, Siobal M, Schöttle J, Wiczorek C, Peifer M, et al.** Tumor VEGF:VEGFR2 autocrine feed-forward loop triggers angiogenesis in lung cancer. *J Clin Invest*. **2013**;123(4):1732-40.
67. **Ntellas P, Mavroeidis L, Gkoura S, Gazouli I, Amylidi AL, Papadaki A, et al.** Old Player-New Tricks: Non Angiogenic Effects of the VEGF/VEGFR Pathway in Cancer. *Cancers*. **2020**;12(11):3145.
68. **Adamcic U, Skowronski K, Peters C, Morrison J, Coomber BL.** The Effect of Bevacizumab on Human Malignant Melanoma Cells with Functional VEGF/VEGFR2 Autocrine and Intracrine Signaling Loops. *Neoplasia*. **2012**;14(7):612-IN16.
69. **Lichtenberger BM, Tan PK, Niederleithner H, Ferrara N, Petzelbauer P, Sibilica M.** Autocrine VEGF Signaling Synergizes with EGFR in Tumor Cells to Promote Epithelial Cancer Development. *Cell*. **2010**;140(2):268-79.
70. **Speirs V, Atkin SL.** Production of VEGF and expression of the VEGF receptors Flt-1 and KDR in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from breast tumours. *Br J Cancer*. **1999**;80(5-6):898-903.

71. **Wang Y, Huang L, Yang Y, Xu L, Yang J, Wu Y.** Effects of autocrine vascular endothelial growth factor (VEGF) in non-small cell lung cancer cell line A549. *Mol Biol Rep.* **2013**;40(4):3093-9.
72. **Graells J, Vinyals A, Figueras A, Llorens A, Moreno A, Marcoval J, et al.** Overproduction of VEGF165 Concomitantly Expressed with its Receptors Promotes Growth and Survival of Melanoma Cells through MAPK and PI3K Signaling. *J Invest Dermatol.* **2004**;123(6):1151-61.
73. **KEGG PATHWAY:** hsa04370. Erişim adresi: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?path:hsa04370. Erişim Tarihi: 3.04.2022
74. **Okumura N, Yoshida H, Kitagishi Y, Murakami M, Nishimura Y, Matsuda S.** PI3K/AKT/PTEN Signaling as a Molecular Target in Leukemia Angiogenesis. *Adv Hematol.* **2012**;2012:1-6.
75. **Chang F, Lee JT, Navolanic PM, Steelman LS, Shelton JG, Blalock WL, et al.** Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia.* **2003**;17(3):590-603.
76. **Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J.** Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients.* **2020**;12(2):457.
77. **Anand David A, Arulmoli R, Parasuraman S.** Overviews of biological importance of quercetin: A bioactive flavonoid. *Pharmacogn Rev.* **2016**;10(20):84.
78. **Rather RA, Bhagat M.** Quercetin as an innovative therapeutic tool for cancer chemoprevention: Molecular mechanisms and implications in human health. *Cancer Med.* **2020**;9(24):9181-92.
79. **Xu W, Xie S, Chen X, Pan S, Qian H, Zhu X.** Effects of Quercetin on the Efficacy of Various Chemotherapeutic Drugs in Cervical Cancer Cells. *Drug Des Devel Ther.* **2021**;15:577-88.
80. **Vafadar A, Shabaninejad Z, Movahedpour A, Fallahi F, Taghavipour M, Ghasemi Y, et al.** Quercetin and cancer: new insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells. *Cell Biosci.* **2020**;10(1):32.
81. **Salehi B, Machin L, Monzote L, Sharifi-Rad J, Ezzat SM, Salem MA, et al.** Therapeutic Potential of Quercetin: New Insights and Perspectives for Human Health. *ACS Omega.* **2020**;5(20):11849-72.
82. **Shi H, Li XY, Chen Y, Zhang X, Wu Y, Wang ZX, et al.** Quercetin Induces Apoptosis via Downregulation of Vascular Endothelial Growth Factor/Akt Signaling Pathway in Acute Myeloid Leukemia Cells. *Front Pharmacol.* **2020**;11:534171.
83. **Mokhtari RB, Homayouni TS, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, et al.** Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget.* **2017**;8(23):38022-43.
84. **Chou TC.** Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res.* **2010**;70(2):440-6.
85. **Chaitanya Thandra K, Barsouk A, Saginala K, Sukumar Aluru J, Barsouk A.** Epidemiology of lung cancer. *Współczesna Onkol.* **2021**;25(1):45-52.
86. **Zhang QY, Wang FX, Jia KK, Kong LD.** Natural Product Interventions for Chemotherapy and Radiotherapy-Induced Side Effects. *Front Pharmacol.* **2018**;9:1253.
87. **Wen T, Song L, Hua S.** Perspectives and controversies regarding the use of natural products for the treatment of lung cancer. *Cancer Med.* **2021**;10(7):2396-422.

88. **Sun W, Sanderson PE, Zheng W.** Drug combination therapy increases successful drug repositioning. *Drug Discov Today.* **2016**;21(7):1189-95.
89. **Yap TA, Omlin A, de Bono JS.** Development of Therapeutic Combinations Targeting Major Cancer Signaling Pathways. *J Clin Oncol.* **2013**;31(12):1592-605.
90. **Chai R, Xu C, Lu L, Liu X, Ma Z.** Quercetin inhibits proliferation of and induces apoptosis in non-small-cell lung carcinoma via the lncRNA SNHG7/miR-34a-5p pathway. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* **2021**;43(6):693-703.
91. **Pratheeshkumar P, Budhraja A, Son YO, Wang X, Zhang Z, Ding S, et al.** Quercetin Inhibits Angiogenesis Mediated Human Prostate Tumor Growth by Targeting VEGFR- 2 Regulated AKT/mTOR/P70S6K Signaling Pathways. Gautam S, editör. *PLoS ONE.* **2012**;7(10):e47516.
92. **Siegelin MD, Reuss DE, Habel A, Rami A, von Deimling A.** Quercetin promotes degradation of survivin and thereby enhances death-receptor-mediated apoptosis in glioma cells. *Neuro-Oncol.* **2009**;11(2):122-31.
93. **Vargas AJ, Burd R.** Hormesis and synergy: pathways and mechanisms of quercetin in cancer prevention and management: *Nutrition Reviews*©, Vol. 68, No. 7. *Nutr Rev.* **2010**;68(7):418-28.
94. **Mohana S, Ganesan M, Agilan B, Karthikeyan R, Srithar G, Beulah Mary R, et al.** Screening dietary flavonoids for the reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in cancer. *Mol Biosyst.* **2016**;12(8):2458-70.
95. **Robinson K, Tiriveedhi V.** Perplexing Role of P-Glycoprotein in Tumor Microenvironment. *Front Oncol.* **2020**;10:265.
96. **Wang Y, Fei D, Vanderlaan M, Song A.** Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis.* **2004**;7(4):335-45.
97. **Lauro S, Onesti CE, Righini R, Marchetti P.** The Use of Bevacizumab in Non-Small Cell Lung Cancer: An Update. *ANTICANCER Res.* **2014**;9.
98. **Sandler A, Schiller JH, Johnson DH.** Paclitaxel-Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* **2006**;9.
99. **Sak K.** Chemotherapy and Dietary Phytochemical Agents. *Chemother Res Pract.* **2012**:1-11.
100. **Shi L, Zhang S, Wu H, Zhang L, Dai X, Hu J, et al.** MiR-200c Increases the Radiosensitivity of Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Line A549 by Targeting VEGF-VEGFR2 Pathway. Yue J, editör. *PLoS ONE.* **2013**;8(10):e78344.
101. **Xie J, Liu J, Liu H, Liang S, Lin M, Gu Y, et al.** The antitumor effect of tanshinone IIA on anti-proliferation and decreasing VEGF/VEGFR2 expression on the human non-small cell lung cancer A549 cell line. *Acta Pharm Sin B.* **2015**;5(6):554-63.
102. **Duffy AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH.** Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF. *Madame Curie Bioscience Database. Landes Bioscience;* **2013.**
103. **Videira PA, Piteira AR, Cabral MG, Martins C, Correia M, Severino P, et al.** Effects of Bevacizumab on Autocrine VEGF Stimulation in Bladder Cancer Cell Lines. *Urol Int.* **2011**;86(1):95-101.
104. **Wey JS, Stoeltzing O, Ellis LM.** Vascular endothelial growth factor receptors: expression and function in solid tumors. *Clin Adv Hematol Oncol HO.* **2004**;2(1):37-45.

105. **Gee MFW, Tsuchida R, Eichler-Jonsson C, Das B, Baruchel S, Malkin D.** Vascular endothelial growth factor acts in an autocrine manner in rhabdomyosarcoma cell lines and can be inhibited with all-trans-retinoic acid. *Oncogene*. **2005**;24(54):8025-37.
106. **Perrot-Applanat M, Di Benedetto M.** Autocrine functions of VEGF in breast tumor cells: Adhesion, survival, migration and invasion. *Cell Adhes Migr*. **2012**;6(6):547-53.
107. **Bachelder RE, Crago A, Chung J, Wendt MA, Shaw LM, Robinson G, et al.** Vascular Endothelial Growth Factor Is an Autocrine Survival Factor for Neuropilin-expressing Breast Carcinoma Cells. **2001**;5.
108. **Barr M, Bouchier-Hayes D, Harmey J.** Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for breast tumour cells under hypoxia. *Int J Oncol* **2008**;32(1):41-8.
109. **Mercurio AM, Lipscomb EA, Bachelder RE.** Non-Angiogenic Functions of VEGF in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. **2005**;10(4):283-90.
110. **Pidgeon GP, Barr MP, Harmey JH, Foley DA, Bouchier-Hayes DJ.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br J Cancer*. **2001**;85(2):273-8.
111. **Lee HS, Kim J.** Constitutive expression of vascular endothelial cell growth factor (VEGF) gene family ligand and receptors on human upper and lower airway epithelial cells: Expression of VEGF genes on nasal epithelial cells. *Int Forum Allergy Rhinol*. **2014**;4(1):8-14.
112. **Shi H, Bi H, Sun X, Dong H, Jiang Y, Mu H, Liu G, Kong W, Gao R, Su J, Su J, et al:** Antitumor effects of Tubeimoside-1 in NCI-H1299 cells are mediated by microRNA-126-5p-induced inactivation of VEGF-A/VEGFR-2/ERK signaling pathway. *Mol Med Rep*. **2018**;17: 4327-4336.
113. **Luo H, England CG, Graves SA, Sun H, Liu G, Nickles RJ, et al.** PET Imaging of VEGFR-2 Expression in Lung Cancer with 64 Cu-Labeled Ramucirumab. *J Nucl Med*. **2016**;57(2):285-90.
114. **Bonnesen B, Pappot H, Holmstav J, Skov BG.** Vascular endothelial growth factor A and vascular endothelial growth factor receptor 2 expression in non-small cell lung cancer patients: Relation to prognosis. *Lung Cancer*. **2009**;66(3):314-8.
115. **Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Delghandi MP, Persson M, Nilsen MN, et al.** Inverse Prognostic Impact of Angiogenic Marker Expression in Tumor Cells versus Stromal Cells in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. **2007**;13(22):6649-57.
116. **Holzer TR, Fulford AD, Nedderman DM, Umberger TS, Hozak RR, Joshi A, et al.** Tumor Cell Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Is an Adverse Prognostic Factor in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Lung. Hoffmann AC, editor. *PLoS ONE*. **2013**;8(11):e80292.
117. **Kajita T, Ohta Y, Kimura K, Tamura M, Tanaka Y, Tsunozuka Y, et al.** The expression of vascular endothelial growth factor C and its receptors in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. **2001**;85(2):255-60.
118. **Samec M, Liskova A, Koklesova L, Samuel SM, Zhai K, Buhrmann C, et al.** Flavonoids against the Warburg phenotype—concepts of predictive, preventive and personalised medicine to cut the Gordian knot of cancer cell metabolism. *EPMA J*. **2020**;11(3):377-98.
119. **Liberti MV, Locasale JW.** The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci*. **2016**;41(3):211-8.

120. **Goodwin ML, Gladden LB, Nijsten MW, Jones KB.** Lactate and cancer: revisiting the warburg effect in an era of lactate shuttling. *Front Nutr.* **2015**;1:27.
121. **Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C.** The Anti-Cancer Effect of Quercetin: Molecular Implications in Cancer Metabolism. *Int J Mol Sci.* 28 Haziran **2019**;20(13):3177.
122. **Guo H, Ding H, Tang X, Liang M, Li S, Zhang J, et al.** Quercetin induces pro-apoptotic autophagy via SIRT1 / AMPK signaling pathway in human lung cancer cell lines A549 and H1299 in vitro. *Thorac Cancer.* **2021**;12(9):1415-22.
123. **Chang JH, Lai SL, Chen WS, Hung WY, Chow JM, Hsiao M, et al.** Quercetin suppresses the metastatic ability of lung cancer through inhibiting Snail-dependent Akt activation and Snail-independent ADAM9 expression pathways. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* **2017**;1864(10):1746-58.
124. **Xiong YQ, Sun HC, Zhu XD, Zhang W, Zhuang PY, Zhang JB, et al.** Bevacizumab enhances chemosensitivity of hepatocellular carcinoma to adriamycin related to inhibition of survivin expression. *J Cancer Res Clin Oncol.* **2011**;137(3):505-12.
125. **Lee SY.** Inhibitory Effect of Bevacizumab on the Angiogenesis and Growth of Retinoblastoma. *Arch Ophthalmol.* **2008**;126(7):953.
126. **Mabuchi S, Terai Y, Morishige K, Tanabe-Kimura A, Sasaki H, Kanemura M, et al.** Maintenance Treatment with Bevacizumab Prolongs Survival in an *In vivo* Ovarian Cancer Model. *Clin Cancer Res.* **2008**;14(23):7781-9.
127. **Tahtamouni L, Ahram M, Koblinski J, Rolfo C.** Molecular Regulation of Cancer Cell Migration, Invasion, and Metastasis. *Anal Cell Pathol.* **2019**;1-2.
128. **Dong Y, Yang J, Yang L, Li P.** Quercetin Inhibits the Proliferation and Metastasis of Human Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line: The Key Role of Src-Mediated Fibroblast Growth Factor-Inducible 14 (Fn14)/ Nuclear Factor kappa B (NF-κB) pathway. *Med Sci Monit Med Sci Monit.* **2020**;30:26:e920537.
129. **Klimaszewska-Wiśniewska A, Halas-Wiśniewska M, Izdebska M, Gagat M, Grzanka A, Grzanka D.** Antiproliferative and antimetastatic action of quercetin on A549 non-small cell lung cancer cells through its effect on the cytoskeleton. *Acta Histochem.* **2017**;119(2):99-112.
130. **Wu TC, Chan ST, Chang CN, Yu PS, Chuang CH, Yeh SL.** Quercetin and chrysin inhibit nickel-induced invasion and migration by downregulation of TLR4/NF-κB signaling in A549 cells. *Chem Biol Interact.* **2018**;292:101-9.
131. **Zhang L, Chen Y, Li F, Bao L, Liu W.** Atezolizumab and Bevacizumab Attenuate Cisplatin Resistant Ovarian Cancer Cells Progression Synergistically via Suppressing Epithelial-Mesenchymal Transition. *Front Immunol.* **2019**;10:867.
132. **Hein M, Graver S.** Tumor cell response to bevacizumab single agent therapy in vitro. *Cancer Cell Int.* **2013**;13(1):94.
133. **Kunter I, Erdal E, Nart D, Yilmaz F, Karademir S, Sagol O, et al.** Active form of AKT controls cell proliferation and response to apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* **2014**;31(2):573-80.
134. **Liu S, Knapp S, Ahmed AA.** The Structural Basis of PI3K Cancer Mutations: From Mechanism to Therapy. *Cancer Res.* **2014**;74(3):641-6.

135. **Iksen, Pothongsrisit S, Pongrakhananon V.** Targeting the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Lung Cancer: An Update Regarding Potential Drugs and Natural Products. *Molecules*. **2021**;26(13):4100.
136. **Prabhu KS, Siveen KS, Kuttikrishnan S, Iskandarani A, Tsakou M, Achkar IW, et al.** Targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein and PI3-kinase/AKT signaling by embelin suppresses growth of leukemic cells. Asselin E, editor. *PLOS ONE*. **2017**;12(7):e0180895.
137. **Adams JM, Cory S.** The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death Differ*. **2018**;25(1):27-36.
138. **Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, Hay N.** Akt/Protein Kinase B Inhibits Cell Death by Preventing the Release of Cytochrome *c* from Mitochondria. *Mol Cell Biol*. **1999**;19(8):5800-10.
139. **Zhaorigetu, Farrag IM, Belal A, Badawi MHA, Abdelhady AA, Galala FMAA, et al.** Antiproliferative, Apoptotic Effects and Suppression of Oxidative Stress of Quercetin against Induced Toxicity in Lung Cancer Cells of Rats: *In vitro* and *In vivo* Study. *J Cancer*. **2021**;12(17):5249-59.
140. **Zheng SY, Li Y, Jiang D, Zhao J, Ge JF.** Anticancer effect and apoptosis induction by quercetin in the human lung cancer cell line A-549. *Mol Med Rep*. **2012**;5(3):822-6.
141. **Zanoaga O, Braicu C, Jurj A, Rusu A, Buiga R, Berindan-Neagoe I.** Progress in Research on the Role of Flavonoids in Lung Cancer. *Int J Mol Sci*. **2019**;20(17):4291.
142. **Zhao Z, Xia G, Li N, Su R, Chen X, Zhong L.** Autophagy Inhibition Promotes Bevacizumab-induced Apoptosis and Proliferation Inhibition in Colorectal Cancer Cells. *J Cancer*. **2018**;9(18):3407-16.
143. **Wang LL, Hu RC, Dai AG, Tan SX.** Bevacizumab induces A549 cell apoptosis through the mechanism of endoplasmic reticulum stress in vitro. *Int J Clin Exp Pathol*. **2015**;8(5):5291-9.
144. **Ferrari G, Pintucci G, Seghezzi G, Hyman K, Galloway AC, Mignatti P.** VEGF, a prosurvival factor, acts in concert with TGF- β 1 to induce endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*. **2006**;103(46):17260-5.
145. **Koh H, Tasaka S, Hasegawa N, Yamada W, Shimizu M, Nakamura M, et al.** Protective role of vascular endothelial growth factor in endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Respir Res*. **2007**;8(1):60.
146. **Mahfouz N, Tahtouh R, Alaaeddine N, El Hajj J, Sarkis R, Hachem R, et al.** Gastrointestinal cancer cells treatment with bevacizumab activates a VEGF autoregulatory mechanism involving telomerase catalytic subunit hTERT via PI3K-AKT, HIF-1 α and VEGF receptors. Mohanraj R, editor. *PLOS ONE*. **2017**;12(6):e0179202.
147. **Ganesan K, Xu B.** Telomerase Inhibitors from Natural Products and Their Anticancer Potential. *Int J Mol Sci*. **2017**;19(1):13.
148. **Wang J, Zhang P, Tu Z.** Effects of quercetin on proliferation of lung cancer cell line A549 by down-regulating hTERT gene expression. *J Third Mil Med Univ. J. Third Mil. Med. Univ*. **2007**, 29, 1852–1854.
149. **Srivastava S, Somasagara RR, Hegde M, Nishana M, Tadi SK, Srivastava M, et al.** Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Sci Rep*. **2016**;6(1):24049.

150. **Son YO, Lee KY, Kook SH, Lee JC, Kim JG, Jeon YM, et al.** Selective effects of quercetin on the cell growth and antioxidant defense system in normal versus transformed mouse hepatic cell lines. *Eur J Pharmacol.* **2004**;502(3):195-204.