



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE
DOSETAKSEL'İN WNT SİNYAL YOLU İNHİBİTÖRÜ FH535 İLE
BİRLİKTE KULLANIMININ ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Eda Nur AVŞAR

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi İdil ÇETİN**

Aralık, 2022

İSTANBUL

Bu çalışma, 19.12.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Dr. Öğr. Üyesi İdil ÇETİN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Mehmet Rıfki TOPÇUL
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Dr. Öğr. Üyesi Suna ÖZBAŞ
Marmara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

İntihal Programı Beyanı

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Proje Destekleri

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin FYL-2022-38471 numaralı projesi ile desteklenmiştir.



ÖNSÖZ

...
yahut kocaman gözlüklerin,
beyaz gömleğinle bir laboratuvarda
insanlar için ölebileceksin,
hem de yüzünü bile görmediğin insanlar için,
hem de hiç kimse seni buna zorlamamışken,
hem de en güzel, en gerçek şeyin
yaşamak olduğunu bildiğin halde.

Nazım Hikmet

Hayalini kurduğum akademik eğitim yolunda bana olan inancıyla güç veren ve bu yolda tecrübelerini benden esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi İdil ÇETİN'e en büyük teşekkürü borç bilirim.

Tez çalışmam sırasında deneyim ve tecrübelerini benden esirgemeyerek bana güvenen ve İleri Kanser ve İlaç Biyoteknolojileri Araştırma Laboratuvarı'nın imkanlarını sunan değerli hocam Doç. Dr. Mehmet R. TOPÇUL'a teşekkürlerimi sunarım.

Öğrencileri için fayda sağlama ilkesiyle her öğrencisine yardımcı olan ve beni kendi öğrencilerinden ayrı tutmayan değerli hocam Prof. Dr. Lütfü İLGAR'a; desteklerinden ötürü Dr. Özgür SOYDAN'a; lisans eğitimimden bu yana hem akademik hayatımda iyi bir bilim insanı olma yolunda bana rol model olan hem de akademik hayatım dışında bilgi, birikim ve manevi desteklerini benden bir an olsun esirgemeyen hocalarım Arş. Gör. Dr. Almıla ÇİFTÇİ'ye, Öğr. Gör. Dr. Hande MORGİL GERÇEK'e ve Öğr. Gör. Dr. Yusuf Can GERÇEK'e teşekkür ederim.

Her zaman en yakınım olan meslektaş, dost ve kardeş kadar yakın olmaktan gurur duyduğum, her adımlarında omuz omuza olmak ümidini taşıdığım dostlarım Arş. Gör. Harun İNCİ'ye ve Biyolog Sevcan AYDIN'a; aynı yolda birbirimize destek vererek yürümekten gurur duyduğum ekip arkadaşım ve dostum Biyolog Ceren F. AGAN'a; lisans eğitimimin başından bu yana desteğini esirgemeyen ve beni kardeşi yerine koyan Cenk KARASAÇ'a teşekkür ederim.

Bu hayattaki en değerli varlıklarım olan ve çocukları olmaktan gurur duyduğum, her koşulda beni destekleyen canım annem Esengül AVŞAR'a, canım babam Ergin AVŞAR'a ve ablası olmaktan gurur duyduğum A. Tolga AVŞAR'a en büyük teşekkürü ederim.

Bu tez çalışmasını, kısa bir süre önce aramızdan ayrılan ve bu başarıyı görmeyi en çok hak edenlerden olan canım anneannem Nejla GÜNEŞ'e ithaf ediyorum. Başardım anneanneciğim...

Eda Nur AVŞAR

Aralık 2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xi
ÖZET.....	xvi
SUMMARY.....	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1. AKCİĞER	4
2.2. KANSER	5
2.3. AKCİĞER KANSERİ	6
2.3.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)	8
2.3.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)	8
2.3.2.1. Adenokarsinom	9
2.3.2.2. Skuamöz Hücreli Karsinom	9
2.3.2.3. Büyük Hücreli Karsinom	9
2.4. WNT SİNYAL YOLAĞI	10
2.4.1. WNT/ β -Katenin (Kanonik/Klasik) Sinyal Yolağı	11
2.4.1.1. Fz ve LRP5/6 Reseptörleri	12
2.4.1.2. Dvl	13
2.4.1.3. Axin	13
2.4.1.4. APC	14
2.4.1.5. GSK-3 β	14

2.4.1.6. CK	14
2.4.1.7. Kaderinler	15
2.4.1.8. β -katenin	15
2.4.1.9. TCF/LEF	15
2.4.2. WNT Planar Hücre Polaritesi (PCP) Sinyal Yolağı	16
2.4.3. WNT/Ca ²⁺ Sinyal Yolağı.....	17
2.4.4. WNT Sinyal Yolağının Aktivasyonu.....	18
2.4.5. WNT Sinyal Yolağı Yokluğu.....	19
2.5. WNT SİNYAL YOLAğI ve AKCİĞER KANSERİ.....	20
2.6. WNT İNHİBİTÖRLERİ.....	21
2.6.1. sFRP.....	21
2.6.2. Dkk.....	21
2.6.2.1. WNT İnhibitörü: FH535.....	22
2.8. DOSETAKSEL (DTX).....	23
2.9. APOPTOZ.....	24
2.9.1. Apoptoz Mekanizması.....	25
2.9.1.1. İntrensik Yol.....	26
2.9.1.2. Ekstrinsik Yol.....	26
2.9.2. Apoptozun Düzenlenmesi.....	27
2.9.2.1. BCL-2 Ailesi.....	27
2.9.2.2. Tümör protein 53	27
2.9.2.3. FAS	27
2.9.2.4. Kaspazlar.....	27
2.10. HÜCRE DÖNGÜSÜ ve KANSER İLİŐKİŐİ.....	28
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	31
3.1. KULLANILAN HÜCRE SOYLARI	31
3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ.....	31

3.3. HÜCRELERİN EKİM İŞLEMİ.....	31
3.4. İLAÇ KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI ve UYGULANMASI.....	32
3.4.1. DTX.....	32
3.4.2. FH535.....	32
3.4.3. DTX + FH535 Kombine Çalışması.....	32
3.5. ÇOĞALMA HIZI: MİTOKONDRIYAL DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ ANALİZİ (MTT).....	33
3.6. xCELLigence DP GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZİ (RTCA).....	34
3.7. MİTOTİK AKTİVİTE ANALİZİ.....	35
3.8. BrdU HÜCRE PROLİFERASYON ANALİZİ.....	36
3.9. KASPAZ 3,7 AKTİVİTE ANALİZİ	36
3.10. İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME.....	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. ÇOĞALMA HIZI: MİTOKONDRIYAL DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ ANALİZİ (MTT) BULGULARI.....	38
4.2. xCELLigence DP GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZİ BULGULARI.....	47
4.3. MİTOTİK AKTİVİTE ANALİZİ BULGULARI.....	52
4.4. BrdU HÜCRE PROLİFERASYON ANALİZİ BULGULARI.....	53
4.5. KASPAZ 3,7 AKTİVİTE ANALİZİ BULGULARI.....	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	56
KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ	77

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Akciğer anatomisi. Şekil, Aung ve diğ., (2019)'den Türkçe'ye çevrilip değiştirilerek yeniden çizilmiştir.....4
- Şekil 2.2:** Kanser türlerine göre insidans ve mortalite oranları. Şekil, Sung ve diğ., (2021)'den Türkçe'ye çevrilip yeniden çizilmiştir.....6
- Şekil 2.3:** Akciğer kanseri türleri ve mikroskopik görüntüleri. Şekil, National Cancer Institute (2018)'den değiştirilerek Türkçe'ye çevrilip yeniden çizilmiştir.....10
- Şekil 2.4:** WNT/ β -katenin Sinyal Yolağı. Şekil, Patel ve diğ., (2019)'den değiştirilerek Türkçe'ye çevrilip yeniden çizilmiştir.....12
- Şekil 2.5:** WNT PCP sinyal yolağı. Şekil, Kahn ve Kim, (2014)'den Türkçe'ye çevrilerek yeniden çizilmiştir.....16
- Şekil 2.6:** WNT/ Ca^{+2} sinyal yolağı. Şekil, Kahn ve Kim, (2014)'den Türkçe'ye çevrilip değiştirilerek yeniden çizilmiştir.....17
- Şekil 2.7:** WNT sinyal yolağının aktif ve inaktif durumu. Şekil, Sonderegger, (2010)'den değiştirilip Türkçe'ye çevrilerek yeniden çizilmiştir.19
- Şekil 2.8:** FH535 yapısı National Center for Biotechnology Information, (2022).....22
- Şekil 2.9:** DTX molekül formülü. National Center for Biotechnology Information, (2022)...23
- Şekil 2.10:** Apoptoz mekanizması. Şekil, Celepli ve diğ., (2020)'den Türkçe'ye çevrilip değiştirilerek yeniden çizilmiştir.....25
- Şekil 2.11:** Hücre siklusu Matthews ve diğ., (2021)'den Türkçe'ye çevrilerek yeniden çizilmiştir.....29
- Şekil 4.1:** 24, 48 ve 72 saat süresince 0,01 μ M, 0,1 μ M ve 1 μ M DTX uygulanan A549 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrolle göre anlamlı $p<0.05$).....39
- Şekil 4.2:** 24, 48 ve 72 saat süresince 0,01 μ M, 0,1 μ M ve 1 μ M DTX uygulanan A549 hücrelerine ait % canlılık değerleri (Kontrolle göre anlamlı $p<0.05$).....39
- Şekil 4.3:** 24, 48 ve 72 saat süresince 0,5 μ M, 1 μ M ve 5 μ M FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrolle göre anlamlı $p<0.05$).....40

Şekil 4.4: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,5 µM, 1 µM ve 5 µM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait % canlılık değerleri.....	41
Şekil 4.5: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,01 µM, 0,1 µM ve 1 µM DTX uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrolle göre anlamlı p<0.05).	42
Şekil 4.6: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,01 µM, 0,1 µM ve 1 µM DTX uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait % canlılık değerleri.....	42
Şekil 4.7: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,5 µM, 1 µM ve 5 µM FH535 uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrolle göre anlamlı p<0.05).	43
Şekil 4.8: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,5 µM, 1 µM ve 5 µM FH535 uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait % canlılık değerleri (Kontrolle göre anlamlı p<0.05).....	44
Şekil 4.9: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535; 0,0025 µM DTX+0,5 µM FH535 ve 0,005 µM DTX+0,25 µM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrolle göre anlamlı p<0.05).....	45
Şekil 4.10: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535; 0,0025 µM DTX+0,5 µM FH535 ve 0,005 µM DTX+0,25 µM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait canlılık değerleri (Kontrolle göre anlamlı p<0.05).....	45
Şekil 4.11: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535; 0,0025 µM DTX+0,5 µM FH535 ve 0,005 µM DTX+0,25 µM FH535 uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrolle göre anlamlı p<0.05).	46
Şekil 4.12: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535; 0,0025 µM DTX+0,5 µM FH535 ve 0,005 µM DTX+0,25 µM FH535 uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait % canlılık değerleri (Kontrolle göre anlamlı p<0.05).	47
Şekil 4.13: 100 saat boyunca uygulanan 1 µM, 5 µM ve 10 µM DTX uygulanan A549 hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre analiz verileri grafiği (--Kontrol, --1 µM DTX, --5 µM DTX, --10 µM DTX).	48
Şekil 4.14: 100 saat boyunca 10 µM, 20 µM ve 30 µM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre analiz verileri grafiği (--Kontrol, --10 µM FH535, --20 µM FH535 ve --30 µM FH535).....	49
Şekil 4.15: 100 saat boyunca 1 µM ve 5 µM DTX uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre analiz verileri grafiği (--Kontrol, --1 µM DTX, --5 µM DTX).....	49
Şekil 4.16: 100 saat boyunca 30 µM ve 40 µM FH535 uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre analiz verileri grafiği (--Kontrol, --30 µM FH535, --40 µM FH535).....	50

Şekil 4.17: : 100 saat boyunca 0,1 μM DTX, 0,5 μM FH535 ve 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535 kombin doz uygulanan uygulanan A549 hüccesine ait gerçek zamanlı hücre analiz verileri grafiği (--Kontrol, --0,1 μM DTX, --0,5 FH535, --0,005 μM DTX+0,5 μM FH535).....51

Şekil 4.18: 100 saat boyunca 0,1 μM DTX, 0,5 μM FH535 ve 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535 kombin doz uygulanan uygulanan BEAS-2B hüccesine ait gerçek zamanlı hücre analiz verileri grafiği (--Kontrol, --0,1 μM DTX, --0,5 μM FH535, --0,05 μM DTX+0,5 μM FH535).....51

Şekil 4.19: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535 uygulanan A549 hüccelerine ait % mitotik aktivite değerleri (Kontrolde göre anlamlı $p<0.05$).52

Şekil 4.20: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535 uygulanan A549 hüccelerine ait % BrdU aktivitesi değerleri (Kontrolde göre anlamlı $p<0.05$).53

Şekil 4.21: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535 uygulanan A549 hüccelerine ait % kaspaz 3,7 aktivite değerleri (Kontrolde göre anlamlı $p<0.05$).55

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

- Tablo 4.1:** 24, 48 ve 72 saat süresince 0,01 μM , 0,1 μM ve 1 μM DTX uygulanan A549 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (*Kontrole göre anlamlı $p<0.05$).....38
- Tablo 4.2:** 24, 48 ve 72 saat süresince 0,5 μM , 1 μM ve 5 μM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (*Kontrole göre anlamlı $p<0.05$).....40
- Tablo 4.3:** 24, 48 ve 72 saat süresince 0,01 μM , 0,1 μM ve 1 μM DTX uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (*Kontrole göre anlamlı $p<0.05$).....41
- Tablo 4.4:** 24, 48 ve 72 saat süresince 0,5 μM , 1 μM ve 5 μM FH535 uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (Kontrole göre anlamlı $p<0.05$).....43
- Tablo 4.5:** 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535; 0,0025 μM DTX+0,5 μM FH535 ve 0,005 μM DTX+0,25 μM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (*Kontrole göre anlamlı $p<0.05$).....44
- Tablo 4.6:** 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535; 0,0025 μM DTX+0,5 μM FH535 ve 0,005 μM DTX+0,25 μM FH535 uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (*Kontrole göre anlamlı $p<0.05$).46
- Tablo 4.7:** 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait mitotik aktivite değerleri (450-655 nm) (*Kontrole göre anlamlı $p<0.05$).....52
- Tablo 4.8:** 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait BrdU aktivitesi değerleri (450-550 nm) (*Kontrole göre anlamlı $p<0.05$).....53
- Tablo 4.9:** 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait kaspaz 3,7 aktivite değerleri (490-520 nm) (*Kontrole göre anlamlı $p<0.05$)...54

SİMGE VE KISALTIMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
Ca^{+2}	:Kalsiyum
CO_2	:Karbondioksit
G	:Dönme hızı
IU	:Uluslararası ünite
kDa	:Kilodalton
m^2	:Metrekare
mg	:Miligram
ml	:Mililitre
NaHCO_3	:Sodyum Bikarbonat
nm	:Nanometre
pH	:Potansiyel Hidrojen
μg	:Mikrogram
μl	:Mikrolitre
μm	:Mikromolar
$^\circ\text{C}$:Santigrat

Kısaltmalar	Açıklama
AIF	:Apoptoz İndükleyici Faktör
ALK	:Anaplastik Lenfoma Kinaz
ATP	:Adenozin trifosfat
Apaf-1	:Apoptotik proteaz aktive eden faktör-1
APC	:Adenomatosis Poliposis Koli
BrdU	:5-Bromo-2'-deoksiüridin
BT	:Bilgisayarlı Tomografi
β-katenin	:Beta-katenin

CAD	:Kaspaz Aktive Edici DNaz
CamKII	:Ca ²⁺ /kalmodulin Bağımlı Protein Kinaz II
CBP	:CREB-bağlayıcı Protein
Cdc42	:Hücre Bölünmesi Kontrol Proteini 42
CER	:Cerberus
CI	:Kombinasyon indeksi
CK	:Kazein Kinaz
CKα	:Kazein Kinaz Alfa
CKβ1	:Kazein Kinaz Beta-1
CKγ1	:Kazein Kinaz Gama-1
CKγ2	:Kazein Kinaz Gama-2
CKγ3	:Kazein Kinaz Gama-3
CKδ	:Kazein Kinaz Delta
CKϵ	:Kazein Kinaz Epsilon
CRD	:Sisteince Zengin Bölge
CT	:Bilgisayarlı Tomografi
dH₂O	:Distile su
DISC	:Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
Dkk	:Dickkopf
Dkk-1	:Dickkopf-1
Dkk-2	:Dickkopf-2
Dkk-3	:Dickkopf-3
Dkk-4	:Dickkopf-4
DMSO	:Dimetil sülfoksit
DNA	:Deoksiribonükleik Asit
DTX	:Doksetaksel
Dvl	:Dishevelled

(D)₁	:(D) ₂ ile kombinasyon halinde IC ₅₀ için ilaç 1'in dozu
(D)₂	:(D) ₁ ile kombinasyon halinde IC ₅₀ için ilaç 2'nin dozu
(D_x)₁	:Tek başına IC ₅₀ için ilaç 1'in dozu
(D_x)₂	:Tek başına IC ₅₀ için ilaç 2'nin dozu
EGFR	:Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
Endo-G	:Endonükleaz-G
ER	:Endoplazmik Retikulum
FADD	:FAS ile İlişkili Ölüm Alanı Proteini
FBS	:Fetal Bovine Serum
FGFR1	:Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1
FH535	:2,5-Dikloro-N-(2-metil-4-nitrofenil)benzenülfonamid
Fz	:Frizzled
GSK-3β	:Glikojen Sentaz Kinaz-3 β
ICAD	:İnaktif Kaspaz Aktive Edici DNaz
IC₅₀	:Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
KHAK	:Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	:Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
LRP5/6	:Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptör İlişkili Protein 5/6
MRG	:Manyetik Rezonans Görüntüleme
MTT	:3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolyum bromür
PBS	:Fosfat Tamponlu Tuzlu Su
PCP	:Planar Hücre Polaritesi
PD-L1	:Programlanmış Ölüm-ligandı 1
PET	:Pozisyon Emisyon Tomografisi
PKC	:Protein Kinaz C Protein
P300	:Histon Asetiltransferaz p300
RPMI-1640	:Roswell Park Memorial Institute-1640

ROS1	:Proto-onkojen Tirozin-protein Kinaz 1
sFRP	:Salgılanan Frizzled-ilişkili Protein
Smac	:Kaspazın İkinci Mitokondri Kaynaklı Aktivatörü
TCF/LEF	:T Hücre Faktörü/lenfosit Güçlendirici Bağlayıcı Faktör
TNKS1/2	:Tankiraz 1/2
TTF-1	:Tiroid Transkripsiyon Faktörü-1
xCelligence RTCA-DP	:xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi-Dual Purpose
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü
WIF	:WNT İnhibitör Faktör
WIF-1	:WNT İnhibitör Faktör-1

ÖZET

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE DOSETAKSEL'İN WNT SİNYAL YOLU İNHİBİTÖRÜ FH535 İLE BİRLİKTE KULLANIMININ ANTİPROLİFERATİF ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Eda Nur AVŞAR

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İdil ÇETİN

Çalışmamızda, KHDAK tedavisinde kullanılan DTX ve WNT sinyal yolağı inhibitörü olan FH535'in kombin halde kullanımının adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyum hücresi A549 ve sağlıklı bronşiyal epitel hücresi BEAS-2B hücre hatları üzerindeki etkileri MTT ve gerçek zamanlı hücre analizi ile değerlendirilmiştir. A549 kanser hücresinin aktivitesini azaltırken BEAS-2B sağlıklı akciğer hücresinde minimum zararı gösteren kombin doz belirlenerek KHDAK'de mitotik aktivite analizi, BrdU analizi ve kaspaz 3-7 aktivite analizi yöntemleriyle *in vitro* koşullarda bu kombin dozun hücresel seviyede meydana getirdiğı etkilerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda sağlıklı akciğer hücresine minimum zararı verirken; KHDAK hücresinde antiproliferatif etkiyi gösteren dozun belirlenmesiyle birlikte mevcut tedavi protokollerine ek yeni tedavi protokollerinin oluşturulması hedeflenmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre; 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 kombinasyon dozunun KHDAK hücre hattı olan A549'da anti-mitotik etki göstererek mitotik katastrofa neden olduğı; sağlıklı akciğer hücresi BEAS-2B'ye minimum zararı vererek tek başına DTX kullanımında verilen sitotoksik etkiden daha fazla zarar vermediğı tespit edilmiştir. Bu kombinasyon dozunun ayrı ayrı verilen DTX ve FH535 dozlarının verdiğı etkiden daha yüksek bir etki göstererek 0,37505 kombinasyon indeksi değeriyle yüksek sinerjik etkide olduğı tespit edilmiştir. Dolayısıyla

A549 hücre hattına uygulanan kombin dozun, hücre üzerindeki etkisinin tek başına her iki ajanın kullanılmasından daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, kombin uygulama sonrası A549 hücre hattında çoğalma hızı anlamlı şekilde azalmıştır. Gerçek zamanlı hücre analizinde hücrenin anti-mitotik aktivitesinin artarak mitotik katastrof yoluyla ölüme gittiği görülmüştür. Mitotik aktivite analizi sonuçları da gerçek zamanlı hücre analizinden elde edilen mitotik katastrof sonucunu destekleyici şekilde sonuçlanarak kontrol grubuna kıyasla mitotik aktivitede 72 saatte azalma görülmüştür. BrdU analizi ile kombin uygulama sonrası hücre siklusunun sentez fazında, hücre proliferasyonunun nasıl etkilendiği incelenmiştir. BrdU aktivitesinin zamana bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla 72 saatte %68'lere düştüğü görülmüştür. Bu sonuç, mitotik aktivite analizi sonuçlarına paralel olarak mitoz bölünmenin azalmasıyla proliferen hücre sayısının da azaldığının bir göstergesidir. Hücre canlılığında ve mitotik aktivitedeki azalmaya bağlı olarak hücrenin kombin doz uygulaması sonrası apoptotik hücre ölüm yolağını kullanarak ölüme gidip gitmediğini belirlemek amacıyla kaspaz 3,7 aktivitesine bakılmıştır. Kontrol grubuna kıyasla aktivitede anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu sonuç, gerçek zamanlı hücre analizinden elde edilen verilerle uyumlu olarak kombin doz uygulaması yapılan kanser hücresinin apoptotik hücre ölüm yolağını kullanarak ölmediğini, dolayısıyla anti-mitotik etkiyle; mitotik katastrof yolağını kullanarak ölüme gittiği fikrini desteklemektedir. Çalışmamızda, DTX ve FH535 kombinasyonunun KHDAK modeli A549 hücre hattı ve BEAS-2B sağlıklı akciğer hücre hattındaki etkileri ilk kez gösterilmiştir.

Aralık 2022, 94 sayfa.

Anahtar kelimeler:Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri, A549, BEAS-2B, Dosetaksel, FH535, WNT Sinyal Yolu

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS OF DOCETAXEL IN COMBINATION WITH WNT SIGNALING PATHWAY INHIBITOR FH535 IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

M.Sc. THESIS

Eda Nur AVŞAR

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Sciences

Department of Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. İdil ÇETİN

In our study, the effects of combined use of the WNT signaling pathway inhibitor FH535 and DTX used in the treatment of NSCLC, on adenocarcinomic human alveolar basal epithelium cell A549 and healthy bronchial epithelial cell BEAS-2B cell lines were evaluated by MTT and real-time cell analysis. While A549 reduces the activity of cancer cells, it is aimed to determine the combined dose showing the minimum damage in BEAS-2B healthy lung cell and to investigate the effects of this combined dose at the cellular level *in vitro* conditions with mitotic activity analysis, BrdU analysis and caspase 3-7 activity analysis methods in NSCLC. In this context, when giving minimum damage to the healthy lung cell; with the determination of the dose showing antiproliferative effect in NSCLC cell, it is aimed to establish new treatment protocols in addition to existing treatment protocols.

According to the results we obtained; A combination dose of 0.005 μ M DTX+0.5 μ M FH535 showed anti-mitotic effects in the NSCLC cell line A549, causing mitotic catastrophism; it has been found to cause minimal damage to the healthy lung cell BEAS-2B and no more harm than the cytotoxic effect given in the use of DTX alone. This combination dose was found to have a high synergistic effect with a combination index value of 0.37505, showing a higher effect than the effect given by DTX and FH535 doses given separately. Therefore, the combined dose

applied to the A549 cell line has been shown to be more effective than the use of both agents alone.

When all the results are evaluated together, the proliferation rate in the A549 cell line was significantly reduced after the combined application. In real-time cell analysis, it was observed that the anti-mitotic activity of the cell increased and it died through mitotic catastrophe. Mitotic activity analysis results also supported the mitotic catastrophe result obtained from real-time cell analysis, and a decrease in mitotic activity was observed at 72 hours compared to the control group. It was investigated how the cell proliferation of the cell cycle in the synthesis phase was affected after the combined application with BrdU analysis. It was observed BrdU activity that decreased to 68% in 72 hours compared to the control group depending on time. As a result of, is an indication that the number of proliferated cells decreases with the reduction of mitotic division in parallel with the results of mitotic activity analysis. Caspase 3,7 activity was examined to show whether the cell died using the apoptotic cell death pathway after combined dose administration due to the decrease in cell viability and mitotic activity. There was not significant change in activity compared to the control group. This result, in parallel with the data obtained from real-time cell analysis, suggest that cancer cell treated with combined dose does not die using the apoptotic cell death pathway, and thus supports the idea that it goes to death using the mitotic catastrophe pathway within anti-mitotic effect. In our study, the effects of DTX and FH535 combination on NSCLC model A549 cell line and BEAS-2B healthy cell line were shown for the first time.

December 2022, 94 pages.

Keywords: Non-small Cell Lung Cancer, A549, BEAS-2B, Docetaxel, WNT signaling pathway, FH535

1. GİRİŞ

Kanserler, hem Dünya’da hem Türkiye’de hastalıklar arasında insidans ve mortalite oranı bakımından ikinci sırada yer almaktadır (Özgül ve diğ., 2009). Kanser türleri arasındaki insidans ve mortalite oranı karşılaştırmasında, 185 ülkede 36 farklı kanser türü arasında yapılan araştırma verilerine göre; 9.6 milyon kanser vakasından en sık görüleni olan akciğer kanseri, %18,4 mortalite oranıyla birinci sırada yer almaktadır (Bray ve diğ., 2018). 2013 yılında Dünya çapında 8 milyondan fazla kanser vakası ölümü görülmüştür (Naghavi ve diğ., 2015). Bu verilerin, gün geçtikçe ciddiyetini koruyarak artmaya devam edeceğini gösteren geçmiş yıllara ait veriler, 2020-2030 yılları arasında akciğer kanserinin diğer kanserlere kıyasla mortalite oranını koruyarak birinci sırada yer almaya devam edeceğini göstermektedir (Rahib ve diğ., 2014).

2015 yılında Dünya Sağlık Örgütü, akciğer kanserini küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olarak iki gruba ayırmıştır (Travis ve diğ., 2015). Akciğer kanserlerinin %80-85’ini oluşturan KHDAK, gecikmiş tanı ve yetersiz tedavi nedeniyle %20’lerde olan beş yıllık sağ kalım oranıyla en ölümcül kanserler arasında yer almaktadır (Molina ve diğ., 2017; Institue, 2017). Akciğer kanserinin moleküler mekanizmasının heterojen ve karmaşık olması sebebiyle tanı ve tedavide geç kalınması ve bu sebeple cerrahi rezeksiyon uygulanma şansının düşük olması gibi nedenlerden dolayı akciğer kanseri, en çok insidans ve mortalite oranı gösteren kanserlerden biridir (Bilello ve diğ., 2002). Bu sebeple hastalığın moleküler mekanizmasını aydınlatmak amacıyla hücrel yolakların aktivasyon ve inhibisyon mekanizmaları üzerine hedefli tedavi protokolü oluşturulması önem arz etmektedir. Tedavide uygulanan monoterapinin yetersiz kalması ve yan etkileri dolayısıyla hastaya zarar vermesi kombin tedavi protokollerinin geliştirilmesinin önünü açmıştır (Larsen ve Minna, 2011).

WNT sinyal yolağı, hücre proliferasyonu, sağ kalımı, kendi kendini yenileme, hücre büyümesi, hücre hareketi ve farklılaşması dahil birçok önemli hücrel süreçte rol oynamaktadır. Bu sinyal yolağında meydana gelen bozukluk veya mutasyonlar kanser başta olmak üzere birçok hastalığın patogeneziyle ilişkilendirilmektedir (Willert ve Jones, 2006). WNT proteinin hücre

membranında Frizzled ve düşük yoğunluklu lipoprotein 5/6 reseptörlerine bağlanmasıyla başlayan sinyalizasyon, hücre içinde birtakım fosforilasyonlara sebep olarak β -katenin birikimine sebep olmaktadır. Biriken β -katenin, nükleus içerisinde transkripsiyon faktörlerini aktifleştirerek birçok genin transkripsiyonunu düzenlemektedir (Nakamura ve diğ., 2005; Kestler ve Kühl, 2008).

KHDAK'de, WNT sinyal yolağında oluşan mutasyon ya da bozukluk nedeniyle fazla biriken β -katenin, *WNT-1* geninin ekspresyonunu artırır ve artan bu ekspresyon, akciğer kanseri patogenezinde de görülen bir durumdur (Akiri ve diğ., 2009; Teng ve diğ., 2010). Elde edilen bu verilere rağmen, akciğer kanserinde WNT sinyal yolağının moleküler mekanizması tam olarak aydınlığa kavuşturulamamıştır. KHDAK üzerine yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda, WNT-1 proteininin ekspresyonu inhibe edildiğinde akciğer kanserinin apoptotik ölüm yoluna gittiği gösterilmiştir (Howe ve Brown, 2004; Kim ve diğ., 2007).

WNT sinyal yolağı inhibitörlerinden biri olan FH535, spesifik bir β -katenin inhibitörüdür. β -katenin alımını baskılar ve β -katenin/TCF'nin aracılık ettiği transkripsiyonu antagonize eder (Handeli ve Simon, 2008). Karaciğer kanseri, mide kanseri, pankreas kanseri, hepatoselüler karsinoma, kolon kanseri, osteosarkoma ve miyeloid lösemi gibi birçok kanser türü üzerinde FH535'in etkilerinin incelendiği çalışmalarda, FH535'in anjiyogenezi baskıladığı, hücre proliferasyonu inhibe ettiği ve hücrede apoptotik etki gösterdiği görülmüştür (Liu ve diğ., 2016; Tomizawa ve diğ., 2016; Gustafson ve diğ., 2017; Suknuntha ve diğ., 2017; Chen ve diğ., 2017; Huo ve diğ., 2019; Qian ve diğ., 2019).

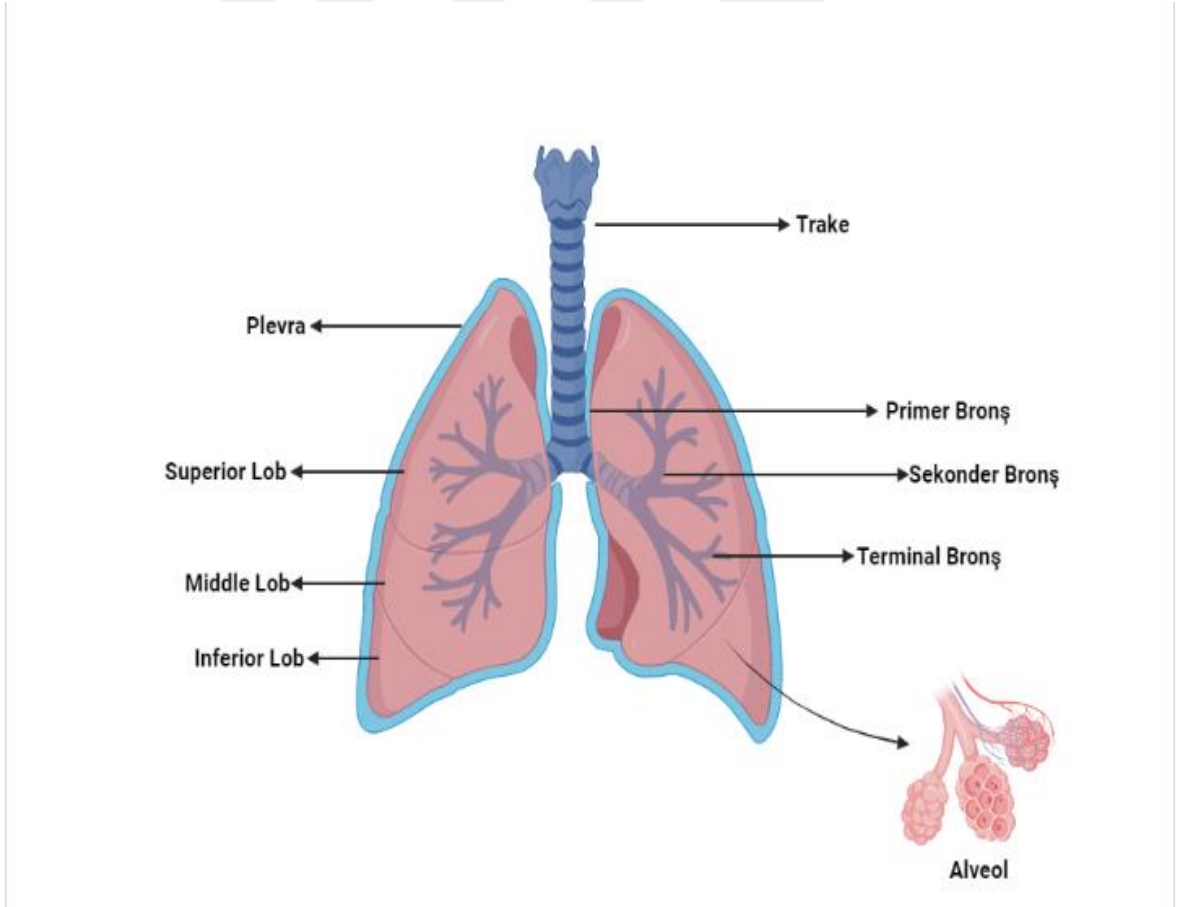
Dosetaksel, mikrotübülleri depolimerize ederek hücre siklusunun G₂/M (mitoz) fazını bloke eden bir antineoplastik bir ajandır (Herbst ve Khuri, 2003). Hücre proliferasyonunu inhibe ederek hücreyi ölüme götürdüğü düşünülmektedir. KHDAK başta olmak üzere birçok kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan DTX, hastada oluşturduğu yan etkiler, toksisite ve tedavide tek başına yetersiz etki göstermesi sebebiyle kombin ilaçların kullanılması gerekliliğini göstermektedir. Günümüzde, DTX'in tek veya kombin olarak kullanıldığı çalışmalar, hastalık tedavisinde istenilen başarıya ulaşmasa da tedavide kullanılmaktadır. Başarıya ulaşamayan tedavinin yanı sıra DTX ve benzeri ajanların tedavide kullanılması, hastada çeşitli etkilere ve zararlara neden olup tedavi sürecini zorlaştırmaktadır (Cortes ve Pazdur, 1995; Miller ve diğ., 1995; Aapro, 1997; Liu ve diğ., 2021).

Çalışmamızda, KHDAK başta olmak üzere kanser tedavisinde kullanılan DTX ve KHDAK'de aşırı aktive gösterdiği bilinen WNT sinyal yolağı inhibitörü olan FH535'in kombin halde kullanımının adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyum hücresi A549 ve sağlıklı bronşiyal epitel hücresi BEAS-2B hücre hatları üzerindeki etkilerinin MTT ve gerçek zamanlı hücre analizi ile değerlendirilip A549 kanser hücresinin aktivitesi azaltırken BEAS-2B sağlıklı akciğer hücresinde minimum zararı gösteren kombin dozun belirlenerek kanser hücresinde, kaspaz 3-7 aktivite analizi, mitotik aktivite analizi ve BrdU analizi yöntemleriyle *in vitro* koşullarda hücresel seviyede meydana getireceği etkilerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda sağlıklı olan akciğer hücresine minimum zararı verirken; KHDAK hücresinde antiproliferatif etkiyi gösteren optimal dozun belirlenmesiyle birlikte mevcut tedavi protokollerine ek yeni tedavi protokollerinin oluşturulması hedeflenmiştir. Çalışmamızda, DTX ve FH535 kombinasyonunun KHDAK modeli A549 hücre hattı ve BEAS-2B sağlıklı akciğer hücre hattındaki etkileri ilk kez gösterilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. AKCİĞER

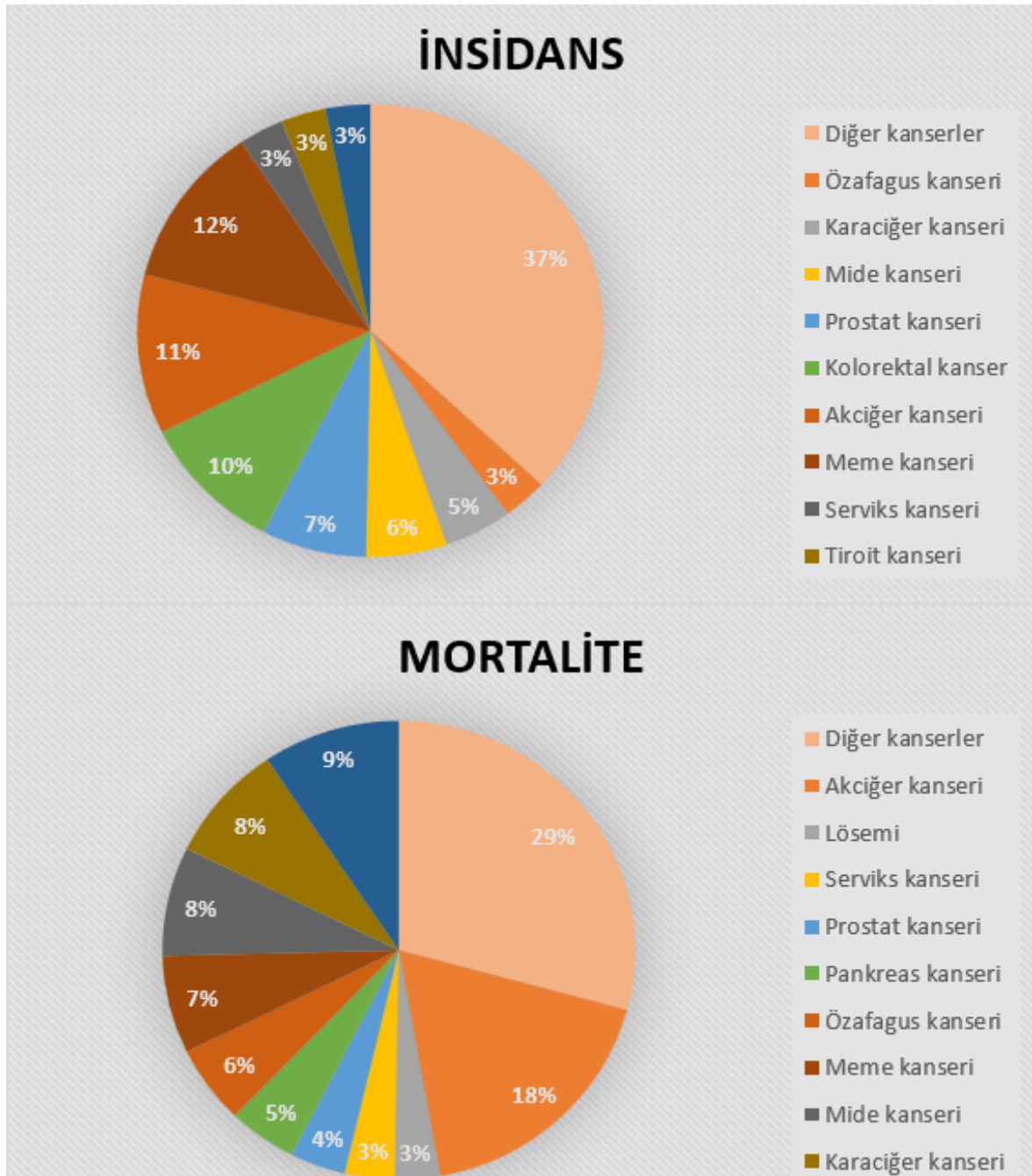
Akciğer, göğüs kafesi içerisinde sağda üç lob, solda iki lob olmak üzere toraks içinde bulunan pembe renkli, süngerimsi yapıdaki bir çift organdır. Nefes alıp verdikçe genişleyip büzülerek organizma için gerekli olan oksijen ve karbondioksit gazlarının değişimini sağlamaktadır. Sağda 625 gram; solda 565 gram olmak üzere, mediastinum ve her iki akciğeri ayrı ayrı saran seröz zar adı verilen plevra ile ikiye ayrılır (Yücel, 2018). Trakeden sağ ve sol primer bronşa ayrılan hava yolu, sırasıyla sekonder ve terminal bronşlara ayrılmaktadır. Terminal bronşun sonlandığı yerde alveol adı verilen hava keseleri bulunur (Şekil 1.1). Akciğer, sağ ve solda superior, middle ve inferior adları verilen segmentlere ayrılmaktadır. Bu segmentlerin dışını plevra zarı sarmaktadır (Aung ve diğ., 2019).



Şekil 2.1: Akciğer anatomisi. Şekil, Aung ve diğ., (2019)'den Türkçe'ye çevrilip değiştirilerek yeniden çizilmiştir.

2.2. KANSER

Büyüme özelliği bozulan hücrelerin klonal yayılım göstermesine kanser adı verilmektedir (Futreal ve diğ., 2001). *Homo sapiens*'de hastalık olarak kategorilendirilen 100'ü aşkın kanser türü olduğu bilinmektedir (Pavlopoulou ve diğ., 2015). Dünya'da ve Türkiye'de kardiyovasküler hastalıklardan sonra, ikinci sıradaki ölüm sebebi kanserlerdir (Özgül ve diğ., 2009). 2008 yılında tüm Dünya'da kanser tanısı yeni konmuş hastaların %13'ünün akciğer kanseri olduğu; 2012 yılındaki istatistiklerde tüm Dünya'da kansere bağlı ölüm nedenleri arasında birinci sırada akciğer kanserinin %18'lik bir oranla yer aldığı tespit edilmiştir (Institutue, 2012). 2013 yılında Dünya çapında 8 milyondan fazla kanser vakası ölümü görülmüştür (Naghavi ve diğ., 2015). 2014 yılında yapılan bir çalışmada, 2006-2010 yılları arasında gözlenen oran ve demografik değişikliklere göre; 2020 ve 2030 yılları arasında kanser türlerinin ölüm oranlarının sıralamasında, mortalite oranı en yüksek kanserlerin akciğer, pankreas ve karaciğer kanseri olacağı öngörülmüştür (Rahib ve diğ., 2014). 2018 yılında 185 ülkede 36 farklı kanser türünün karşılaştırılmasının yapıldığı çalışma raporuna göre; Dünya'da 9.6 milyon kanser vakasından en sık görüleni olan akciğer kanseri, %18,4 mortalite oranıyla en çok ölüme sebep olan kanser türü olarak belirlenmiştir (Bray ve diğ., 2018). 2022 yılının sonunda Amerika Birleşik Devletleri'nde 2 milyona yakın kanser vakası ve 1 milyona yakın kanser ölümünün gerçekleşeceği tahmin edilmektedir. Bu vakalar arasında akciğer kanserinden günde yaklaşık 350 ölümün olacağı bildirilirken; akciğer kanseri hastalarının sayısının 236.740 olacağı öngörülmektedir (Siegel ve diğ., 2022). Kanser türlerine göre insidans ve mortalite oranları, Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2: Kanser türlerine göre insidans ve mortalite oranları. Şekil, Sung ve diğ., (2021)'den Türkçe'ye çevrilip yeniden çizilmiştir.

2.3. AKCİĞER KANSERİ

Akciğer kanseri, akciğerde bulunan hücrelerin dengesiz şekilde çoğalması, gen anlatımı değişimi, epigenetik faktörler, mutasyon birikimi gibi çeşitli nedenlerle hücrel homeostazın bozulması sonucunda meydana gelen malign yapıda bir kanser türüdür. Kontrol dışı çoğalan

hücreler tümörleşerek çevre dokulara metastaz yapmaktadır (Baran, 2018). Akciğer kanserine neden olan faktörler: sigara kullanımı, hava kirliliği, genetik alt yapı, diyet şekli, maruz kalınan radyasyon, yaş ve cinsiyet olarak birçok çalışmada sıralansa da hastalığa neden olan faktörlerin çoğu tamamen aydınlatılamamıştır. Dolayısıyla belirlenen mevcut nedenler ve bu nedenlerin mekanizması aydınlatılamadığı için hastalığın tanısı, prognozu ve tedavisindeki eksiklikler klinik yansımada artan mortalitenin önüne geçememektedir (Bilello ve diğ., 2002).

Akciğer kanseri tanısında kullanılan direkt grafi, bilgisayarlı tomografi (BT), magnetik rezonans görüntüleme (MRG), pozisyon emisyon tomografisi (PET), bronkoskopi, transtorasik ince iğne aspirasyonu biyopsisi, mediastinoskopi, torakoskopi ve torakotomi gibi çeşitli yöntemler olmasına rağmen hastalığın tanısı için geç kalınması ve hastalığın tanısı konulana kadar hızlı ilerleyişi sebebiyle de klinik aşamada artan mortalite sorun yaratmaktadır (Akar ve Şahin, 2012).

Akciğer kanserinin moleküler mekanizması karmaşık ve heterojendir. Genetik, epigenetik ve protein sentezi sonrası meydana gelen modifikasyonlar gibi moleküler değişiklikler, akciğer kanseri tanısı, prognozu ve tedavisini etkilemektedir. Dolayısıyla hastalığın moleküler mekanizmasında rol oynayan hücresel yolların bilinmesi ve bu yolların aktivasyon ve inhibisyon mekanizmalarını hedefleyerek tedavide yeni yöntemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir (Larsen ve Minna, 2011).

Akciğer kanseri, tüm kanser türleri arasında en sık görülen kanser türlerinden biridir (Bray ve diğ., 2018). Tanı konulması hastalığın ileri evrelerinde olduğu ve tedavideki yetersizliklerden dolayı ölüm oranı yüksektir. Akciğer kanseri, 2017 yılı Türkiye Kanser İstatistikleri'nde %56,7 oranıyla erkeklerde insidans oranı en yüksek kanser türü olarak belirlenmiştir (T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2017). En sık görülen akciğer kanseri alt tipi olan adenokarsinomun tedavisinde geliştirilen hedefe yönelik tedavi gibi yeni yöntemler sayesinde önemli ilerlemeler elde edilmektedir. Yapılan istatistik çalışmaları neticesinde, tüm dünyada akciğer kanseri hastalarının 2011-2017 yılları arasında ortalama 5 yıllık sağ kalım oranı %21,7 olarak belirlenmiştir (Institute, 2017).

Hedefe yönelik kanser tedavisi, diğer kanser türlerinde olduğu gibi akciğer kanserinde de umut vaat eden bir tedavi yöntemidir. Hedeflenen kanser dokusuna yönelik uygulanan madde, ilaç, kombine ilaç ve benzeri çalışmalarla kanser bulunan organdaki sağlıklı doku hücrelerine zarar

vermeden kanser dokusundaki hücrelerin ölümüne neden olabilecek yeni tedavi yöntemleri ve ilaçlar geliştirilmeye çalışılmaktadır (Baran, 2018). Bu kapsamda geliştirilen ilaçlar, ilaç kombinasyonları veya hedeflenen molekül üzerinden yapılan tedavi yöntemleriyle akciğer kanserinin moleküler mekanizmasına yönelik tedaviler geliştirilmektedir. Özellikle KHDAK tedavisinde hedefe yönelik tedavi yöntemleriyle ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Hirsch ve diğ., 2016).

2015 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO), akciğer kanserini, KHAK ve KHDAK olmak üzere iki gruba ayırmaktadır (Travis ve diğ., 2015).

2.3.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)

KHAK, tüm akciğer kanseri olgularının %14'ünü oluşturur. Sigara içme öyküsü bulunan bireylerde görülür. Tanının geç konulmasından dolayı hastalığın ileri evrelerinde tedaviye başlanılır. Tümörlü hücrelerde artan DNA, bazofilik bir görünüme sebebiyet vermektedir (Yener ve Düşmez, 2014).

2.3.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)

KHDAK, adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve farklılaşmamış büyük hücreli kanser olarak üç ana gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.2). Akciğerin mukus üreten bezlerinde ve akciğerin dış kısımlarına yakın bölgelerde ortaya çıkmaktadır. KHDAK, akciğer kanserlerinin %80-85'ini oluşturmaktadır (Molina ve diğ., 2008). KHDAK'de semptomlar geç tespit edildiği için hastalar gecikmiş tanı nedeniyle cerrahi şansı bulamamaktadır (Jemal ve diğ., 2011). Bu yüzden cerrahi dışında başka tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Akciğer kanseri tanısında bronkoskopi, biyopsi, bronşiyal lavaj, tümör markırları, CT (Bilgisayarlı Tomografi), MRG, ultrason, mediastinoskopi ve PET kullanılmasına rağmen genellikle tanı konulduğunda hastalık ileri evrede olduğundan dolayı cerrahi tedavi uygulanamamakta ve kemoterapötik ilaçlar, hedefe yönelik tedavi ve/veya immünoterapi gibi tedavi yöntemlerine başvurulmaktadır (Rüttinger ve diğ., 2009).

KHDAK, agresif bir kanser türüdür ve tanı konulduğu zaman hastada sistematik yayılım görülmektedir. Geç tanı konulmasından dolayı sadece sistemik kemoterapiye yanıt vermektedir. KHDAK birinci evre hastalarının sadece %2-5'lik kısmında cerrahi, bir tedavi şansıdır (Jett ve diğ., 2013). Bu oranın hastalığın başlangıç evresi olan birinci evrede dahi bu

kadar düşük olması, tedavinin zorluğu ve beraberinde gelen yüksek mortalite oranlarını açıklamaktadır.

2.3.2.1. Adenokarsinom

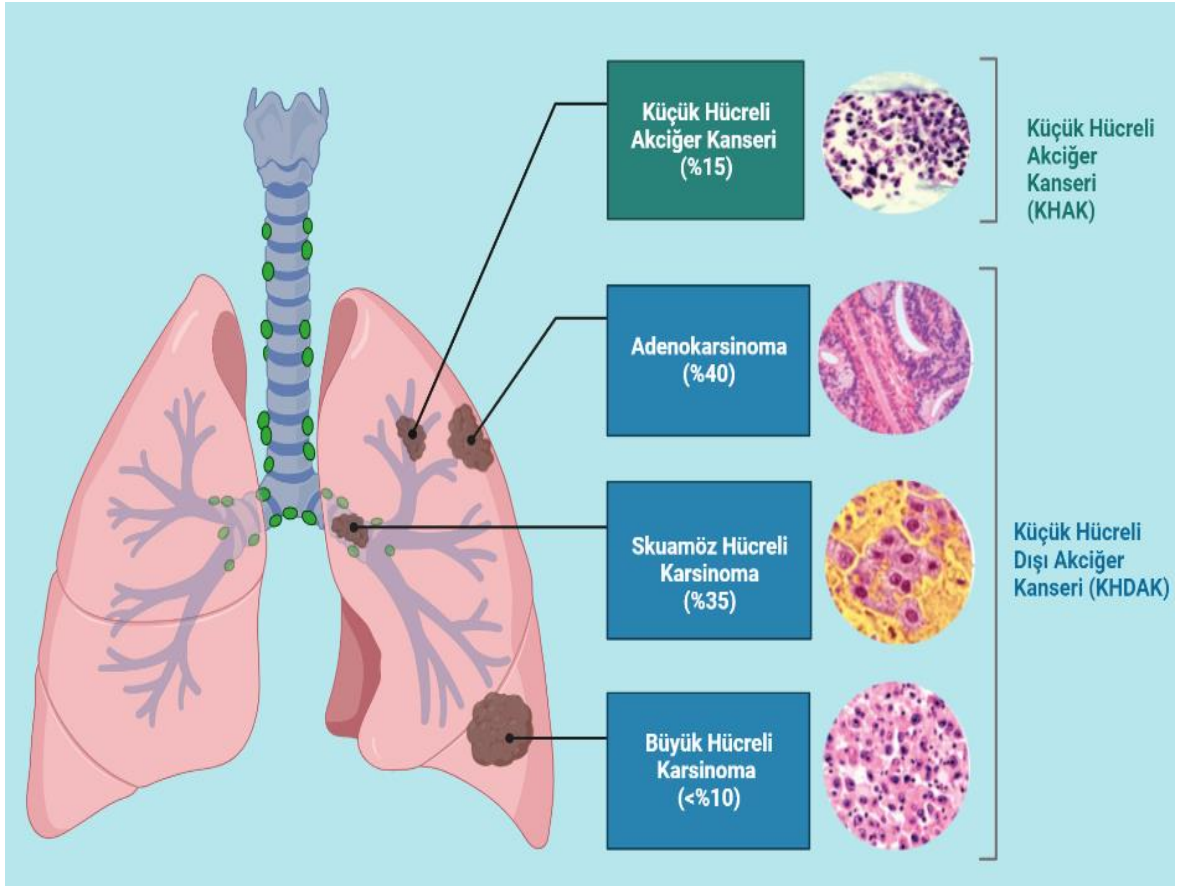
Tüm akciğer kanserlerinin %38'ini oluşturan ve terminal bronşiyol epitelinden köken alan adenokarsinomlar, en sık görülen akciğer kanseri tipidir. Genellikle sigara içme öyküsü bulunmayan bireylerde görülür. Heterojen bir yapıya sahiptir. Tiroid transkripsiyon faktör-1 (TTF-1) ve Napsin-A, hastalığın biyobelirteçleri olarak kullanılır. Bunun yanı sıra bu tipte, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) mutasyonu, anaplastik lenfoma kinaz (ALK) amplifikasyonu, proto-onkojen tirozin protein kinaz-1 ROS (ROS1) amplifikasyonu ve programlı ölüm ligandı-1 (PD-L1) ekspresyonu tanıda kullanılan biyobelirteçlerdendir (Horn ve Lovly, 2018).

2.3.2.2. Skuamöz hücreli karsinoma

Erkeklerde daha sık görülen bu tip, akciğerin ana bronşlarında santral yerleşmiş olarak bulunur (Travis, 2011). Sigara içme öyküsü bulunan bireylerde görülür. Tek hücre keratinizasyonu, hücrelerarası köprüleşmeler en tipik özellikleridir (Yener ve Düşmez, 2014). SOX2 ve fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1 (FGFR1) amplifikasyonu skuamöz hücreli karsinomun ayırt edici moleküler değişikliklerindedir (Perez-Moreno ve diğ., 2012).

2.3.2.3. Büyük Hücreli Karsinom

Akciğer kanserlerinin %10'undan azını oluşturan ve periferik akciğer dokusundan köken alan tümör tipidir (Sholl, 2014). Belirgin nükleus ve nükleoluslara sahiptir (Yener ve Düşmez, 2014).



Şekil 2.3: Akciğer kanseri türleri ve mikroskopik görüntüleri. Şekil, National Cancer Institute, (2018a)'den değiştirilerek Türkçe'ye çevrilip yeniden çizilmiştir.

2.4. WNT SİNYAL YOLAĞI

WNT geni, meme tümörü olan bir farenin tümör dokusundan izole edilmiş olan ve *int-1* isminin verildiği bir genidir. *Drosophila*'da *wingless* olarak adlandırılan genin *int-1* geni ile fonksiyon ve dizi benzerliği paylaştığının belirlenmesi üzerine bu gen 1991 yılında literatüre *WNT* geni olarak geçmiştir (Nusse, 2005). Günümüzde *Homo sapiens*'te tanımlanmış olan 19 *WNT* gen ailesine ait protein belirlenmiştir. Bu proteinler sisteinden zengin bölgeler içermektedir ve glikoprotein yapıdadır (Ilyas, 2005).

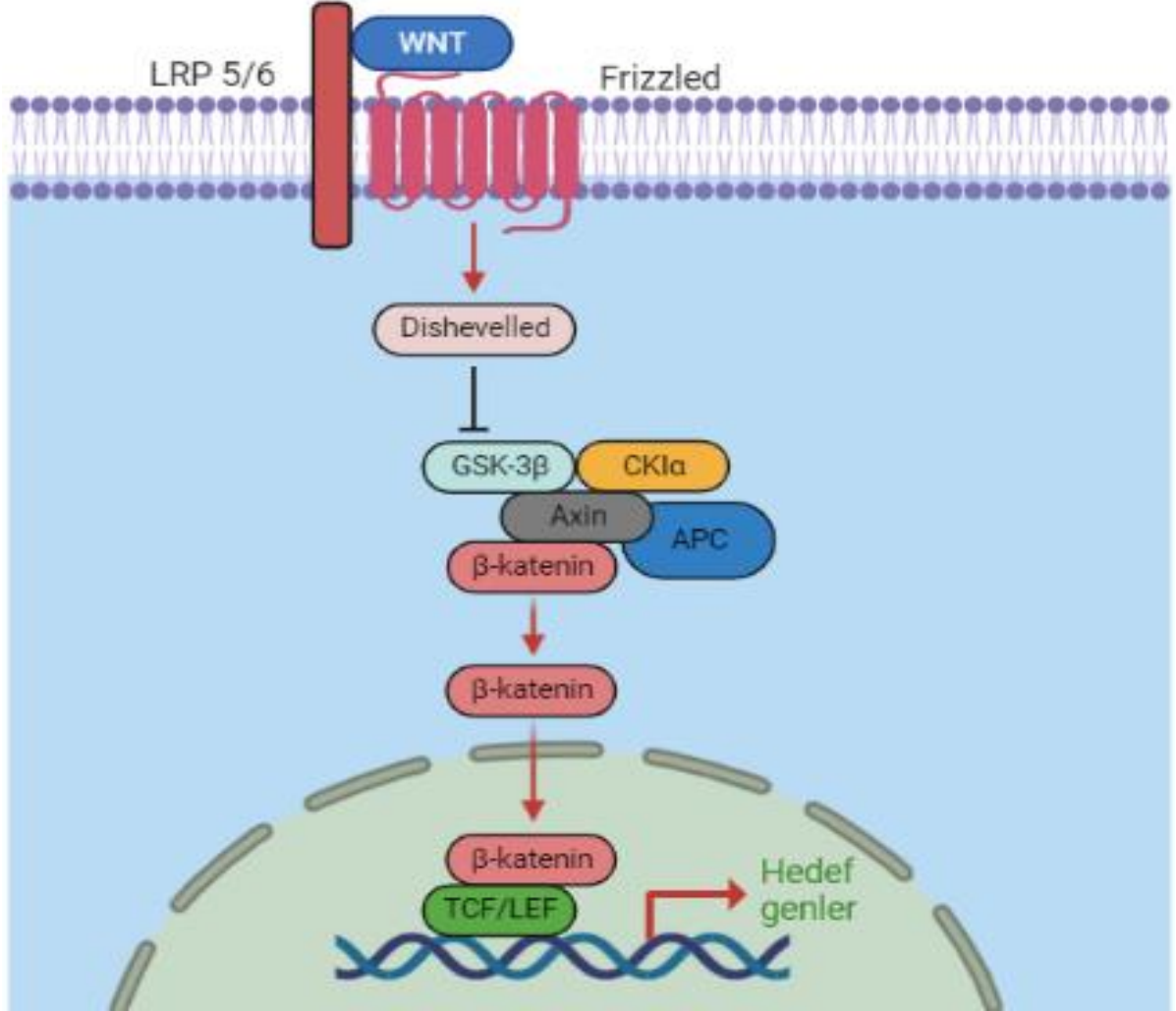
WNT polipeptidinde bulunan hidrofobik sinyal dizileri, bu proteinin endoplazmik retikulumu (ER) yönelmesini sağlar. Burada post-translasyonel olarak glikolizasyon ve modifikasyon geçiren protein son halini alır. Son halini alan *WNT* proteini, ER'den tomurcuklanan taşıyıcı veziküllerin içinde sitozole, sitozolden de Golgi kompleksine taşınır. *WNT* proteini bu aşamadan sonra hedef hücreyi etkilemeye başlar (Damien ve diğ., 2007).

WNT sinyal yolağının hücre proliferasyonu, sağ kalımı, kendi kendini yenileme, hücre büyümesi, hareketi ve farklılaşması gibi birden fazla hücre temelli biyolojik olayda görev aldığı bilinmektedir (Willert ve Jones, 2006). Embriyonik gelişim sürecinde ve yetişkin dönemde doku homeostazının sağlanmasında etkindir (Lustig ve Behrens, 2003; Jager ve diğ., 2013). WNT/ β -katenin (Kanonik/Klasik), WNT/ Ca^{+2} (Kanonik olmayan) ve WNT/Planar Hücre Polaritesi (PCP) olmak üzere üç çeşit WNT sinyal yolağı tanımlanmıştır (Huelsenken ve Behrens, 2002).

2.4.1. WNT/ β -Katenin (Kanonik/Klasik) Sinyal Yolağı

WNT proteinin hücre membranında bulunan Frizzled (Fz), düşük-yoğunluklu lipoprotein 5/6 (LRP5/6) reseptörlerine bağlanmasıyla sinyalizasyon başlamaktadır (Şekil 2.3). Bağlanmayla oluşan üçlü kompleks, hücre içerisinde birtakım fosforilasyonların gerçekleşmesini sağlar (Wawrzak ve diğ., 2009). Bu fosforilasyonlarla sinyal, hücre membranından sitozole aktarılır. Aktarılan sinyalle, sitozolde β -katenin birikmeye başlar. Biriken β -katenin, nükleusa taşınarak transkripsiyon faktörlerini aktifleştirir (Kestler ve Kühl, 2008). β -katenin bağımlı olan bu sinyal yolağı, hücre içindeki β -katenin seviyesini düzenleme, hücreler arası adezyonu sağlama, birçok genin transkripsiyonunu düzenlemede görev alır (Nakamura ve diğ., 2005). Dolayısıyla bu sinyal yolağının homeostazında meydana gelen bozukluklar kanser başta olmak üzere birçok hastalığa sebep olmaktadır (Jass ve diğ., 2003; Yardy ve Brewster, 2005; Ng ve diğ., 2019). Bu yolağın işlevinde birçok bileşen rol alır. Bunlar: Fz ve LRP5/6 reseptörleri, dishevelled (Dvl), axin, adenomatöz polipozis koli (APC), glikojen sentaz kinaz-3 β (GSK-3 β), kazein kinazlar (CK), kaderinler, beta katenin (β -katenin), T hücre faktörü/lenfosit arttırıcı bağlanma faktörü (TCF/LEF)'dür.

WNT β -katenin Sinyal Yolağı



Şekil 2.4: WNT/ β -katenin sinyal yolağı. Şekil, Patel ve diğ., (2019)'den değiştirilerek Türkçe'ye çevrilip yeniden çizilmiştir.

2.4.1.1. Fz ve LRP5/6 Reseptörleri

Fz reseptörü, G protein ailesine ait (7 kıvrımlı reseptör protein), transmembran bir proteindir. Fz reseptörünün hücre dışında bulunan kısmı sistein zengin 10 adet rezidü (CRD) içermektedir. 500-700 aminoasit uzunluğunda, 63-80 kDa molekül ağırlığındadır (Huang ve Klein, 2004). WNT proteininin bir ucu, Fz reseptörünün CRD bölgesine, sistein rezidüleriyle bağlanır; diğer ucu ise LRP5/6 proteinine bağlanır.

LRP5/6, düşük yoğunluklu lipoprotein ailesine ait transmembran bir proteindir. Fz'nin koreseptörüdür (Cadigan ve Liu, 2006). 1615 aminoasit uzunluğunda ve 180 kDa molekül ağırlığındadır. Fz ve WNT proteiniyle birlikte üçlü kompleks (Fz-LRP5/6-WNT) oluştururlar.

2.4.1.2. *Dvl*

500-600 aminoasit uzunluğunda ve 78 kDa molekül ağırlığında olan bu protein, ilk kez *Drosophila*'da saptanmıştır (Wallingford ve Habas, 2005). *Dvl* molekülü, hücre membranına bağlı olan Fz ve LRP5/6 reseptörleriyle β -katenin kompleksi arasındaki ilişkiyi bir ucu Fz'nin hücre içinde bulunan kısmına, diğer ucu ise LRP5/6'ya bağlı olan axine bağlanarak sağlamaktadır (Povelones ve Nusse, 2002). Bu protein her üç WNT sinyal yolağında da görev almaktadır. Bu sebepten dolayı *Dvl* proteinine "kavşak noktası" adı da verilmektedir (Wallingford ve Habas, 2005). *Dvl* proteinin WNT sinyalizasyonundaki önemi bilinse de etki mekanizması henüz tam anlamıyla açığa kavuşturulamamıştır. Yapılan çalışmalarda *Dvl* proteinin görevleriyle ilgili çeşitli görüşler öne sürülmektedir. Bunlar: axinin hücre membranına hareketini sağladığı, Fz reseptörüne bağlı olan ucunun yanı sıra diğer ucunun axine bağlanarak axinin yıkılmasını uyardığı ve *Dvl*-Fz kompleksinin LRP5/6 reseptörünün değişimini uyardığı ve bu sayede de fosforilasyonu etkilediğidir (Kishida ve diğ., 1999). Bu proteinde meydana gelen değişiklikler ve bozukluklar, WNT/ β -katenin sinyal yolağının kontrolsüz aktivasyonuna sebebiyet vermektedir. Bu kontrolsüz aktivasyonun karsinogenezin oluşumunda etkisi, yapılan çalışmalarla da desteklenmiştir. Bu çalışmalarda prostat, servikal, meme, KHDAK ve kolon kanseri hücrelerinde *Dvl* proteinin miktarının arttığı, buna bağlı olarak *Dvl-1* geninin ekspresyonunun arttığı; kontrolsüz aktivasyon gerçekleştiği görülmüştür (Bui ve diğ., 1997; Mizutani ve diğ., 2005; Wei ve diğ., 2008).

2.4.1.3. *Axin*

862 aminoasit uzunluğunda 95,6 kDa molekül ağırlığında olan bir proteindir. Yıkım kompleksi olarak adlandırılan "Axin, APC, GSK-3 β " kompleksinin yapısında bulunur. Bu kompleks, β -katenin fosforilasyonunu kontrol altına almakta ve bu şekilde β -kateninin yıkılmasında görev almaktadır. WNT sinyal yolağı inaktif olduğunda yıkım kompleksi aktif durumdadır. Bu aktivasyon, axin ve APC proteinlerinin, kazein kinaz-1 (CK-1) ve GSK-3 β enzimleri tarafından fosforillenmesine neden olur. Bu fosforillenmeyle β -katenin, yıkım kompleksiyle birleşir. Daha sonra yıkım kompleksinin yapısında bulunan CK ve GSK-3 β enzimleri, β -katenin molekülünü

fosforiller. Fosforillenen β -katenin bu kompleksten ayrılır ve parçalanır (Kikuchi, 1999; Verheyen ve Gottardi, 2010).

2.4.1.4. APC

2843 aminoasit uzunluğunda ve 312 kDa molekül ağırlığında olan APC proteini, β -katenin ve axin proteinlerine multidomain yapısı nedeniyle bağlanma gerçekleştirir (Fearnhead ve diğ., 2001; Lustig ve Behrens, 2003). Hücre sitoplazması ve nükleusunda bulunan protein, birçok kanser türünde mutasyona uğramıştır (Giles ve diğ., 2003). Bu nedenle de APC'nin hastalıkların oluşumunda etkili olan bir protein olduğu düşünülmektedir (Bienz ve Clevers, 2000; Näthke, 2005). Eğer APC geninde mutasyon meydana gelirse β -katenin bu proteine bağlanamayacaktır. Bağlanma gerçekleşmediğinde WNT sinyal yolu inaktif durumda olsa dahi yıkım kompleksi inhibe olur. İnhibisyon sonucunda sitoplazmada bulunan β -katenin miktarında meydana gelen artışla nükleusa giren fazla β -katenin, sinyal yolağının hedef genlerinin kontrolsüz şekilde transkripsiyonuna neden olur (Kikuchi, 1999; Verheyen ve Gottardi, 2010).

2.4.1.5. GSK-3 β

GSK-3 β enzimi, embriyonik gelişim döneminden başlayarak canlılık süresince birçok sinyal yolağında görev alan bir serin/treonin kinazdır. Alfa ve beta olmak üzere iki izoformu bulunur. WNT sinyal yolağında beta formu görev alır. 420 aminoasit uzunluğunda, 47 kDa ağırlığına sahip olan GSK-3 β molekülü, β -katenin, axin ve APC'nin fosforillenmesinden sorumludur (Doble ve Woodgett, 2003). Bu molekülde meydana fonksiyon bozukluklarının kanser başta olmak üzere birçok hastalıkla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (Lee ve Kim, 2007; Duda ve diğ., 2020).

2.4.1.6. CK

Serin ve treonin aminoasitlerinin fosforilasyonunda görevli olan protein kinazdır. Memeli hücrelerinde; alfa (CK α), beta 1 (CK β 1), gama 1 (CK γ 1), gama 2 (CK γ 2), gama 3 (CK γ 3), delta (CK δ) ve epsilon (CK ϵ) olmak üzere yedi farklı izoformu bulunmaktadır (Rowles ve diğ., 1991). CK hücre membranı, sitoplazma ve hücre nükleusunda bulunmaktadır. Tek bir polipeptit zincirinden oluşan bu enzimler, 37-51 kDa molekül ağırlığına sahiptir ve organizmada gerçekleşen birçok biyolojik süreçte etkinlik gösteren proteinlerin fosforile olmasından sorumludur (Knippschild ve diğ., 2005). Fosforilasyon sonucunda proteinlerin sinyal iletim yolaklarındaki etkinliğini düzenlemektedir (Knippschild ve diğ., 2005). CK'nın CK γ izoformu, WNT sinyal yolağında LRP5/6'yı, CK ϵ izoformu Dvl proteinlerini ve CK α izoformu, β -

katenini fosforillemektedir (Swiatek ve diğ., 2004; Verheyen ve Gottardi, 2009). CK proteini, WNT sinyal yolağında LRP5/6 ve Dvl proteinlerinin fosforillenmesinden sorumludur. WNT/ β -katenin sinyal yolağında yıkıcı kompleksin yapısına katılan CK, yıkıcı komplekste bulunan axin, APC ve β -katenin proteinini fosforillemektedir (Gao ve diğ., 2002).

2.4.1.7. Kaderinler

Molekül ağırlıkları 120.000-140.000 kDa olan Ca^{+2} 'a bağımlı, 110 aminoasit uzunluğunda transmembran glikoproteinlerdir (Behrens, 1994). Buldukları dokuya göre; plasentada P-kaderinler; epitel hücrelerinde E-kaderinler; endotel hücrelerinde V-kaderinler; kas hücrelerinde ve nöral dokularda N-kaderinler ve kalp kasında H-kaderinler ismini alırlar (Van Roy, 2014). Hücrelerin birbirilerine olan bağlantısında görev alan bu proteinler, sitoplazmik proteinlerle ilişki içindedir. Tümör hücrelerinde hücrelerin birbiriyle olan ilişkisi bozulduğu için bu proteinin de düzensiz olduğu görülmektedir (Şensoy ve Öznurlu, 2009).

2.4.1.8. β -katenin

β -katenin, E-kaderinin sitoplazma içindeki kısmı ile hücre iskelet elemanlarından α -aktin arasında köprü görevi yapmaktadır. 782 amino asitten oluşan 92 kDa ağırlığında bir proteindir (Dönmez ve diğ., 2011). WNT sinyal yolağı inaktif olduğunda β -katenin proteininin yapısında bulunan serin aminoasitlerinden zengin bölgelerin fosforillenmesiyle, β -katenin proteinin yıkımı için bir etiket görevi görür. β -kateninin bir kısmı hücre-hücre bağlantılarında görev yapmak üzere hücre membranında bulunurken geri kalan kısmı sitozolde aktif olarak bulunan yıkıcı kompleksin etkisi ile parçalanır. Bu durumda sitoplazma ve nükleus içerisinde β -katenin birikimi oluşmaz (Brembeck ve diğ., 2006). Sinyal yolu aktif olduğunda yıkıcı kompleks dağılır. Bu sebeple, β -katenin fosforillenemez ve sitoplazmadaki β -katenin miktarı artar. Artan β -katenin, nükleusa girerek hedef genlerin transkripsiyonu sağlar (Liu ve diğ., 2022).

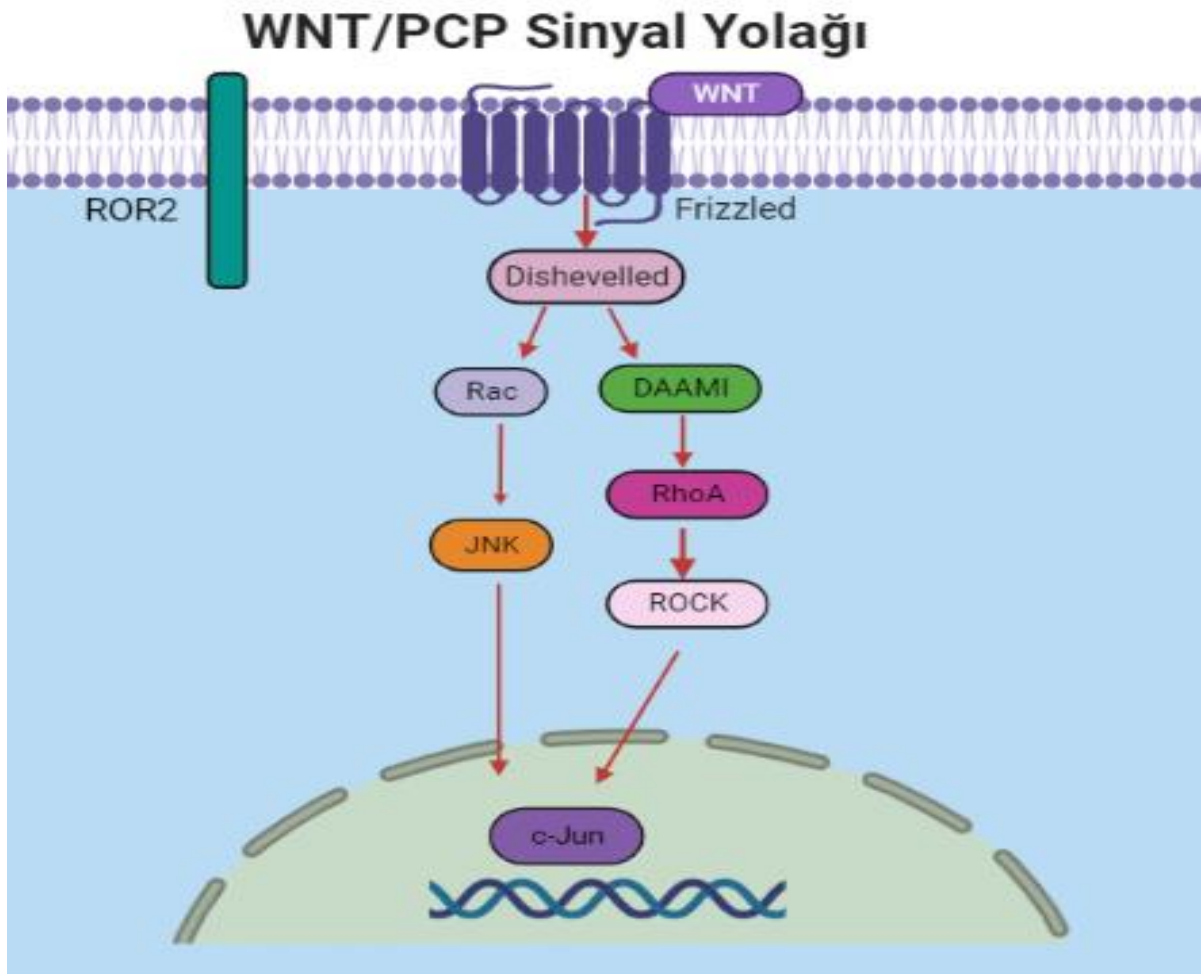
2.4.1.9. TCF/LEF

TCF transkripsiyon faktörü, nükleusta bulunurlar ve DNA'ya bağlanarak gen transkripsiyonunu düzenledikleri için birçok hücresel süreçte oldukça önemli etkilere sahiptir. (Willert ve Jones, 2006). Memeli hücrelerinde TCF1, TCF3, LEF1 ve TCF4 olmak üzere dört üyesi bulunan TCF/LEF, 380-620 amino asit uzunluğunda, 42-68 kDa molekül ağırlığına sahiptir (Shitashige ve diğ., 2008). TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörlerinin transkripsiyonunun aktiveştirebilmesi için β -kateninin proteine bağlanması gerekmektedir. TCF/LEF1 transkripsiyon faktörlerinin N-terminalinde 60 aminoasitlik β -katenine bağlanma bölgesi olarak

bilinen β -katenin bağlanma domaini, bu bağlanmayı sağlamaktadır. Bu bağlanma ile oluşan kompleks ise “ β -katenin-TCF/LEF1 transkripsiyon kompleksi” olarak adlandırılır ve transkripsiyon kompleksinin DNA’ya bağlanarak hedef genlerin transkripsiyonunu etkilediği bilinmektedir (Behrens ve diğ., 1996).

2.4.2. PCP Sinyal Yolağı

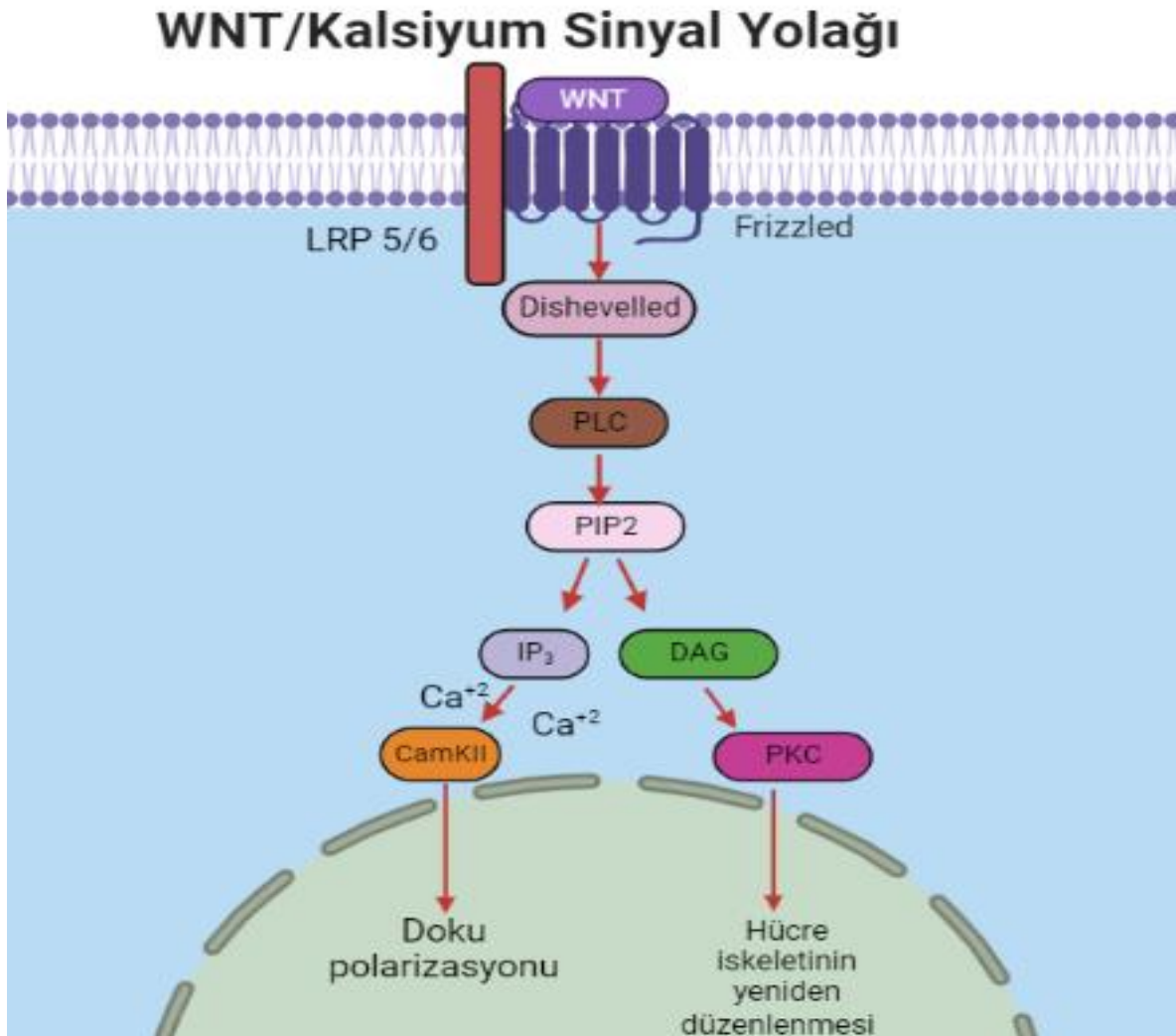
WNT proteini, reseptöre bağlandığında RhoA ve Cdc42 GTPazları aktive olur (Şekil 2.4) (Lai ve diğ., 2009; Lane ve diğ., 2011). Bu yolak, hücre göçü ve hücre iskeleti elemanlarının düzenlenmesinde, ilişkili genlerin transkripsiyonunda ve hücre adezyonundan sorumlu hedef genlerin transkripsiyonunda görev almaktadır (Fanto ve McNeill, 2004; Yamamoto ve diğ., 2008).



Şekil 2.5: WNT PCP sinyal yolağı. Şekil, Kahn ve Kim, (2014)’den Türkçe’ye çevrilerek yeniden çizilmiştir.

2.4.3. WNT/ Ca²⁺ Yolağı

WNT proteininin hücre membranında bulunan Fz reseptörüne bağlanmasıyla, hücre içerisinde birtakım fosforilasyonlar gerçekleşir ve bu şekilde sinyal yolağı aktive olur (Kohn ve Moon, 2005). Aktive olan sinyal yolağında, hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artmaya başlar. Yüksek Ca²⁺ konsantrasyonu, sitozolde bulunan Ca²⁺/Kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CamKII) ve protein kinaz C (PKC) gibi enzimleri aktive eder. Aktifleşen bu enzimler sayesinde aktive olan sinyal yolağı, hücre göçü ve hücre proliferasyonu gibi çeşitli hücresel süreçlerin düzenlenmesinde görev alır (Şekil 2.5) (Kühl ve diğ., 2000; Lustig ve Behrens, 2003; Komiya ve Habas, 2008).



Şekil 2.6: WNT/Kalsiyum sinyal yolağı. Şekil, Kahn ve Kim, (2014)'den Türkçe'ye çevrilip değiştirilerek yeniden çizilmiştir.

2.4.4. WNT Sinyal Yolağının Aktivasyonu

WNT proteininin hücre membranında bulunan Fz reseptörüne bağlanmasının ardından bu yapıya LRP5/6 reseptörü de katılır. Oluşan “Fz-WNT-LRP5/6” üçlü kompleksi ile reseptörde konformasyonel bir değışim oluşur (Huang ve Klein, 2004). Bu kompleks yoluyla sinyal sitozole aktarılır. Bu aktarım iki şekilde meydana gelir:

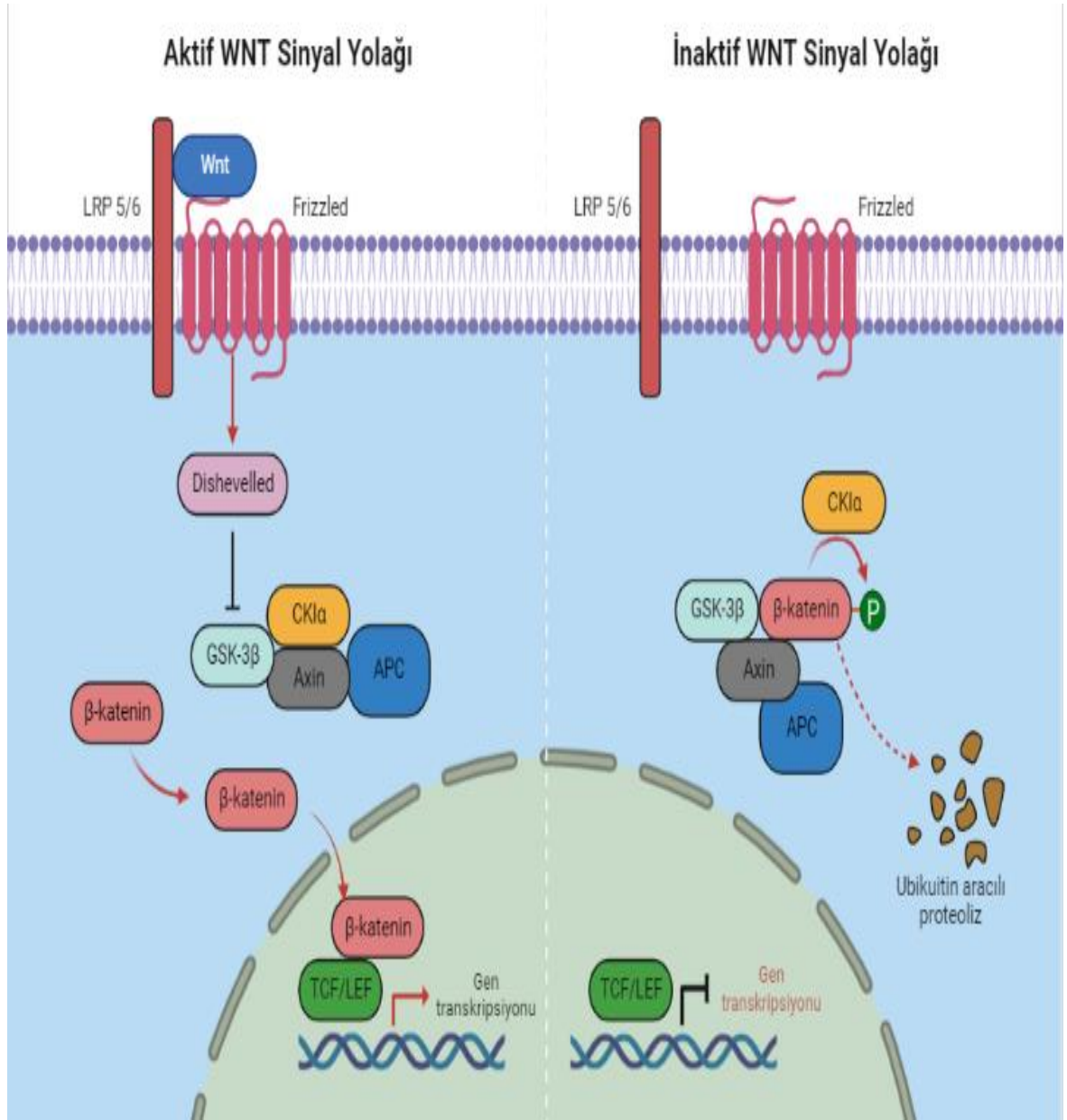
Birinci yolda: Oluşan konformasyonel değışim nedeniyle sitozolde serbest olarak bulunan Dvl proteini, CK-1 enzimi tarafından fosforillenir ve hücre membranına yönelir (Wallingford ve Habas, 2005).

İkinci yolda: LRP5/6 reseptörünün hücre içinde bulunan kısmı fosforillenmektedir ve bu fosforillenmeyle sitozolde bulunan axin proteini, hücre membranına transloke olur (Wu ve diğ., 2009). Translokasyonla yıkıcı kompleksi bir arada tutan axin proteini kompleksten ayrılır. Bu yıkıcı kompleks β -kateninin yıkılmasından sorumludur ve WNT sinyalizasyonunun başlaması ile inaktive olur. Bu inaktivasyonun nedeni, yıkıcı kompleksi bir arada tutan axin proteini yapıdan ayrılıp hücre membranında bulunan LRP5/6 proteinine bağlanması ve β -kateninin fosforillenmesinden sorumlu olan GSK-3 β enziminin inhibe edilmesidir. Sinyal sitozole aktarılınca, yıkıcı kompleks parçalanır; β -katenin proteini fosforillenemez ve fosforillenmeyen β -katenin proteinin bir kısmı hücre membranına giderek hücrel bağlantılarda görev alır. Diğerk kısmı sitoplazmada birikmeye başlar. Daha sonra biriken β -katenin, nükleusta inaktif halde inhibitör proteinlere bağılı bulunan TCF/LEF-1 transkripsiyon faktörünü ayırarak aktif hale getirir ve sinyali nükleusa ulaştırır (Willert ve Jones, 2006; Maher ve diğ., 2009).

WNT sinyalizasyonunu kısaca özetlemek gerekirse; WNT ligandı, Fz ve LRP5/6 reseptörüne bağlanarak hücre içinde sinyalizasyonu başlatır. Sinyalizasyonla birlikte Fz-WNT-LRP5/6 üçlü yapısı birbirleriyle bağlantı kurar (Nusse ve Varmus, 1992; Cadigan ve Liu, 2006; Mikels ve Nusse, 2006; Chen ve diğ., 2008). Ardından sinyal sitoplazmaya geçer; Dvl'nin fosforilasyonunu uyarır. Dvl'nin fosforilasyonu ile axin, APC, CK-1 ve GSK-3 β oluşan yıkım kompleksi dağılır. Bu kompleksin dağılması, β -katenin stabilizasyonunu sağlamaktadır. Stabilizasyonu sağlanan β -katenin, nükleusa transloke olur. Burada, transkripsiyon faktör ailesi olan TCF/LEF üyelerine bağlanarak, p300 ve CBP (CREB-bağlayıcı protein) ile birlikte hücrenin çoğalmasına sebep olacak WNT hedef genlerinin transkripsiyona uğramasını sağlar (Şekil 2.4.5) (Veeman ve diğ., 2003; Moon, 2005; Teo ve Kahn, 2010).

2.4.5. WNT Sinyal Yolağının Yokluğu

WNT sinyalinin yokluğunda, β -katenin, serin/treonin kinazlar, kazein kinazlar ve GSK-3 β tarafından fosforillenir. Fosforillenen β -kateninin proteozomal yıkımı gerçekleşir (Şekil 2.6) (Liu ve diğ., 2002).



Şekil 2.7: WNT sinyal yolağının aktif ve inaktif durumu. Şekil, Sonderegger ve diğ., (2010)'den değiştirilip Türkçe'ye çevrilerek yeniden çizilmiştir.

2.5. WNT SİNYAL YOLAĞI VE AKCİĞER KANSERİ

WNT yolağının keşfinden sonra bu yolda meydana gelen mutasyonların ve disfonksiyonların belirlenmesi ile WNT sinyal yolağı çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (L'Episcopo, ve diğ., 2012; Liu ve diğ., 2014; Chua ve diğ., 2015). Meme kanseri ve kolorektal kanser gibi birçok kanser türünün WNT sinyal yolağında etkin olan β -kateninin geçirdiği mutasyonlar sonucunda birikmesine bağlı olarak oluştuğu bilinmektedir (Howe ve Brown, 2004). WNT sinyal yolağının kanser üzerindeki etkisini araştırmak için yapılan çalışmaların çoğunluğu kolon kanserini temel alınarak yapılmıştır ve bu yolağın akciğer kanserinin moleküler mekanizmasına olan etkisi tam anlamıyla açıklığa kavuşturulamamıştır (Tennis ve diğ., 2007).

WNT sinyal yolağı, akciğer kanseri ve birçok hastalığın patogenezinde etkindir (Xu ve diğ., 2007; Shi ve diğ., 2009; Liu ve diğ., 2011). KHDAK hücre hatlarının çoğunda aktif WNT sinyalizasyonu veya *WNT-1*'in aşırı ekspresyonu görülmektedir (He ve diğ., 2004; Licchesi ve diğ., 2008; Akiri ve diğ., 2009; Teng ve diğ., 2010). WNT sinyalizasyonunun hücre proliferasyonu, yaşamı, apoptozu, hareketi gibi pek çok süreçte aktif rol alması, bu yolda meydana gelen herhangi bir bozukluğun bahsedilen hücresel süreçleri ve bu süreçlerle ilgili pek çok biyolojik aktiviteyi etkilemesine neden olmaktadır. Bahsi geçen hücresel süreçler karsinogenez gelişiminde de aktif rol aldığı için WNT sinyal yolağındaki homeostaz değişiklikleri karsinogenez de etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda kolon, akciğer, meme, tiroit, prostat kanseri ve lösemi gibi birçok kanser türünde WNT sinyalizasyonunda bir bozukluk olduğunu dolayısıyla WNT sinyal yolağının bu kanserlerin gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir (Jass ve diğ., 2003; Yardy ve Brewster, 2005; Turashvili ve diğ., 2006; Mikesch ve diğ., 2007; Thompson ve Monga, 2007).

A549, H1703, H460 ve H838 KHDAK hücre hatları ile yapılan çalışmada, WNT-1 proteininin bu hücre hatlarında aşırı eksprese olduğu ve bu proteinlerin ekspresyonu inhibe edildiğinde hücrelerin apoptoz adı verilen programlı hücre ölümü yoluna girdiği gösterilmiştir (He ve diğ., 2004).

Dvl proteininin KHDAK'de aşırı eksprese edildiği; akciğer kanserinde aktif rol aldığı bilinen Rac ve Rho proteinleriyle de ilişki kurduğu dolayısıyla akciğer kanseri patogenezinde etkili olabileceği gösterilmiştir (Mazieres ve diğ., 2005). Aynı araştırma grubu KHDAK'de WIF-1'in

susturulmasının, akciğer kanseri patogenezindeki WNT sinyal yolağının anormal aktivasyonunun önemli bir mekanizması olduğunu da göstermiştir (Mazieres ve diğ., 2004).

Tüm bunların yanı sıra, WNT sinyal yolağı antagonistlerinden WIF-1'in plazmid vektör yardımıyla A549 ve H460 akciğer kanseri hücre hatlarına transfekte edildiğinde ve H460 tümör ksenografts nude farelere enjekte edildiğinde hücre büyümesinin inhibe olduğu gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2007).

2.6. WNT SİNYAL YOLAĞI İNHİBİTÖRLERİ

Kanser tedavisinde WNT sinyal yolağının hedeflenmesi; somatik hücreler üzerindeki minimal etki ile tümör büyümesinin inhibisyonu, tümör nüksünün inhibisyonu ile kemoterapi ve radyoterapiye karşı direnç gelişiminin önlenmesi bakımından önemlidir. Bu nedenle WNT sinyal yolağı inhibitörleri birçok araştırmacının dikkatini çekmekte ve farklı inhibitörlerin geliştirilmesine devam edilmektedir. WNT sinyal yolağında sinyal akışını inhibe eden inhibitörler Dickkopf (Dkk) ve salgılanan frizzled-ilişkili protein (sFRP) aileleri olarak ikiye ayrılmaktadır (Kawano ve Kypta, 2003).

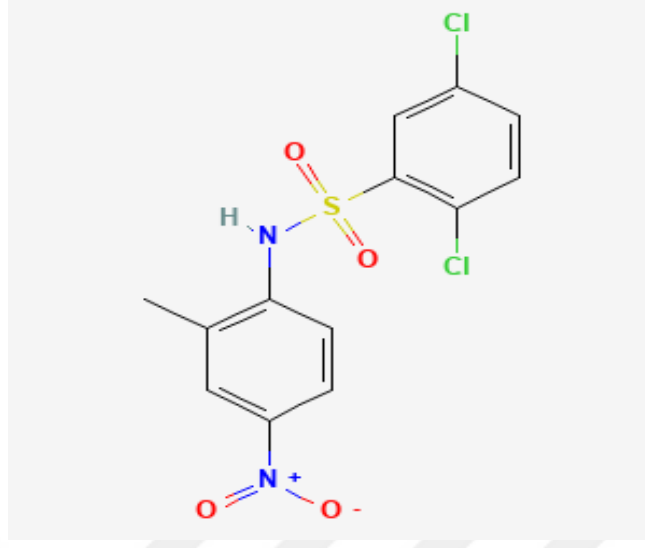
2.6.1. sFRP

sFRP-1, sFRP-2, sFRP-3, sFRP-4, sFRP-5, WIF ve Cerbeus (CER) gibi proteinlerden oluşan sFRP ailesi WNT proteinine direkt bağlanarak ya da WNT protein reseptörüne bağlanarak WNT ligandı ve reseptörünün etkileşimine engel olur (Kawano ve Kypta, 2003).

2.6.2. Dkk

Dkk protein ailesi, Dkk-1, Dkk-2, Dkk-3 ve Dkk-4 olmak üzere dörde ayrılır WNT proteinin reseptörü LRP5/6'ya bağlanarak WNT proteinin bu reseptörle ilişki kurmasını engellerler (Kawano ve Kypta, 2003).

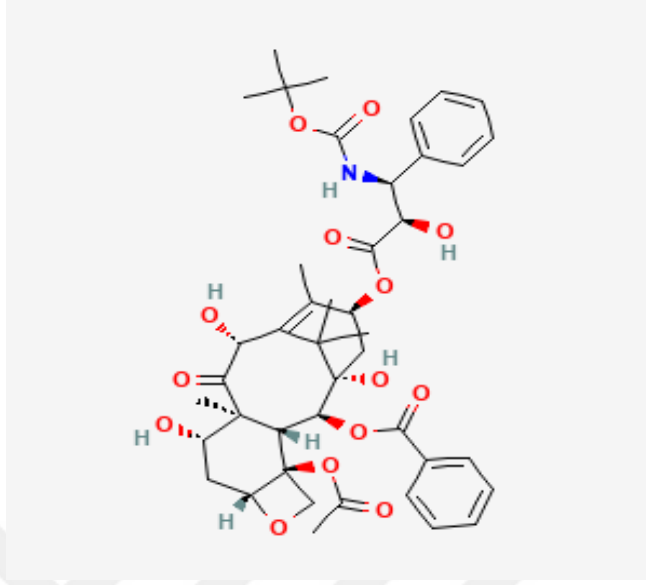
2.6.2.1. WNT Sinyal Yolağı İnhibitörü FH535



Şekil 2.8: FH535 yapısı National Center for Biotechnology Information, (2022b).

2,5-Dikloro-*N*-(2-metil-4-nitrofenil)benzensülfonamid kimyasal adıyla bilinen $C_{13}H_{10}Cl_2N_2O_4$ kimyasal formülüne sahip FH535, spesifik bir β -katenin inhibitörüdür (Şekil 2.7). β -katenin alımını baskılar ve β -katenin/TCF'nin aracılık ettiği transkripsiyonu antagonize eder (Handeli ve Simon, 2008). Dkk-3 inhibitör ailesi gibi β -katenine bağlanarak sinyal yolağını inaktive eder. Yapılan çalışmalarda, FH535'in hepatoselüler karsinomda, kök hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği; gliomada kanser oluşumunda etkili olduğu; mide kanserinde hücre çoğalmasını engellediği; miyeloid hücre soylarında programlı ölümü arttırdığı; pankreas kanserinde hücre çoğalmasını azalttığı; osteosarkomda büyümeyi inhibe ettiği; kolon kanseri hücre hatları olan HT29 ve SW480 üzerinde anjiyogenezi baskıladığı; hepatoselüler karsinoma hücrelerinde siklin D1'in ekspresyonunu azaltarak apoptozu indüklediği görülmüştür (Liu ve diğ., 2016; Tomizawa ve diğ., 2016; Gustafson ve diğ., 2017; Suknuntha ve diğ., 2017; Chen ve diğ., 2017; Liu ve diğ., 2018; Huo ve diğ., 2019; Qian ve diğ., 2019). FH535'in WNT sinyal yolağında hangi mekanizma ile inhibisyon sağladığı henüz bilinmemektedir. 2017 yılında, osteosarkomda FH535 kullanarak yapılan çalışmada FH535'in WNT sinyal yolağını, telomerik tekrar bağlama faktörü 1'in DNA'ya bağlanmasını engelleyen tankiraz 1/2 (TNKS1/2) enzimlerini inhibe ederek sağladığı, dolayısıyla inhibitörün etkisini gösterebilmek için kullandığı mekanizmalardan birinin bu olduğunu açığa çıkarılmıştır (Gustafson ve diğ., 2017).

2.8. DOSETAKSEL (DTX)



Şekil 2.9: DTX molekül formülü National Center for Biotechnology Information, (2022c).

$C_{43}H_{53}NO_{14}$ molekül formülüne sahip ve taksan sınıfına ait bir molekül olan Docetaxel (DTX), *Taxus baccata*'nın iğne uçlu yapraklarından izole edilerek elde edilen yarı sentetik antineoplastik bir ajandır (Şekil 2.8) (Erdemoğlu ve Şener, 2000). Mikrotübülleri depolimerize ederek hücre siklusunun G_2/M fazını bloke ettiği; bu şekilde hücre çoğalmasını inhibe ettiği ve hücreyi ölüme götürdüğü düşünülmektedir (Herbst ve Khuri, 2003). DTX, tübülün heterodimerlerinin β -tübülün alt ünitesine bağlanarak mikrotübül depolimerizasyonunu engellemektedir. Depolarizasyonun engellemesi mikrotübülün, stabilizasyon yönüne kaymasıyla fazla mikrotübül demetleri oluşumuna neden olur. Bu sebeple, hücre döngüsü G_2-M faz geçişinde bozulur ve hücre ölüme gider (Kumar, 1981). DTX'in tümör dokusunda etkisini hücre proliferasyonuna ve metastatik süreçlere etki ederek gösterdiği ortaya çıkarılmıştır (Herbst ve Khuri, 2003). Mikrotübül stabilizasyonuna etkisinin yanı sıra apoptoz mekanizması üzerinde etkisi olduğu da bilinmektedir (Wang ve diğ., 1999). Yapılan birçok çalışmada DTX gibi mikrotübül stabilizasyonunu hedefleyen anti-kanser ajanların apoptozu aktive ettiği gösterilmiştir (Schimming ve diğ., 1999). Tek başına veya diğer kemoterapötikler ile kombine olarak çeşitli tipteki kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Miller ve diğ., 1995; Aapro, 1997). DTX'in ileri evre KHDAK tedavisinde tek başına ve sisplatinle veya gemsitabinle kombin kullanımında etkinliğinin olduğu klinik çalışmalarda gösterilmiştir (Roszkowski ve diğ., 2000; Fossella ve diğ., 2003; Lilenbaum ve diğ., 2007). DTX, çeşitli solid

tümörlere karşı güçlü bir anti-tümör aktiviteye sahiptir (Hill ve diğ., 1994; Cortes ve Pazdur, 1995). DTX'in 100 mg/m² dozu ile kanserin faz IV aşamasında bulunan ve kemoterapi tedavisinden sonuç alamayan hastalarda %40 oranlarında tedavi başarıya ulaşmıştır ve DTX'in ilerlemiş KHDAK'e karşı önemli bir anti-tümör ilaç olduğu kabul edilmiştir (Erdemoğlu ve Şener, 2000).

2.9. APOPTOZ

Her hücre çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiyasyon) ve ölür. Bu evrelerin bir homeostaz içinde gerçekleşmesi organizmanın yaşamsal faaliyetlerinin sağlıklı şekilde devam edebilmesi için oldukça önemlidir. Homeostazın bozulması, kanser başta olmak üzere birçok hastalığın oluşumuna zemin hazırlamaktadır (Kerr ve diğ., 1994; McPhie ve diğ., 2003).

Yunancada apo (ayrı) ve ptozis (düşen) kelimelerinden oluşan apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında yapılan bir çalışmada ölen hücrelerin nükleuslarında yoğunlaşmış kromatin parçalarının nekroz ölüm tipinden farklı bir ölüm tipi olduğunun fark edilmesiyle kullanılmıştır (Kerr ve diğ., 1972).

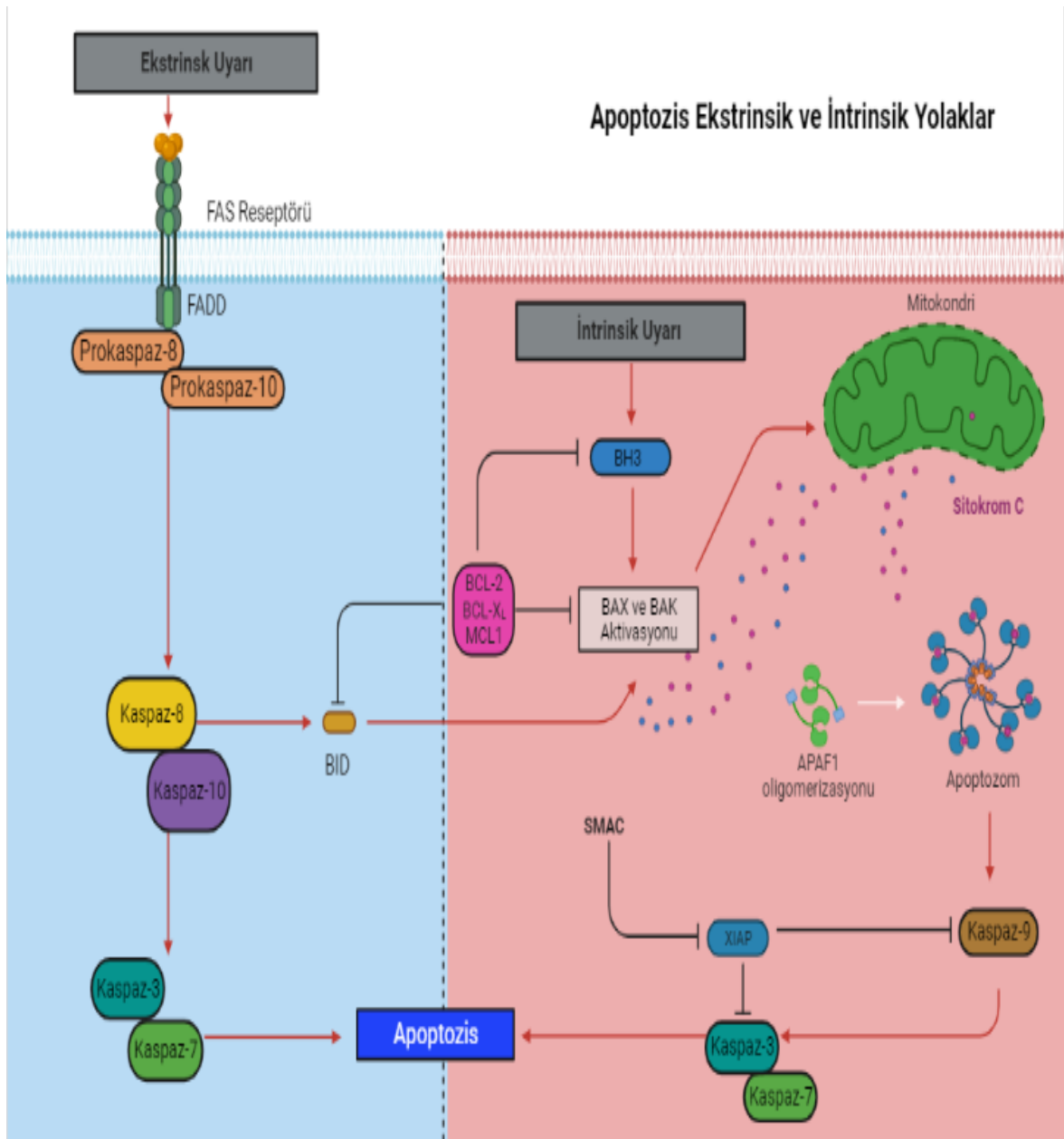
Bunun yanı sıra çok hücreli organizmalarda canlıların gelişimi esnasında apoptozise gereksinim duyulmaktadır. Örnek olarak; insan embriyosunun el parmakları arasındaki perdenin, burada bulunan hücrelerin apoptozis ile ölmesi sonucunda kaybolması, kurbağaların metamorfozis esnasında kuyruklarında bulunan hücrelerin apoptozis geçirip kaybolarak erişkin forma geçişinin sağlanması, deri ve gastrointestinal sistem hücrelerinin apoptozla ölüp yerlerine yeni hücrelerin gelmesi, ince bağırsaktaki kriptaların bağırsak boşluğuna dökülmesi ile yeni kriptaların oluşumu verilebilir (Vaux ve Korsmeyer, 1999; Coşkun ve Özgür, 2011).

Programlı hücre ölümü olarak ifade edilen ve ATP bağımlı olan apoptoz, hücrenin kendi kendini yok etmesi için fizyolojik ve metabolik süreçlerin oluşmasıyla başlar. Apoptoz sinyali alan hücrede ortamdaki uzaklaşma ve diğer hücrelerle ilişkisini kesme, büzülme, kromatin yoğunlaşması, jel elektroforezinde merdiven bant görüntüsü denilen "ladder pattern" oluşumu, ışık mikroskopunda hücrenin etrafında parlama, nükleusun kondanse olması ve sonrasında parçalara ayrılması, apoptotik cisimciklerin oluşumu, hücre membranının iç yüzeyinde bulunan fosfolipidlerinin hücre dışına transloke olması, kromatinin piknotik denilen şekilde yoğunlaşması, normal hücrede birbirini takip eden 7 kırılmanın yerini 300.000 kırılmaya

bırakması, DNA fragmentasyonu, mitokondriyal hasar gibi birtakım değişiklikler gözlenir. Apoptozda görülen apoptotik cisimcikler, makrofajlar tarafından tanınarak fagosite edilir. Bu esnada nekrozdan farklı olarak enflamasyon görülmez (Wijsman ve diğ., 1993; Öktem ve diğ., 2001; Zhang ve Xu, 2002; Guimarães ve Linden, 2004).

2.9.1. Apoptoz Mekanizması

Apoptoz hücre içi ve/veya hücre dışı sinyallerle gerçekleşen bir süreçtir.



Şekil 2.10: Apoptoz mekanizması. Şekil, Celepli ve diğ., (2020)'den Türkçe'ye çevrilip değiştirilerek yeniden çizilmiştir.

2.9.1.1. İnstrik Yol

Hücre içinde meydana gelen sinyaller, Bid proteinini aktive eder. Aktifleşen Bid proteini, Bcl-2 proteinini inaktive eder. Bcl-2'nin inaktive olmasıyla Bax ve Bak proteinleri aktifleşerek mitokondriyon membranında por oluşumunu indükler. Mitokondriyon membranının oluşumuyla zar potansiyeli değişir (Smaili ve diğ., 2000). Porlardan sitokrom-c, smac (kaspazın ikinci mitokondri kaynaklı aktivatörü), endo-G (endonükleaz-g), Ca^{+2} , kaspaz-3 ve kaspaz-8'in aktivasyonlarını inhibe eden AIF (apoptoz indükleyici faktör) salınımı başlar. Sitokrom-c, Apaf-1 ve ATP, apoptozom adı verilen kompleksi oluşturur (Adrain ve Martin, 2001). Apoptozom, kaspaz-9'u aktifleştirir. Aktifleşen kaspaz-9, prokaspaz-3'ü kaspaz-3'e dönüştürür. Kaspaz-3, ICAD (inaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktive eder. Böylelikle CAD (kaspaz aktive edici DNaz) serbest kalır. Serbestleşen CAD, nükleusta kromatinin yoğunlaşarak kromozoma dönmesini sağlamayı ve DNA'nın fragmentasyonuna sebebiyet vererek apoptotik hücre ölümüne neden olur (Şekil 2.9) (Strasser ve diğ., 2000).

2.9.1.2. Ekstrinsik Yol

Üç farklı yol vardır:

İlk yolda, hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine ilgili ligandın bağlanmasıyla konformasyonel değişim geçiren reseptörde sinyal iletimi başlar. Konformasyonel değişim geçiren reseptör, prokaspaz-8'le birleşerek DISC (ölüm indükleyici sinyal kompleksi)'i oluşturur. Oluşan DISC ile, prokaspaz-8, kaspaz-8'e dönüşür. Kaspaz-8 ya kaspaz-3'ü aktive eder ya da Bid proteinini keserek kaspaz-9'u aktive ederek kaspaz-3'ü aktive eder. İki yoldan herhangi biriyle aktifleşen kaspaz-3, DNA fragmentasyonuna ve dolayısıyla apoptoza neden olur (Şekil 2.9) (Elmore, 2007; Coşkun ve Özgür, 2011).

İkinci yolda, hücre membranında bulunan sfingomyelinin radyasyon, kemoterapi gibi etkenlerle seramide dönüşümü sağlanır. Seramidin sfingozine dönüşmesiyle Bid proteinin ekspresyonu artar. Artan Bid proteini, hücreyi apoptoza götürür (Elmore, 2007; Coşkun ve Özgür, 2011).

Üçüncü yolda, patojenle karşılaşan hücrede sitotoksik T lenfosit hücreye bağlanır. Bağlanmayla serin proteaz olan perforin salınır. Perforinler, hedef hücrede porlar oluşturur. Porun içine Ca^{+2} girişi artar. Artan kalsiyumla veziküllerden başka bir serin proteaz olan

Granzim B salınır. Granzim B, kaspazların aktivasyonuna neden olur. Aktive olan kaspazlar DNA fragmantasyonu sonucu apoptoza neden olur (Elmore, 2007; Coşkun ve Özgür, 2011).

2.9.2. Apoptozun Düzenlenmesi

Apoptozun düzenlenmesinde kalsiyum, seramid, p53, kaspazlar, sitokrom-c, mitokondriyonlar ve Bcl-2 ailesinin üyeleri rol almaktadır.

2.9.2.1. BCL-2 Ailesi

BCL-2 protein ailesi üyeleri, pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeler olarak iki gruba ayrılmaktadır. Pro-apoptotik üyeler olan Bad, Bax, Bid Bcl-Xs, Bak, Bim, Puma ve Noxa proteinleri hücrede fazla ise hücre sitokrom-c ve AIF salınımını arttırdığı için apoptoz indüklenir.

Anti-apoptotik üyeler olan Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 proteinleri hücrede fazla ise hücrede por oluşumu indüklenir ve hücredeki iyon alışverişinin denge halinde gerçekleşmesi sağlanır. Bu iyon alışverişi, pro-kaspaz adı verilen öncü kaspazları, AIF ve sitokrom-c salınımını inhibe ederek apoptozu inhibe eder (Adams ve Cory, 2001).

2.9.2.2. Tümör Protein 53

P53 adıyla da bilinen bir transkripsiyon faktörü olan tümör protein 53, hücredeki DNA hasarında hücre döngüsünü durdurarak DNA tamiri için zaman kazandırır. Hücredeki DNA hasarı fazlaysa hücreyi apoptozis yoluna götürmek için Bax ve Apaf-1 gibi proteinleri indükler (Vousden ve Lu, 2002).

2.9.2.3. FAS

İmmün sistemdeki hücre ölümünü kontrol eden hücre reseptörüdür. Reseptör uyarılınca pro-kaspazları aktive olarak apoptotik süreci başlatır. Fas proteini, reseptörüne bağlanarak reseptörde konformasyonel değişim sağlar. Bu şekilde aktive olan reseptör, FADD reseptörüyle birleşir ve pro-kaspazlar aktive olur; apoptotik süreç başlar (Curtin ve Cotter, 2003).

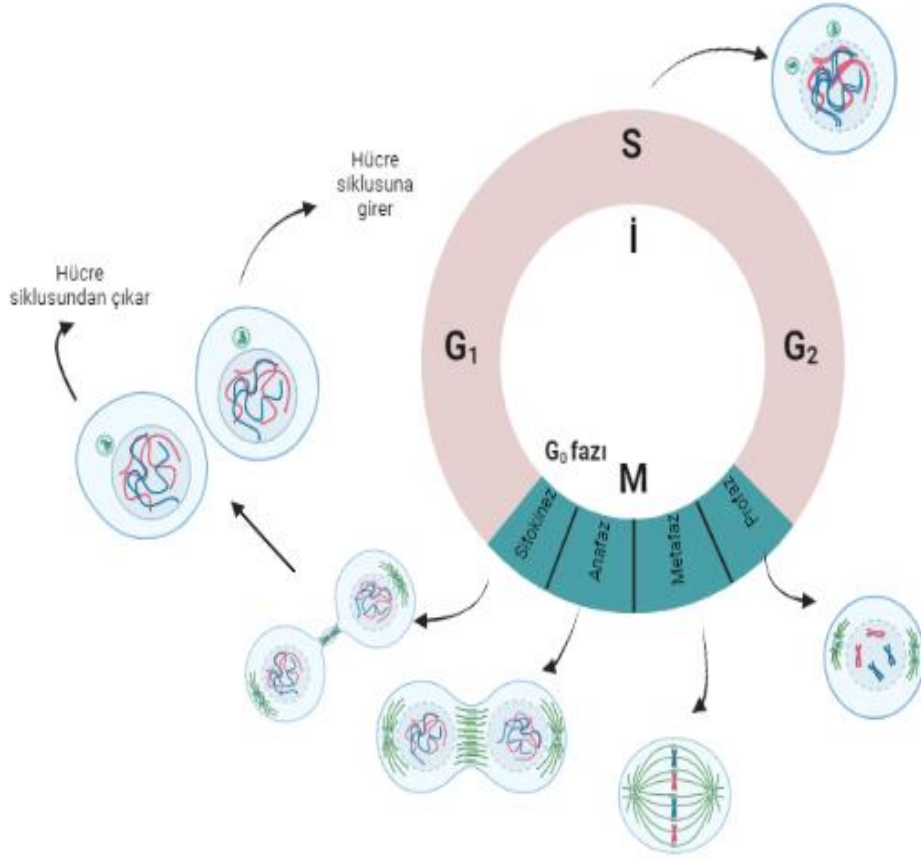
2.9.2.4. Kaspazlar

Sistein proteaz olan kaspazlar, hücrede inaktif şekilde bulunurlar. Aktifleşmeleri için proteolitik süreç gereklidir. Yaklaşık 100 farklı proteini keserek apoptoza neden olan kaspazlar: kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-10'unu içeren başlatıcı kaspazlar; kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi içeren efektör kaspazlar olarak; kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz-5, kaspaz-11, kaspaz-12,

kaspaz-13 ve kaspaz-14'ü içeren inflamatuvar kaspazlar olarak üç ana gruba ayrılırlar. Kaspazlar, hücreyi apoptoza götürmek için DNA tamir enzimlerini inhibe ederler. Bunun dışında hücre iskeleti proteinlerinin keserek iskelet homeostazını bozar ve apoptoza neden olurlar. Kaspaz-3 ve kaspaz-7, cellat kaspazlar olarak adlandırılan yıkıcı, efektör kaspazlardır. Bu kaspazların aktivasyonu endonükleaz aktivasyonu, fagositik hücreler için ligand ekspresyonu, nükleer proteinlerin imhası ve apoptotik cisimciklerin oluşumu gerçekleşir; hücre apoptotik yola girer (Curtin ve Cotter, 2003; D'Arcy, 2019).

2.10. HÜCRE DÖNGÜSÜ ve KANSER İLİŞKİSİ

Hücre döngüsü, hücre bölünmesi ve çoğalmasını sağlayan iki hücre bölünmesi arasındaki süreç olarak tanımlanır. Hücre döngüsünde, hücre DNA'sı, özdeş iki hücreye aktararak kopyalanır. Bu süreç temelde interfaz ve mitoz (M) olmak üzere iki ana fazda gerçekleşmektedir. İnterfaz fazı, hücre döngüsünün yaklaşık olarak %90'ını oluşturan ve mitoz bölünme için DNA replikasyonun yapıldığı mitoz hazırlık evresidir. İnterfaz fazı G₁, S ve G₂ evreleri olmak üzere üç evreden oluşmaktadır. G₁ evresinde, hücre büyür fakat DNA replikasyonu gerçekleşmez. Sentez fazında, DNA kendini replike eder. G₂ fazında, mitoz bölünme için hazırlık yapılır. M evresi ise kendi içinde beş evreden oluşmaktadır. Bunlar: profaz, metafaz, anafaz, telofaz ve sitokinez evreleridir. Profazda, kromozom kondanse olur ve mikrotübüller iç iplikçiklerini oluşturmaya başlar. Metafazda, kromozomlar ekvatorial düzlemde dizilir. Anafazda, kardeş kromatidler birbirinden ayrılır ve kromozom sayısı iki katına çıkar. Telofazda, kromozomlar decondense olur. Nukleolus ve nükleus membranı oluşmaya başlar. Sitokinezde hücre membranı ve sitoplazma iki yeni özdeş hücreye bölünür ve hücre döngüsü tamamlanır (Şekil 2.10) (Cabadak, 2008; Matthews ve diğ., 2021).



Şekil 2.11: Hücre siklusu Matthews ve diğ., (2021)'den Türkçe'ye çevrilerek yeniden çizilmiştir.

Bu süreçlerdeki herhangi bir bozukluk, disfonksiyon, süreci yöneten siklin ve siklin bağımlı kinazlardaki mutasyon, süreçte rol alan mikrotübüllerin, iğ iplikçiklerinin hasara uğraması ya da fonksiyonunu doğru şekilde yerine getirememesi gibi durumlarda, hücrede kanser hücrelerinin tipik özelliği olan kontrolsüz çoğalma görülmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Bu durum, kanserde hücre döngüsünde rol alan mekanizmaların etkili olduğunu da desteklemektedir (Malumbres, 2011). Birçok çalışma, hücre döngüsü ve kanser arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktadır (Tetsu ve McCormick, 2003; Malumbres, 2011). Kanser hücrelerinde meydana gelen kontrolsüz çoğalmanın dolayısıyla mitoz bölünmenin önüne geçebilmek için mitoz fazı hedefli yeni yaklaşımlar üzerinde çalışılmaktadır (Baran, 2018).

Bu yaklaşımlardan biri de hücreyi, mitoz bölünme fazının kontrol noktalarında oluşan DNA hasarı sonucunda mitotik katastrof adı verilen hücre ölüm tipine yönlendirmektir. Mitotik katastrof, hücre bölünmesi sırasında mitozda meydana gelen başarısızlık olarak tanımlanır. Apoptotik hücre ölümünün aksine kaspaz bağımlı değildir ve nükleer fragmantasyon

gözlenmez. Hücre siklusu kontrol noktalarından birinde meydana gelen hata sonucu mitozdan önce ya da mitoz sırasında siklus durur ve mitotik iğ iplikçikleri degrade olarak kardeş kromatidlerin doğru şekilde ayrılmasını engeller (Galluzzi ve diğ., 2018). Taksan grubundan bir antineoplastik ajan olan DTX'in de kanser hücrelerinde mikrotübülleri depolimerize ederek G₂-M fazını bloke ettiği ve böylelikle hücredeki mitoz bölünmeyi azaltarak hücreyi ölüme yönlendirdiği bilinmektedir (Herbst ve Khuri, 2003).



3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN HÜCRE SOYLARI

Bu çalışmada KHDAK modeli olarak kullanılan A549 hücre soyu, adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyum hücresidir. Bu hücre hattı ilk kez 1972 yılında 58 yaşında, erkek bir hastanın tümöründen izole edilmiştir. A549 hücreleri, kültür zeminine yapışarak kültürde tek tabaka halinde büyümektedir. Morfolojik olarak yassı şekilli hücrelerdir.

Sağlıklı akciğer modeli olarak kullanılacak BEAS-2B hücre soyu, sağlıklı insan bronşiyal epitel hücresidir. Bu hücre hattı ilk kez 1989 yılında izole edilmiştir. Morfolojik olarak fibroblast benzeri hücrelerdir.

Bu hücreler İstanbul Üniversitesi İleri Kanser ve İlaç Biyoteknolojileri Araştırma Laboratuvarı'nda rutin olarak kültüre edilen hücrelerdir. Her iki hücre hattı, 100 µg/ml streptomisin (Streptomisin sülfat, İ.E. Ulugay), 100 IU/ml penisilin (Pronapen, Pfizer), Amhotericine B (Sigma), %10 Fetal Sığır Serum (FBS, Gibco lab.) içeren pH'sı %4,4'lük NaHCO₃ ile 7,2'ye ayarlanmış RPMI-1640 mediumunda yaşatılmıştır.

3.2. HÜCRELERİN PASAJ İŞLEMİ

A549 ve BEAS-2B hücrelerinin pasaj işlemi, hücrelerin yetiştirildiği flasklarda tek tabaka haline ulaştıklarında gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yetiştirildiği kültür kabından kaldırılabilmesi için hücreler arası bağlantıyı ve kültür kabı ile hücrelerin bağlantısını kesen proteolitik enzim olan %0,25'lik tripsin eriyiğinin kullanılmıştır. Süspanse edilerek santrifüj tüpüne aktarılan hücrelere 2 ml RPMI-1640'dan hazırlanan medium eklenerek tripsin aktivesi inaktive edilmiştir. A549 hücreleri 1500 g dönme hızında 3 dakika; BEAS-2B hücreleri 1000 g dönme hızında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp pellet, yeni kültür kaplarına yeterli miktarda besiyeriyle birlikte eklenmiştir.

3.3. HÜCRELERİN EKİM İŞLEMİ

Çoğalma hızı: mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivesi analizi için 96 kuyucuklu kültür kaplarına her iki hücre hattı için her bir kuyucukta 15×10^4 hücre/ml besiyeri; mitotik aktivite

analizi için her bir kuyucukta 15×10^4 hücre/ml besiyeri; BrdU hücre proliferasyonu analizi için her bir kuyucukta 2×10^4 hücre/ml besiyeri ve kaspaz 3-7 aktivite analizi için 24 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyucuğunda 5×10^5 hücre/ml besiyeri; gerçek zamanlı hücre analizi için 16 kuyucuklu E-plate'in her bir kuyucuğuna 8×10^3 hücre/ml besiyeri olacak şekilde A549; 5×10^3 hücre/ml besiyeri olacak şekilde BEAS-2B ekimi yapılmıştır ve 24 saatlik süre boyunca, 37°C 'de %95 hava ve %5 CO_2 karışımında inkübasyona devam edilmiştir. Hücrelerin deney öncesindeki durumlarının değerlendirilmesi için invert mikroskop altında morfolojik analizleri yapılmıştır.

3.4. İLAÇ KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI VE UYGULANMASI

3.4.1. DTX

Uygulanan DTX konsantrasyonları, literatürde yer alan *in vitro* çalışmalar temel alınarak saptanmıştır. 20 mg/mL Doxitax (DTX etken maddeli)'dan $200 \mu\text{M}$ 'lık DTX stok solüsyonu hazırlanmıştır. $200 \mu\text{M}$ 'lık DTX stok solüsyonu $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanarak tüm deneyler boyunca kullanılmıştır. Deneylere başlamadan önce stok solüsyon, uygun doku kültürü besiyeri ile seyreltilerek; $0,0025 \mu\text{M}$; $0,005 \mu\text{M}$; $0,01 \mu\text{M}$; $0,1 \mu\text{M}$ ve $1 \mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonlar hazırlanmış ve kültüre edilen iki hücre soyuna da ayrı ayrı uygulanmıştır.

3.4.2. FH535

361.2 g/mol moleküler ağırlığa sahip 10 mg FH535 (Tocris 4344), DMSO ile seyreltilmiştir. $500 \mu\text{M}$ FH535 stok solüsyonu hazırlanmıştır ve stok solüsyonu $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanarak tüm deneyler boyunca kullanılmıştır. Deneylere başlamadan önce stok solüsyon uygun doku kültürü besiyeri ile seyreltilerek; $0,25 \mu\text{M}$, $0,5 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ ve $5 \mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan ilaç konsantrasyonları kültüre edilen iki hücre soyuna da ayrı ayrı uygulanmıştır.

3.4.3. DTX ve FH535 Kombine Çalışması

Kombin deneyler için; $0,005 \mu\text{M}$ DTX+ $0,5 \mu\text{M}$ FH535; $0,0025 \mu\text{M}$ DTX+ $0,5 \mu\text{M}$ FH535; $0,05 \mu\text{M}$ DTX+ $0,25 \mu\text{M}$ FH535 olmak üzere üç doz kombinasyonu hazırlanarak kültüre edilen iki hücre soyuna da ayrı ayrı uygulanmıştır.

Deneyler 6 grup halinde gerçekleştirilmiştir.

1. A549+DTX

2. A549+FH535
3. A549+(DTX+FH535)
4. BEAS-2B+DTX
5. BEAS-2B+FH535
6. BEAS-2B+(DTX+FH535)

İlaç dozları 0-72 saatlik süresince her iki hücre hattına uygulanmıştır.

3.5. ÇOĞALMA HIZI: MİTOKONDRIYAL DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ ANALİZİ (MTT)

DTX, FH535 ve DTX+FH535 kombinasyonunun KHDAK modeli olarak kullanılan A549 ve sağlıklı akciğer modeli olarak kullanılan BEAS-2B hücre soyları üzerinde meydana getirdiği sitotoksosite, MTT testi ile değerlendirilmiştir. MTT, 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2-5-difeniltetrazolyum bromür testi olarak adlandırılır. Tetrazolyum tuzlarının elektron alarak indirgenmeleriyle formazan denilen yapı oluşmaktadır. Bu yapı oluştuğunda, renk değişimi gözlenir. Tetrazolyum halkası, aktif mitokondri bulunan canlı hücreler tarafından kırılabilirdiği için renk reaksiyonu sadece canlı hücrelerde gözlenir. Ölü hücrelerde aktif mitokondri bulunmadığından dolayı tetrazolyum bileşikleri indirgenmez ve bir renk değişimi gözlenmez. (Mosmann, 1983).

Hücreler 96 kuyucuklu kültür kaplarına her bir kuyucukta 15×10^4 hücre/ml besiyeri olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler 37°C ve %5 CO_2 ortam şartlarında 24 saat inkübe edilmiş ve sonrasında A549 ve BEAS-2B hücrelerine ayrı ayrı 0,01 μM DTX, 0,1 μM DTX ve 1 μM DTX; 0,5 μM FH535, 1 μM FH535 ve 5 μM FH535 ve 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535; 0,0025 μM DTX+0,5 μM FH535; 0,005 μM DTX+0,25 μM FH535 konsantrasyonları uygulanmıştır. DTX, FH535, DTX+FH535 kombinasyonları ile muamele edilen hücreler 24, 48 ve 72 saat süresince deneye alınmıştır. Deney sürelerinin sonunda kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklara 40 μl MTT (sigma m5655, 5mg/ml) eklenmiştir. Yaklaşık 2 saatlik inkübasyondan sonra ışık mikroskobu altında formazan kristalleri oluşumu gözlenmiştir. Ardından MTT bulunan kuyucuklara 160 μl DMSO eklenerek 40 dakika, 70 rpm, 37°C ve %5

CO₂ ortam şartlarını içeren çalkalayıcı etüvde inkübasyona bırakılarak formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Formazan kristallerinin çözünmesinin ardından oluşturulan deney gruplarının absorbans değerlerinin ölçümü, 570 nm’de spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir (µQuant, Bio-Tek Instruments INC).

3.6. xCELLigence DP GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZİ (RTCA)

Hücre proliferasyonu ve hücre ölümlerinin belirlenmesinde rutin olarak kullanılan yöntemler, kültüre edilen hücrelerden belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak biyokimyasal analiz yapılması prensibine dayanmaktadır. Günümüzde bu amaçla yeni geliştirilen sistemlerden biri olan xCELLigence DP sistemi, kültüre edilen hücrelerdeki proliferasyon ve ölümleri gerçek zamanlı ve belirlenen süre içerisinde istenilen zaman aralıklarında ölçebilmektedir. Hücre ekiminin yapıldığı E-plate yüzeyine yapışan canlı hücre miktarı arttıkça alt yüzeyde yer alan altın elektrotların akıma karşı direnç artmaktadır. Plate’e yapışan canlı hücre miktarı azaldıkça elektrotların direnci azalmaktadır. Bu direncin eş zamanlı olarak bilgisayar ekranında grafik olarak gösterilmesiyle gerçek zamanlı olarak hücresel analizler gerçekleştirilmektedir.

xCELLigence DP’de 16 kuyucuklu E-plate kullanılmıştır. A549 hücreleri için 8×10^3 hücre/ml; BEAS-2B hücreleri için ise 5×10^3 hücre/ml olacak şekilde her kuyucuğa hücre ekimi yapılmıştır. Ekimin ardından, E-plate’ler 20 dakika steril çalışma kabini içerisinde, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonlarına 37°C ve %5 CO₂ ortam şartlarında ve xCELLigence DP cihazının uygun istasyonlarında devam edilmiştir. Cihaz, 100 saat boyunca hücre analizi yapması için ayarlanmıştır. Hücre ekiminin ardından tekli doz ve kombin doz ajanları eklenerek ölçüm almaya devam edilmiştir. Belirlenen konsantrasyonlara ve 100 saatlik zamana bağımlı grafikler elde edilmiştir (Çetin ve Topcul, 2017). Bu işlemler her iki hücre hattında da DTX, FH535 ve DTX+FH535 kombinasyonu için ayrı ayrı tekrarlanmıştır.

3.7. MİTOTİK AKTİVİTE ANALİZİ

Her iki hücre hattı için 96 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyusunda 15×10^4 hücre/ml olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yayılması için 37°C’de %95 hava ve %5 CO₂ ortam şartlarını içeren etüv içerisinde 24 saat inkübasyon yapıldıktan sonra kuyucuktaki medium atılıp hücrelere 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 doz kombinasyonu eklenmiş ve 24

saat 37°C'de %95 hava ve %5 CO₂ ortam şartlarını içeren etüv içerisinde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası ilaçlı besiyeri atılıp 100 µl %4 formaldehit içeren 10X PBS (pH:7.4)'den 1:9 oranında dH₂O ile dilüe edilen PBS eklenip parafilmle kaplanan plate, 20 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında formaldehit içeren PBS atılıp hücreler 3 kez 5'er dakika boyunca 200 µl PBS içinde %10 Triton X-100 solüsyonunun 1X PBS'ye eklenmesi ve iyice karıştırılmasıyla hazırlanan yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Daha sonra yıkama tamponu atılmış ve kuyucuklara 100 µl Quenching Buffer eklenmiş ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası kuyucuklardaki Quenching Buffer atılmıştır. 2 kez 5'er dakika 200 µl yıkama tamponu ile hücreler yıkandıktan sonra yıkama tamponu da uzaklaştırılmıştır. Daha sonra 100 µl Antibody Blocking Buffer kuyucuklara eklenmiş ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Antibody Blocking Buffer atıldıktan sonra 2 kez 200 µl yıkama tamponu ile hücreler yıkanmıştır. Yıkama tamponu atılıp 50 µl Antikor Seyreltme Tamponunda 1:2000 oranında seyreltilmiş olan primer antikor eklenmiştir. Plate, sızdırmazlık bandıyla kapatıldıktan sonra 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda primer antikor atılmış hücreler 3 kez 5'er dakika boyunca 200 µl yıkama tamponuyla yıkanmıştır. Yıkama tamponu atıldıktan sonra, 100 µl antikor seyreltme tamponunda 1:1000 oranında seyreltilen sekonder antikor eklenmiştir. Plaka, tekrar sızdırmazlık bandıyla kapatılmış ve 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 1 saatlik inkübasyon sonrasında sekonder antikor atılıp hücreler 3 kez 5'er dakika boyunca 200 µl yıkama tamponu, daha sonrasında 2 kez 5'er dakika 200 µl 1X PBS ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında daha önceden bekletilmiş olan Developing Solution'dan 100 µl eklenmiştir. Oda sıcaklığında doğrudan ışıktan koruyarak 2-20 dakika inkübasyona bırakılmış ve mavi renk değişimi gözlenmiştir. Renk değişimi olunca 100 µl Stop Solution eklenerek rengin sarıya dönmesi gözlenmiştir. Sarı renk değişimi görüldükten sonra plate, Reader plate (Flx-800, Bio-Tek Instruments Inc.) okuyucuda 450-655 nm'de 5 dakika içerisinde ölçüme alınmıştır. Bu işlemler A549 hücre hattında 24, 48 ve 72 saatlerde tekrarlanmıştır.

3.8. BrdU HÜCRE PROLİFERASYON ANALİZİ

96 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyusunda 2×10^4 hücre/ml olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yayılması için 24 saat 37°C'de %95 hava ve %5 CO₂ ortam şartlarını içeren etüv içerisinde inkübasyonda bekletildikten sonra 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 doz kombinasyonu eklenmiştir. Kombin doz eklendikten 3 saat sonra 20 µl BrdU (Millipore 2750)

eklenmiştir. Öncelikle kit içerisindeki 500 x BrdU'nun 1:500 oranında (Stoktan 8 µl BrdU çekilmiş ve 3992 µl besiyerine eklenmiştir) seyreltik solüsyonu hazırlanmıştır. 24 saat 37°C'de %95 hava ve %5 CO₂ ortam şartlarını içeren etüv içerisinde inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyon sonunda, kuyulardaki medium uzaklaştırılarak her bir kuyuya 200 µl sabitleme solüsyonu eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda sabitleme solüsyonu tamamen uzaklaştırılmıştır. Yıkama aşamasında kit içerisinde yer alan 50xWash Buffer, 1:50 oranında seyreltilerek 3 kez yıkama yapılmış, son yıkamadan sonra Wash Buffer kuyulardan uzaklaştırılmıştır. Her kuyuya 100 µl Anti-BrdU antikoru eklenerek oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra seyreltilen Wash Buffer ile yıkama işlemi tekrarlanmıştır. 2000x Goat anti-mouse IgG, Peroksidaz konjugatı 1:2000 oranında seyreltilmiş ve her bir kuyucuğa 100 µl eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Her kuyuya 100 µl TMB Peroksidaz Substrat eklenerek karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra Anti-stop Solution'dan her kuyuya 100 µl eklenerek ve 450-550 nm çift dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu işlemler A549 hücre hattında 24, 48 ve 72 saatlerde tekrarlanmıştır.

3.9. KASP AZ 3,7 AKTİVİTESİ ANALİZİ

A549 hücre hattındaki kaspaz aktivasyonunun tespiti Kaspaz 3/7 deney kiti (CaspasTag™ Caspase-3,7 In Situ Assay Kit, Fluorescein Millipore, APT423) kullanılarak belirlenmiştir. 24 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyucuğuna 5x10⁵ hücre/ml olacak şekilde ekim yapılmıştır. Hücrelerin yapışması ve yayılması için 24 saat 37°C'de %95 hava ve %5 CO₂ ortam şartlarını içeren etüv içerisinde inkübasyonda bekletildikten sonra 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 doz kombinasyonu eklenmiştir. 24 saat 37°C'de %95 hava ve %5 CO₂ ortam şartlarını içeren etüv içerisinde inkübasyona devam edilmiştir. İnkübasyon sonrası medium atılarak hücreler tripsin eriyiği ile plateden kaldırılmıştır. 800 g'de 5 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatant atılmıştır. Pellet üzerine 3 ml medium eklenerek iyice karıştırılmıştır. Daha sonra hücre süspansiyonundan 300 µl steril tüplere aktarılmıştır. Tüpe daha önce hazırlanan 30XFLICA reaktifinden 10 µl eklenerek %5 CO₂ ve %95 hava içeren inkübatörde 37 °C'de, karanlıkta 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 1X yıkama tamponundan 2 ml eklenerek 400 g hızda 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüjün ardından süpernatant atılarak 1X yıkama tamponundan 1 ml eklenerek tekrar 400 g hızda 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak 1 ml 1X PBS'den eklenmiş ve vortekslenmiştir. Daha sonra vortekslenen

süspansiyondan steril bir tüpe 50 µl alınarak üzerine 450 µl PBS eklenmiştir. 400 g hızda 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant atılarak 400 µl PBS eklenmiştir. Hücreler siyah kültür kaplarına her bir deney grubundan 100 µl olacak şekilde ekilmiştir. Floresan Plate Reader (Flx-800, Bio-Tek Instruments Inc.) kullanılarak 490 nm eksitasyon dalga boyu ve 520 nm emisyon dalga boyunda (λ_{ex} 490, λ_{em} 520) ölçümler yapılmıştır. Bu işlemler A549 hücre hattında 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 doz kombinasyonu için 24, 48 ve 72 saatlerde tekrarlanmıştır.

3.10. İSTATİKSEL DEĞERLENDİRME:

Deney gruplarının verileri, tek yönlü bir Anova testi ile karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analizler, GraphPad Prism sürüm 6 (GraphPad Software, San Diego, California, ABD) kullanılarak yapılmıştır. Testlerde $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

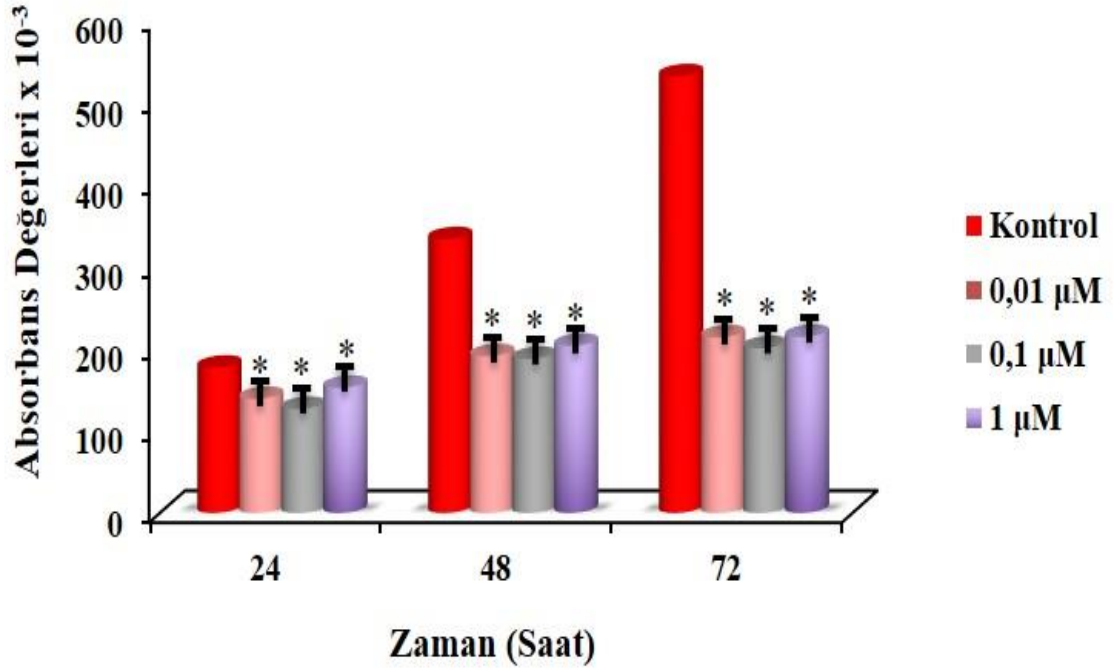
Bu çalışmada, KHDAK başta olmak üzere kanser tedavisinde kullanılan DTX ve KHDAK'de aşırı aktive gösterdiği bilinen WNT sinyal yolağı inhibitörü olan FH535'in kombin halde kullanımının adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyum hücresi A549 ve sağlıklı bronşiyal epitel hücresi BEAS-2B hücre hatları üzerindeki antiproliferatif etkilerinin MTT, gerçek zamanlı hücre analizi, mitotik aktivite analizi, BrdU hücre proliferasyon analizi ve kaspaz 3-7 aktivite analizi yöntemleriyle *in vitro* koşullarda hücresel seviyede oluşturduğu etkiler araştırılmıştır.

4.1. ÇOĞALMA HIZI: MİTOKONDRIYAL DEHİDROGENAZ ENZİM AKTİVİTESİ ANALİZİ (MTT) BULGULARI

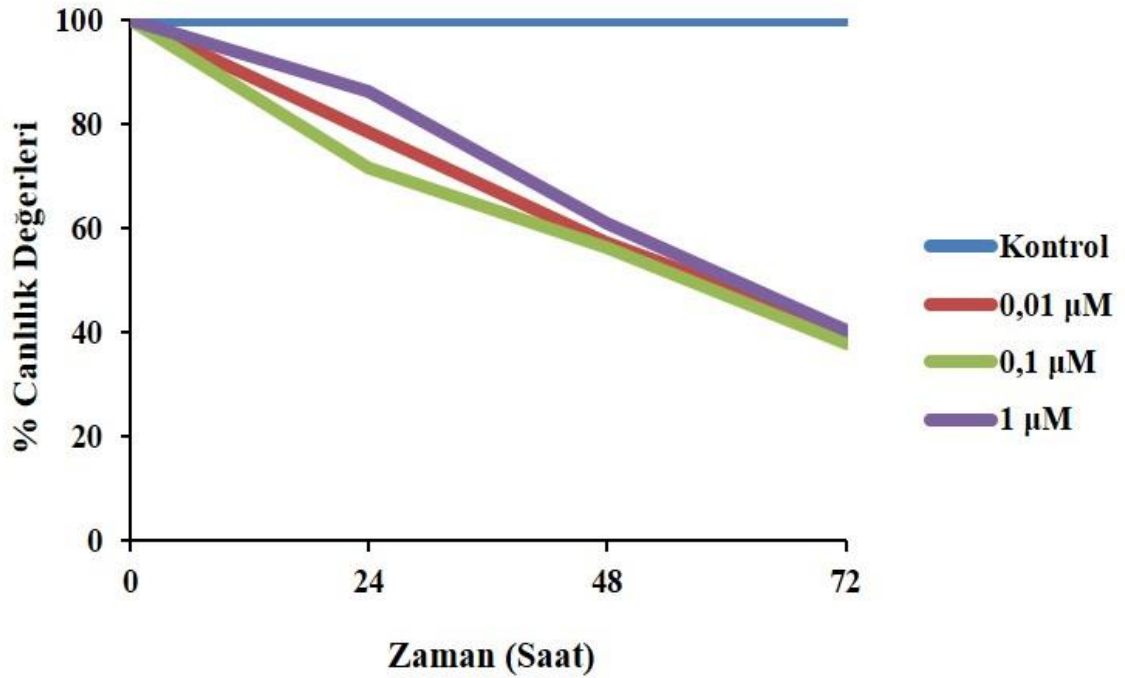
DTX için 0,01 μM , 0,1 μM ve 1 μM ; FH535 için 0,5 μM , 1 μM ve 5 μM dozları A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına 24, 48 ve 72 saat süresince verilmiş ve ardından MTT analizi için gerekli deney protokolü uygulanmıştır. Elde edilen veriler ışığında DTX için A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında IC₅₀ dozuna en yakın olarak etki gösteren dozların 0,01 μM ve 0,1 μM olduğu buna karşılık A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında FH535 için bu dozların 0,5 μM ve 1 μM olduğu saptanmıştır. Uygulama yapılmayan kontrol grubu ve deney grubu ile yürütülen deney serilerinden elde edilen veriler Tablo 4.1, Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4, Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,01 μM , 0,1 μM ve 1 μM DTX uygulanan A549 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (*Kontrole göre anlamlı $p < 0.05$).

Zaman (saat)	Absorbans Değerleri (450-690 nm)			
	Kontrol	0,01 μM	0,1 μM	1 μM
24	177x10 ⁻³ ±0,009 ^{SD}	139x10 ⁻³ ±0,008*	126,67x10 ⁻³ ±0,011*	152,5x10 ⁻³ ±0,013*
48	333,5x10 ⁻³ ±0,012 ^{SD}	191 x10 ⁻³ ±0,008*	187,67x10 ⁻³ ±0,009*	203,67x10 ⁻³ ±0,012*
72	532 x10 ⁻³ ±0,015 ^{SD}	214 x10 ⁻³ ±0,012*	200,67x10 ⁻³ ±0,013*	214,5x10 ⁻³ ±0,012*



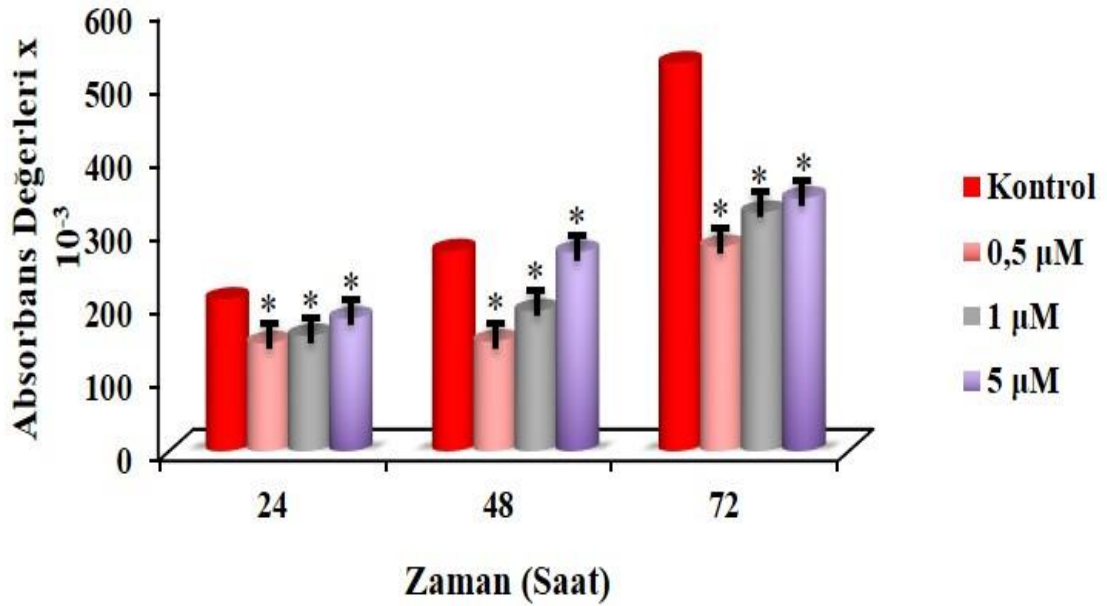
Şekil 4.1: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,01 μM, 0,1 μM ve 1 μM DTX uygulanan A549 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrolle göre anlamlı p<0.05).



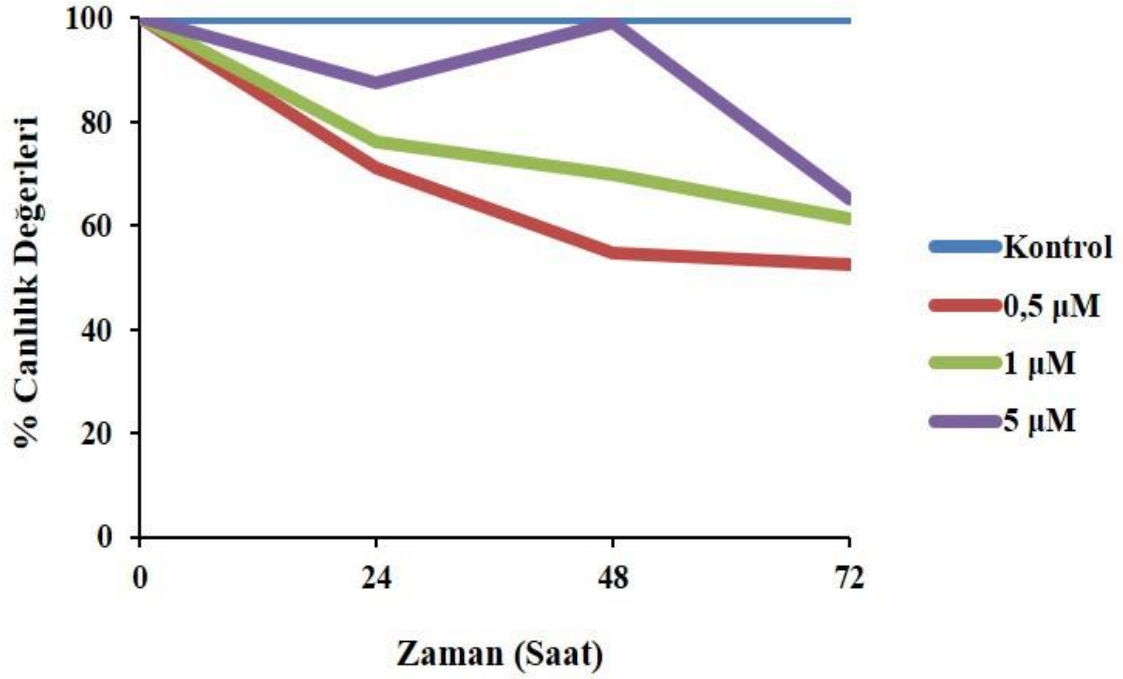
Şekil 4.2: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,01 μM, 0,1 μM ve 1 μM DTX uygulanan A549 hücrelerine ait % canlılık değerleri (Kontrolle göre anlamlı p<0.05).

Tablo 4.2: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,5 μM , 1 μM ve 5 μM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (*Kontrolle göre anlamlı $p<0.05$).

Zaman (saat)	Absorbans Değerleri (450-690 nm)			
	Kontrol	0,5 μM	1 μM	5 μM
24	$206,5 \times 10^{-3} \pm 0,014^{\text{SD}}$	$147 \times 10^{-3} \pm 0,012^*$	$157 \times 10^{-3} \pm 0,011^*$	$180,5 \times 10^{-3} \pm 0,013^*$
48	$272,5 \times 10^{-3} \pm 0,012^{\text{SD}}$	$149,2 \times 10^{-3} \pm 0,013^*$	$190,67 \times 10^{-3} \pm 0,013^*$	$270,5 \times 10^{-3} \pm 0,012^*$
72	$527,67 \times 10^{-3} \pm 0,013^{\text{SD}}$	$278 \times 10^{-3} \pm 0,016^*$	$324,5 \times 10^{-3} \pm 0,014^*$	$343,75 \times 10^{-3} \pm 0,015^*$



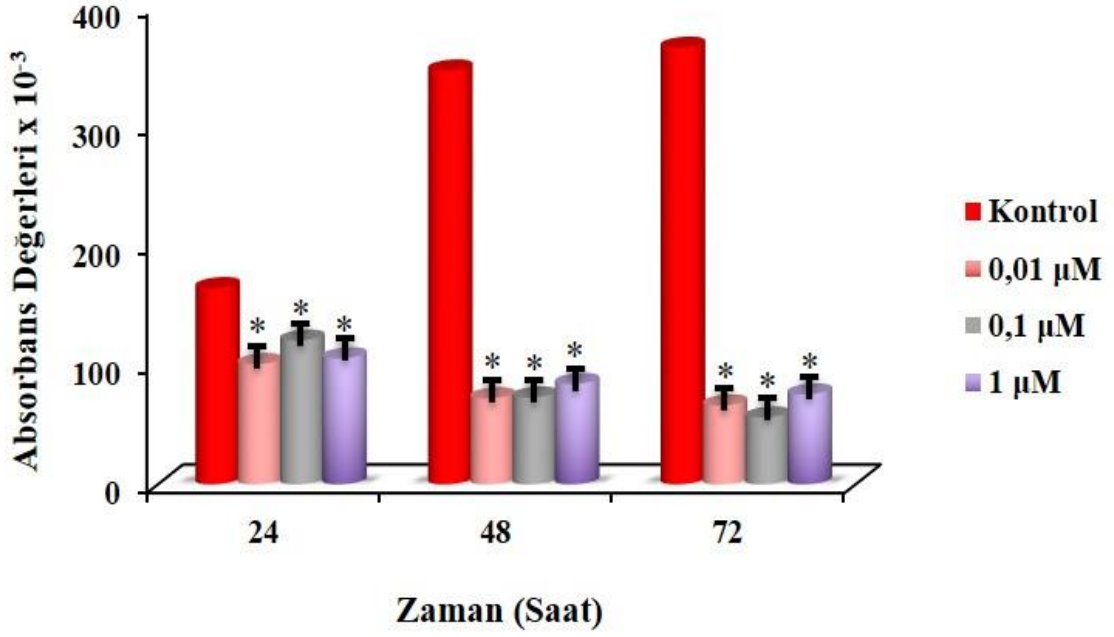
Şekil 4.3: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,5 μM , 1 μM ve 5 μM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrolle göre anlamlı $p<0.05$).



Şekil 4.4: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,5 μM, 1 μM ve 5 μM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait % canlılık değerleri (Kontrole göre anlamlı $p < 0.05$).

Tablo 4.3: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,01 μM, 0,1 μM ve 1 μM DTX uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (*Kontrole göre anlamlı $p < 0.05$).

Zaman (saat)	Absorbans Değerleri (450-690 nm)			
	Kontrol	0,01 μM	0,1 μM	1 μM
24	$164,25 \times 10^{-3} \pm 0,013^{SD}$	$100,6 \times 10^{-3} \pm 0,011^*$	$120,33 \times 10^{-3} \pm 0,012^*$	$105,5 \times 10^{-3} \pm 0,011^*$
48	$346,4 \times 10^{-3} \pm 0,015^{SD}$	$72 \times 10^{-3} \pm 0,012^*$	$72,67 \times 10^{-3} \pm 0,011^*$	$84 \times 10^{-3} \pm 0,007^*$
72	$365,5 \times 10^{-3} \pm 0,014^{SD}$	$66 \times 10^{-3} \pm 0,007^*$	$56 \times 10^{-3} \pm 0,009^*$	$75,25 \times 10^{-3} \pm 0,008^*$



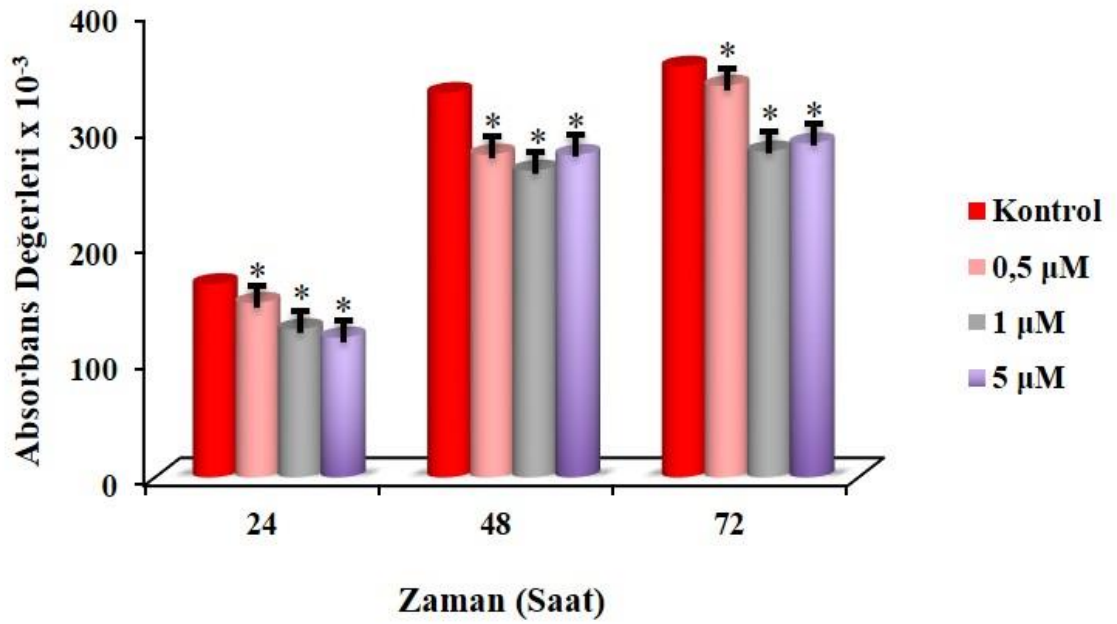
Şekil 4.5: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,01 µM, 0,1 µM ve 1 µM DTX uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (*Kontrole göre anlamlı p<0.05).



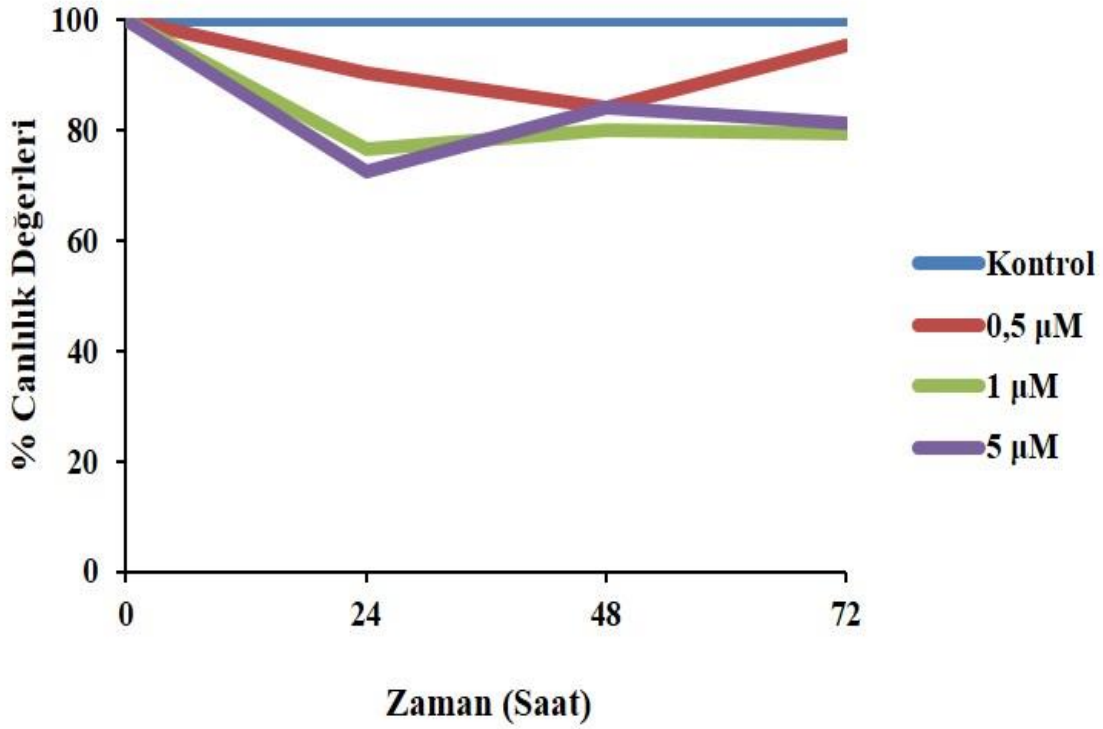
Şekil 4.6: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,01 µM, 0,1 µM ve 1 µM DTX uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait % canlılık değerleri (Kontrole göre anlamlı p<0.05).

Tablo 4.4: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,5 μM , 1 μM ve 5 μM FH535 uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (Kontrole göre anlamlı $p < 0.05$).

Zaman (saat)	Absorbans Değerleri (450-690 nm)			
	Kontrol	0,5 μM	1 μM	5 μM
24	$166,33 \times 10^{-3} \pm 0,014^{\text{SD}}$	$150,25 \times 10^{-3} \pm 0,007^*$	$127,5 \times 10^{-3} \pm 0,006^*$	$120,33 \times 10^{-3} \pm 0,005^*$
48	$330,8 \times 10^{-3} \pm 0,015^{\text{SD}}$	$277,8 \times 10^{-3} \pm 0,007^*$	$264 \times 10^{-3} \pm 0,012^*$	$277,5 \times 10^{-3} \pm 0,007^*$
72	$353,5 \times 10^{-3} \pm 0,012^{\text{SD}}$	$337 \times 10^{-3} \pm 0,011^*$	$280,5 \times 10^{-3} \pm 0,012^*$	$287,5 \times 10^{-3} \pm 0,009^*$



Şekil 4.7: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,5 μM , 1 μM ve 5 μM FH535 uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (* Kontrole göre anlamlı $p < 0.05$).

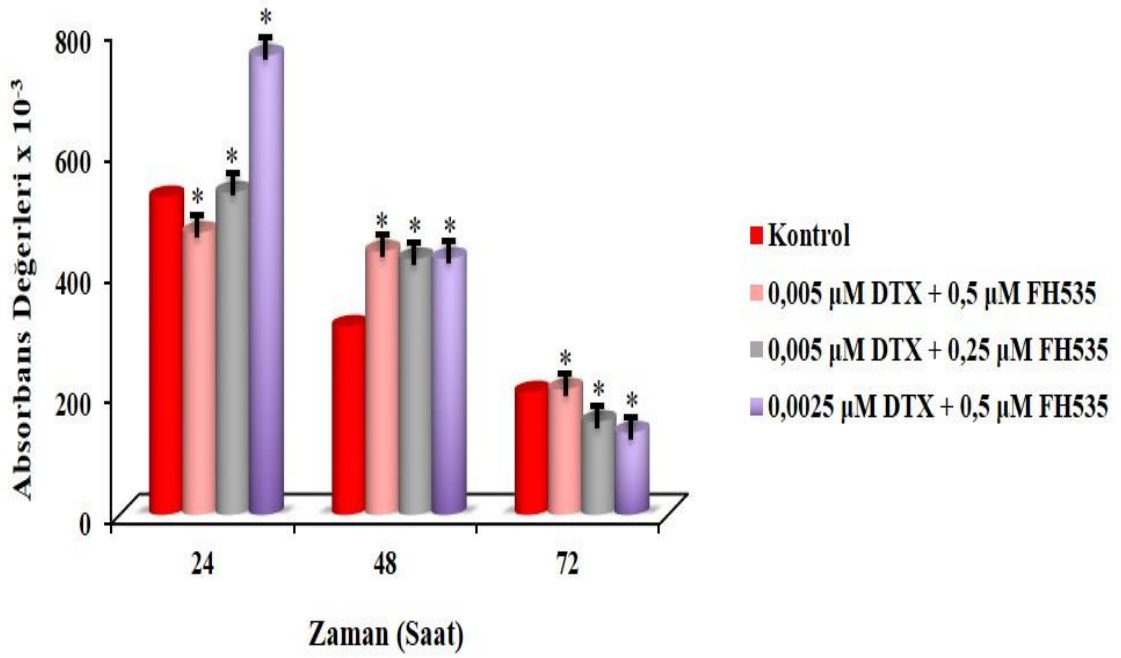


Şekil 4.8: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,5 μM, 1 μM ve 5 μM FH535 uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait canlılık değerleri (Kontrole göre anlamlı $p < 0.05$).

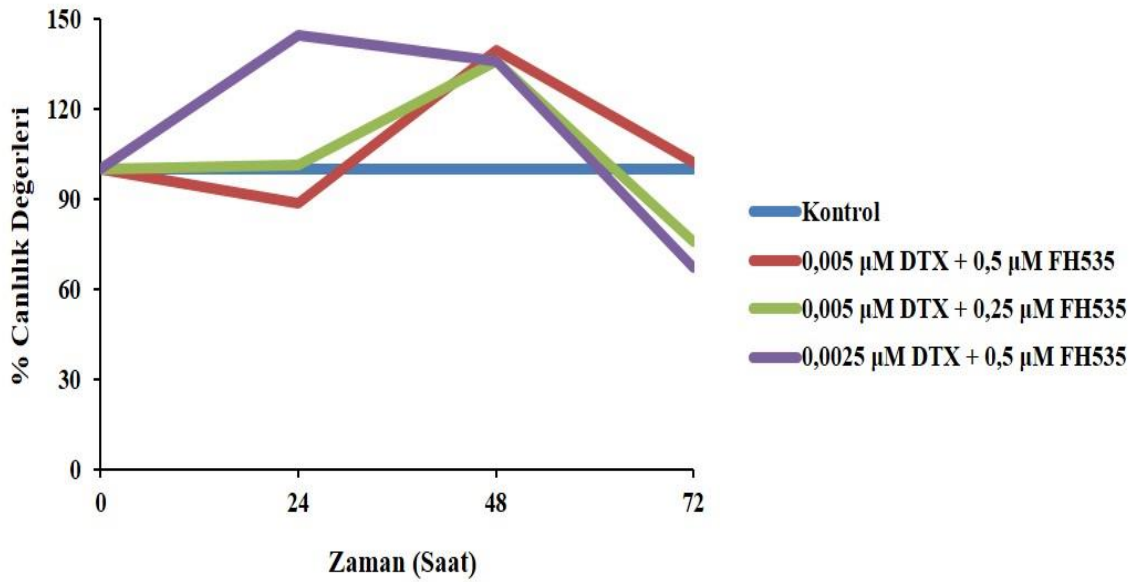
Kanser hücresinde istenilen hücre ölümünü/antiproliferatif etkiyi gösterirken sağlıklı hücreye minimum zararı veren etkin kombin dozların tespiti için iki hücre hattına da 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535; 0,0025 μM DTX+0,5 μM FH535 ve 0,005 μM DTX+0,25 μM FH535 kombin dozları uygulanmıştır ve elde edilen veriler ışığında gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde uygulama yapılacak olan dozlar belirlenmiştir. Uygulama yapılmayan kontrol grubu ve deney grubu ile birlikte yürütülen deneylerden elde edilen veriler Tablo 4.5, Tablo 4.6, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de gösterilmiştir.

Tablo 4.5: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535; 0,0025 μM DTX+0,5 μM FH535 ve 0,005 μM DTX+0,25 μM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (*Kontrole göre anlamlı $p < 0.05$).

Zaman (saat)	Absorbans Değerleri (450-690 nm)			
	Kontrol	0,005 μM DTX + 0,5 μM FH535	0,005 μM DTX + 0,25 μM FH535	0,0025 μM DTX + 0,5 μM FH535
24	$525 \times 10^{-3} \pm 0,016^{SD}$	$466 \times 10^{-3} \pm 0,017^*$	$532,5 \times 10^{-3} \pm 0,013^*$	$758 \times 10^{-3} \pm 0,013^*$
48	$311,33 \times 10^{-3} \pm 0,015^{SD}$	$435 \times 10^{-3} \pm 0,016^*$	$422,5 \times 10^{-3} \pm 0,017^*$	$423 \times 10^{-3} \pm 0,014^*$
72	$202,5 \times 10^{-3} \pm 0,011^{SD}$	$207 \times 10^{-3} \pm 0,012^*$	$153,5 \times 10^{-3} \pm 0,011^*$	$136 \times 10^{-3} \pm 0,011^*$



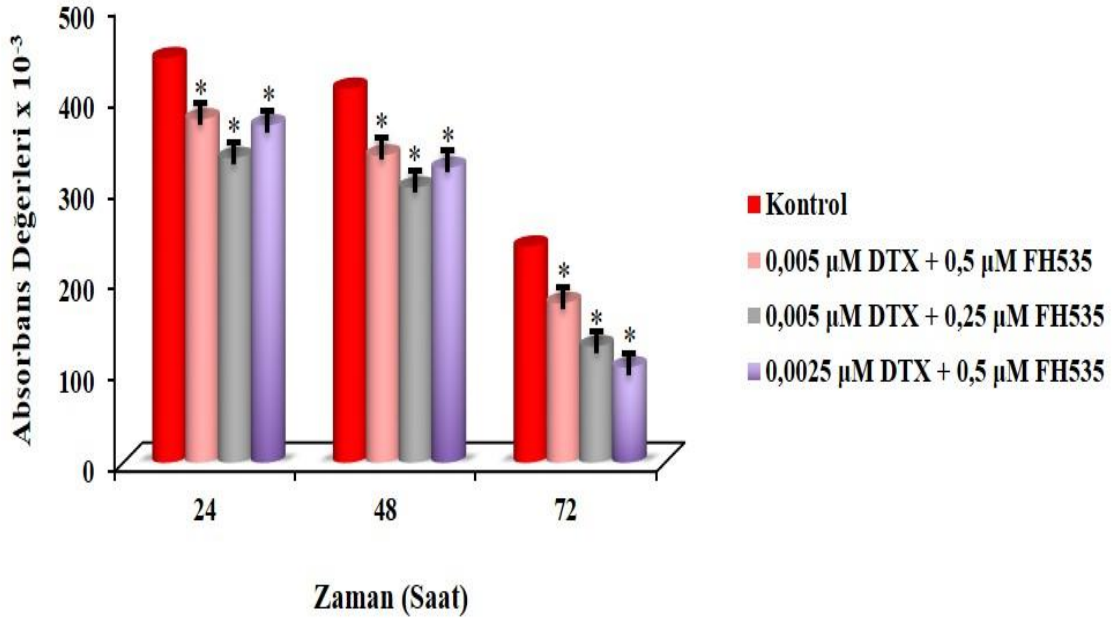
Şekil 4.9: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535; 0,0025 µM DTX+0,5 µM FH535 ve 0,005 µM DTX+0,25 µM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (*Kontrole göre anlamlı p<0.05).



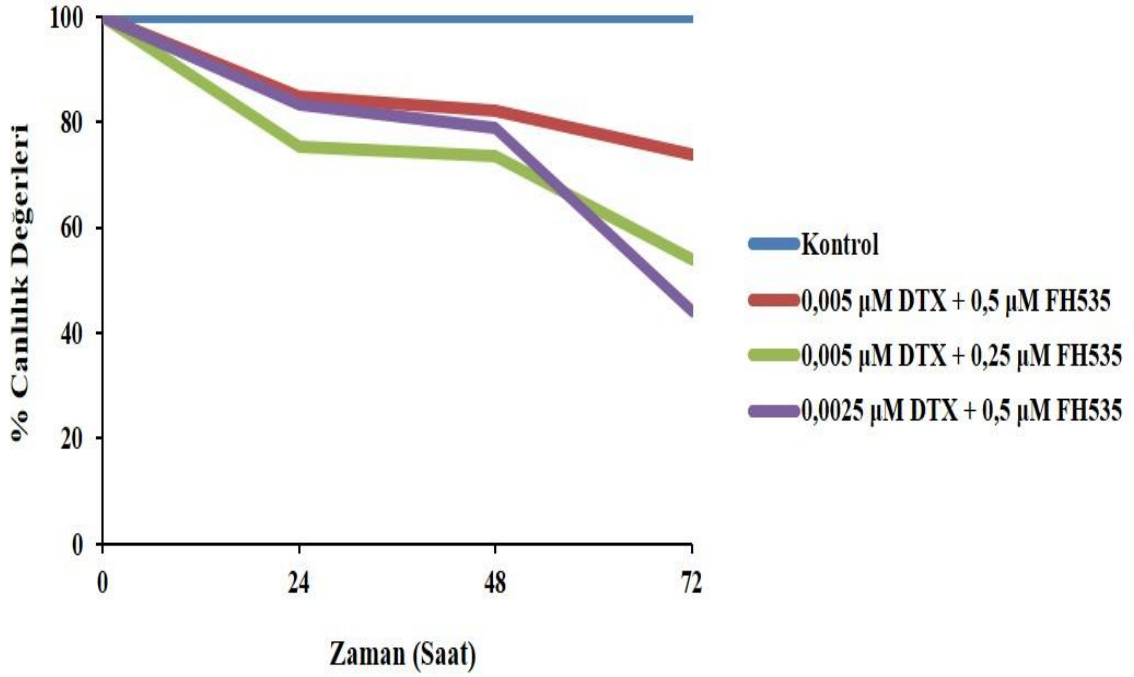
Şekil 4.10: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535; 0,0025 µM DTX+0,5 µM FH535 ve 0,005 µM DTX+0,25 µM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait canlılık değerleri (Kontrole göre anlamlı p<0.05).

Tablo 4.6: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535; 0,0025 μM DTX+0,5 μM FH535 ve 0,005 μM DTX+0,25 μM FH535 uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (*Kontrolle göre anlamlı $p<0.05$).

Zaman (saat)	Absorbans Değerleri (450-690 nm)			
	Kontrol	0,005 μM DTX + 0,5 μM FH535	0,005 μM DTX + 0,25 μM FH535	0,0025 μM DTX + 0,5 μM FH535
24	443,5x10 ⁻³ ±0,013 ^{SD}	376,33x10 ⁻³ ±0,014*	334x10 ⁻³ ± 0,015*	369,67x10 ⁻³ ±0,016*
48	410x10 ⁻³ ±0,013 ^{SD}	336,67x10 ⁻³ ±0,015*	301,5x10 ⁻³ ±0,013*	323x10 ⁻³ ±0,015*
72	237x10 ⁻³ ± 0,012 ^{SD}	175x10 ⁻³ ±0,011*	127,5x10 ⁻³ ±0,014*	104,5x10 ⁻³ ±0,009*



Şekil 4.11: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535; 0,0025 μM DTX+0,5 μM FH535 ve 0,005 μM DTX+0,25 μM FH535 uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait mitokondriyal dehidrogenaz enzim aktivitesi değerleri (450-690 nm) (*Kontrolle göre anlamlı $p<0.05$).

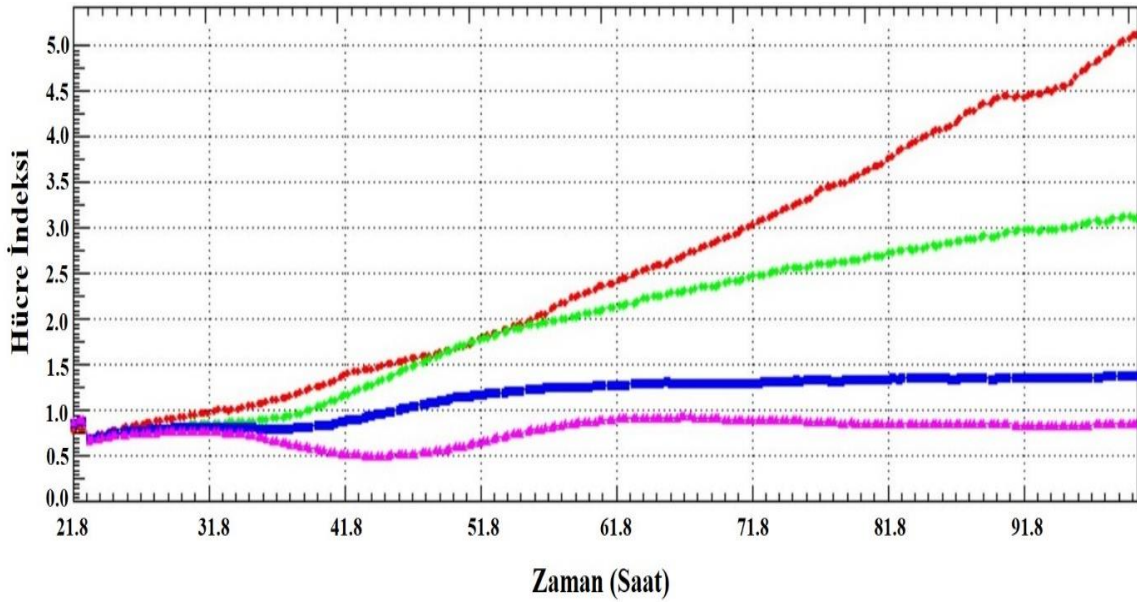


Şekil 4.12: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535; 0,0025 µM DTX+0,5 µM FH535 ve 0,005 µM DTX+0,25 µM FH535 uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait % canlılık değerleri (Kontrole göre anlamlı $p < 0.05$).

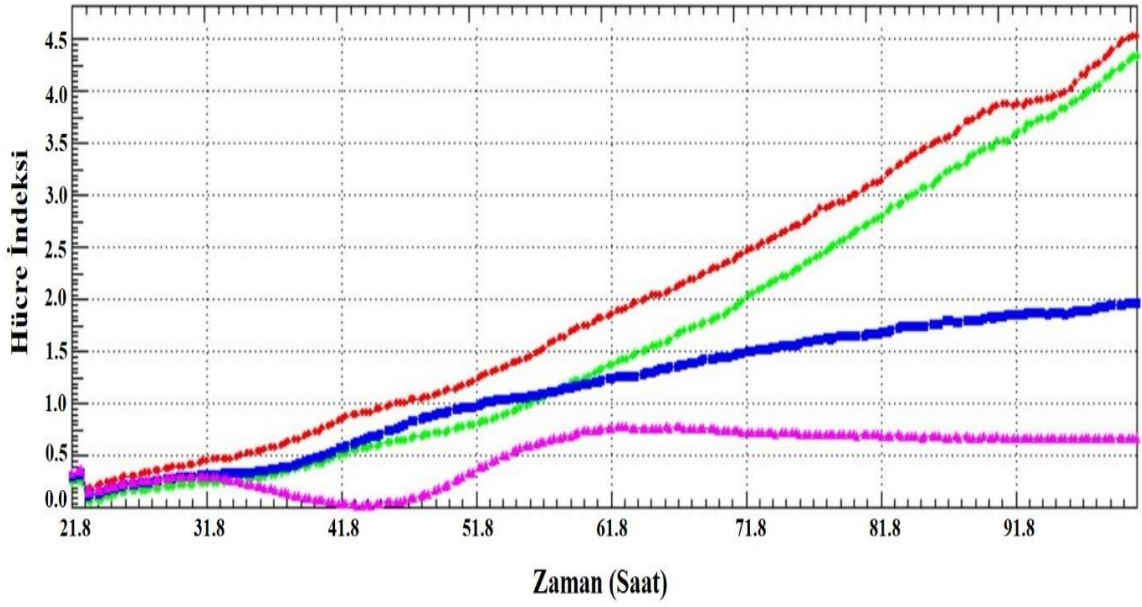
4.2. xCELLigence DP GERÇEK ZAMANLI HÜCRE ANALİZİ (RTCA) BULGULARI

Mümkün olan en düşük dozların IC_{50} etkisini vermesi, kanser tedavisinde hastaya minimum dozlarda ilaç etkeninin verilmesi ve dolayısıyla yan etki, vücuda kimyasal madde alınımı ve sağlıklı dokuya minimal etki göstermesi bakımından önemli bir avantajdır. Bu sebepten ötürü DTX'in verdiği yan etkiyi minimuma indirmek amacıyla kanser hücresinin canlılığını inhibe etmede en çok etkiyi gösteren ve buna karşılık sağlıklı hücreye minimum zararı veren dozların yarı dozlarıyla, FH535'in kanser hücresinin canlılığını azaltıcı etki gösterirken sağlıklı hücreye en az zarar veren dozlarının kombinasyonları gerçek zamanlı hücre analiz sisteminde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Her iki hücre hattında 100 saat boyunca 15 dk aralıklarla ölçüm yapılmıştır. A549 hücre hattında 1 µM DTX, 5 µM DTX, 10 µM DTX, 10 µM FH535, 20 µM FH535, 30 µM FH535, 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 kombinasyonu; BEAS-2B hücre hattında ise 0,1 µM DTX, 1 µM DTX, 5 µM DTX, 0,5 µM FH535, 30 µM FH535, 40 µM FH535 ve 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 kombinasyonu denenmiştir. BEAS-2B hücre hattına verdiği zarar literatürde yer aldığından dolayı 5 µM DTX dozundan fazlası denenmemiştir.

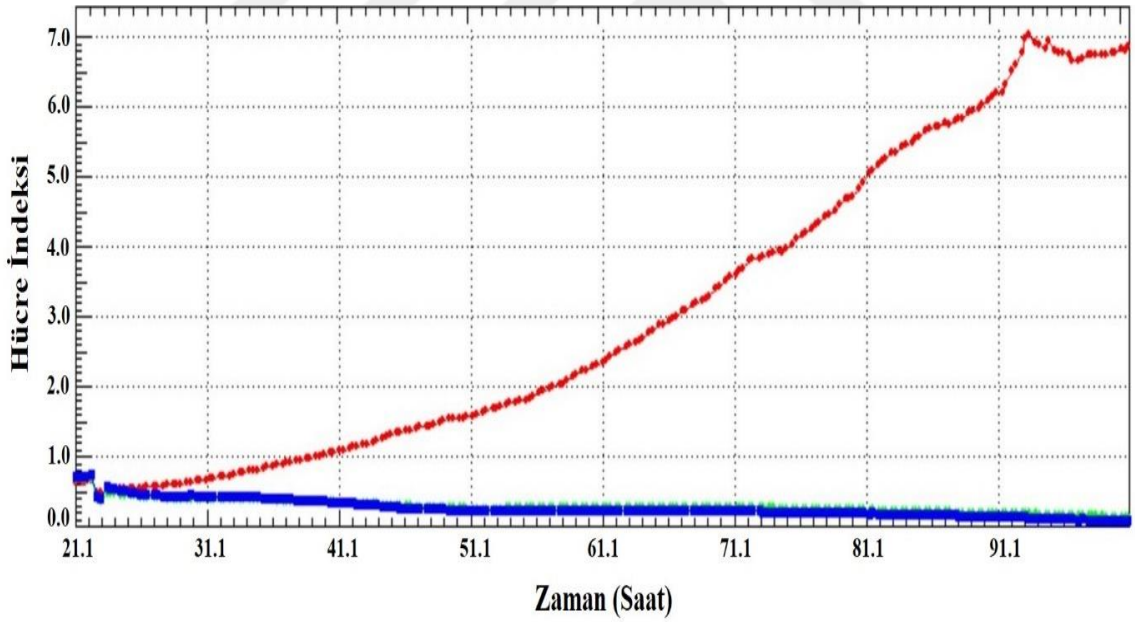
A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda, sağlıklı akciğer hücresi olan BEAS-2B'ye minimal zararlı etkiyi gösterirken kanser hücre hattı olan A549'da hücre indeksi kapsamında en fazla etkiyi gösteren dozun olan 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535 kombinasyonundan oluşan doz olduğu ve bu dozun kanser hücresi üzerinde anti-mitotik etki gösterdiği belirlenmiştir. Uygulama yapılmayan kontrol grubu ve deney grubu ile birlikte yürütülen deneylerden elde edilen veriler Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 17 ve Şekil 18'de gösterilmiştir.



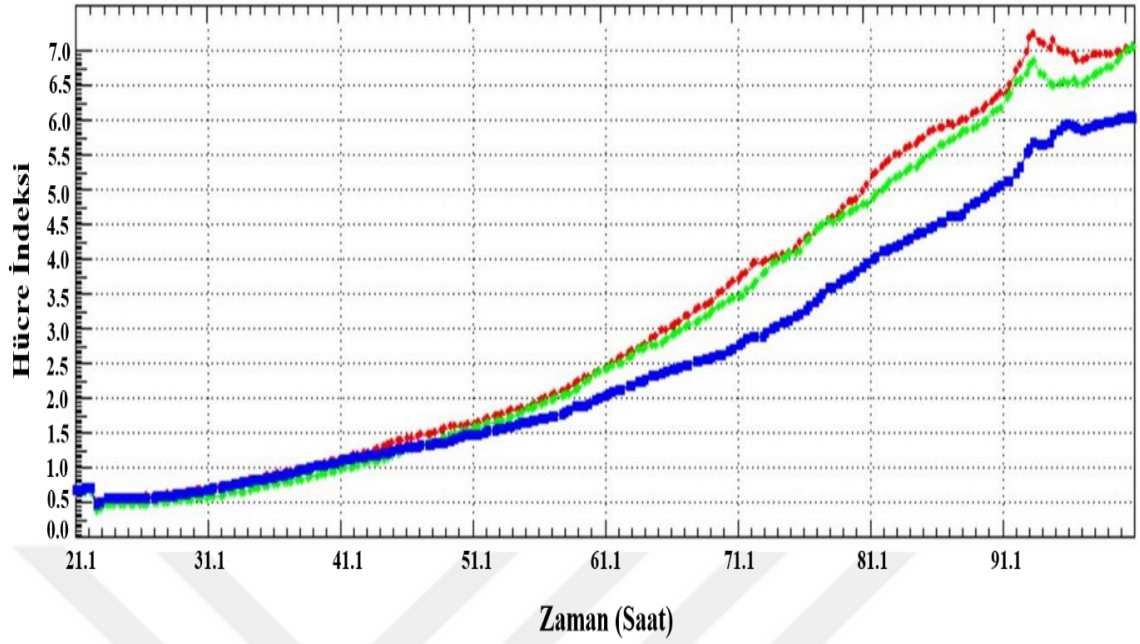
Şekil 4.13: 100 saat boyunca uygulanan 1 μM , 5 μM ve 10 μM DTX uygulanan A549 hücresine ait gerçek zamanlı hücre analiz verileri grafiği (---Kontrol, ---1 μM DTX, ---5 μM DTX, ---10 μM DTX).



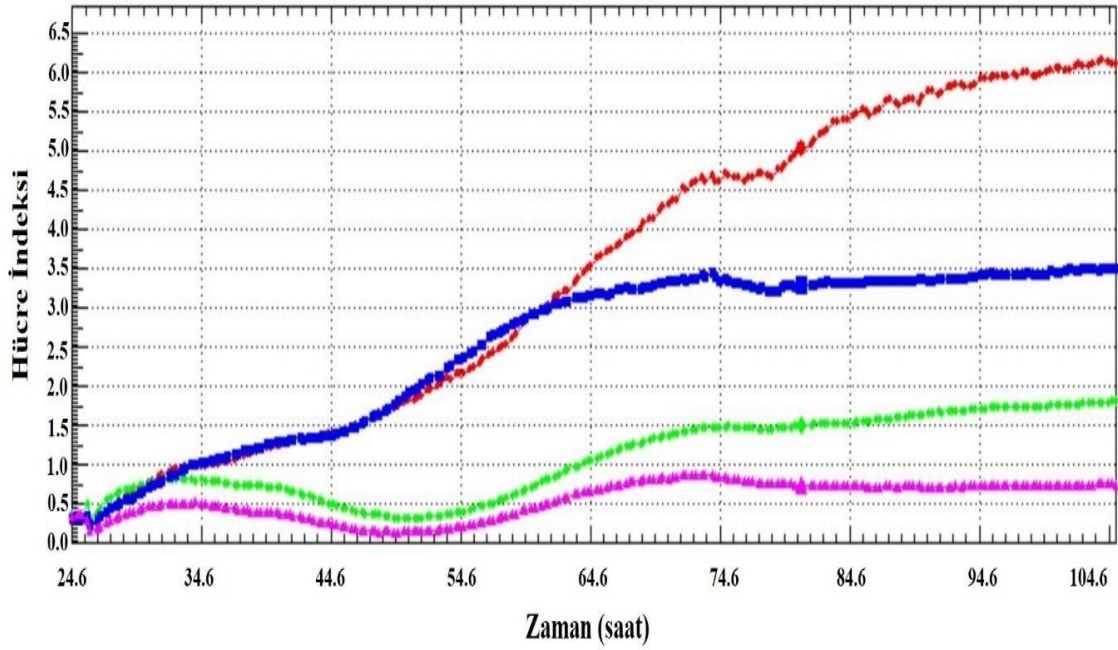
Şekil 4.14: 100 saat boyunca 10 μM , 20 μM ve 30 μM FH535 uygulanan A549 hücresine ait gerçek zamanlı hücre analiz verileri grafiği (---Kontrol, ---10 μM FH535, ---20 μM FH535 ve ---30 μM FH535).



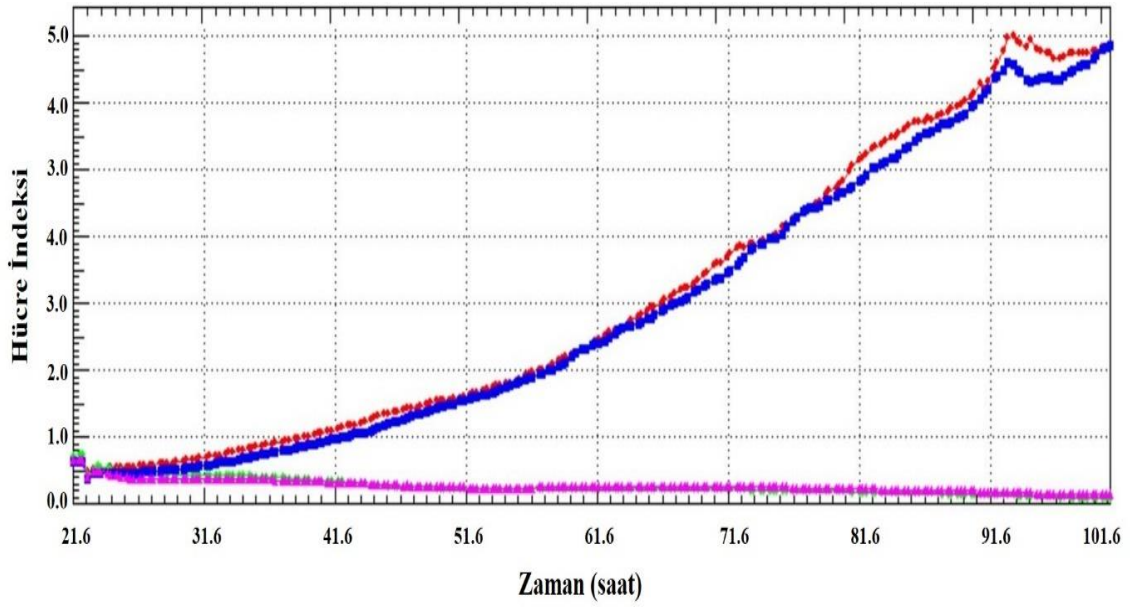
Şekil 4.15: 100 saat boyunca 1 μM ve 5 μM DTX uygulanan BEAS-2B hücresine ait gerçek zamanlı hücre analiz verileri grafiği (---Kontrol, ---1 μM DTX, ---5 μM DTX).



Şekil 4.16: 100 saat boyunca 30 µM ve 40 µM FH535 uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre analiz verileri grafiği (---Kontrol, ---30 µM FH535, --- 40 µM FH535).



Şekil 4.17: 100 saat boyunca 0,1 µM DTX, 0,5 µM FH535 ve 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 kombin doz uygulanan uygulanan A549 hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre analiz verileri grafiği (---Kontrol, --- 0,1 µM DTX, --- 0,5 µM FH535, --- 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535).



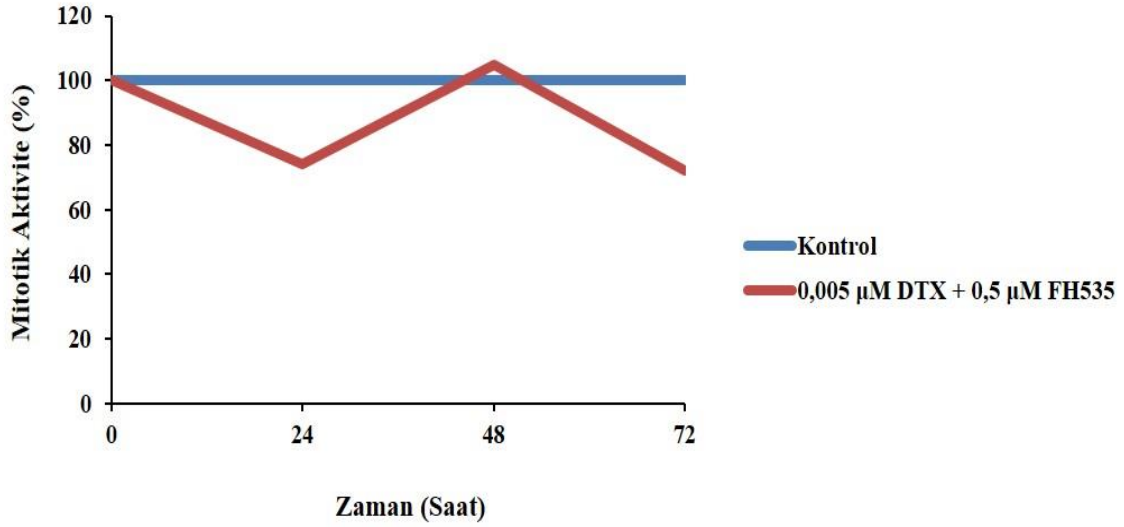
Şekil 4.18: 100 saat boyunca 0,1 µM DTX, 0,5 µM FH535 ve 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 kombin doz uygulanan BEAS-2B hücrelerine ait gerçek zamanlı hücre analiz verileri grafiği (-Kontrol, - 0,1 µM DTX, -0,5 µM FH535, - 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535).

4.3. MİTOTİK AKTİVİTE ANALİZİ BULGULARI

xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizinden elde edilen bulgular ışığında belirlenen 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 kombinasyon dozunun mitotik aktivite bulguları hücreler üzerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Uygulanan kombin dozun mitotik aktiviteyi 24 ve 72 saatlerde düşürdüğü; 48 saatte mitotik aktiviteyi kontrol grubunun da üzerinde bir değerle artırarak hücreyi mitotik katastrofi yoluyla ölüme götürdüğü görülmüştür. Mitotik tutuklanma olarak bilinen bu etki, A549 hücre hattında 48 saatte görülmektedir. Uygulama yapılmayan kontrol grubu ve deney grubu ile birlikte yürütülen deneylerden elde edilen veriler Tablo 4.7, ve Şekil 4.17’de gösterilmiştir.

Tablo 4.7: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait mitotik aktivite değerleri (450-655 nm) (*Kontrole göre anlamlı p<0.05).

Zaman (saat)	Absorbans Değerleri (450-655 nm)	
	Kontrol	0,005 µM DTX + 0,5 µM FH535
24	89 x10 ⁻³ ±0,003 ^{SD}	66 x10 ⁻³ ±0,001*
48	20 x10 ⁻³ ±0,002 ^{SD}	21 x10 ⁻³ ±0,002*
72	12,5 x10 ⁻³ ±0,001 ^{SD}	9 x10 ⁻³ ±0,001*



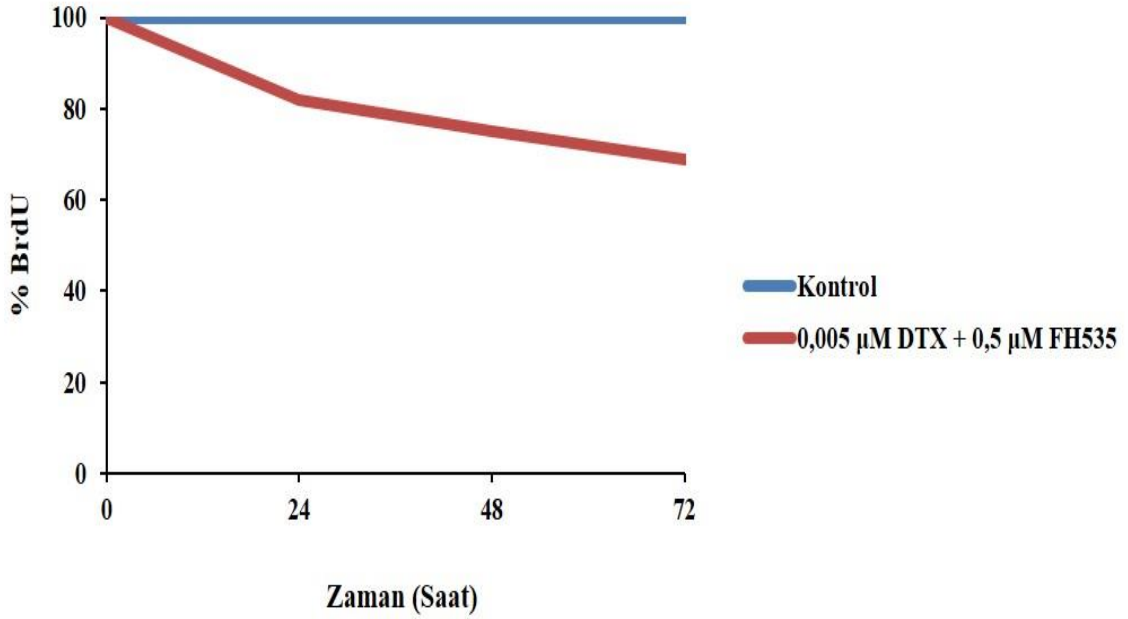
Şekil 4.19: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait % mitotik aktivite değerleri (Kontrolle kıyasla anlamlı p<0.05).

4.4. BrdU HÜCRE PROLİFERASYON ANALİZİ BULGULARI

Mitotik aktivite bulguları sonucunda, hücre döngüsünün sentez fazında 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 kombinasyon dozunun etkisi BrdU hücre proliferasyon analiziyle belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla 24, 48 saatlerde ve en belirgin şekilde 72 saatte BrdU aktivitesinde meydana gelen düşüşün, mitotik aktivite bulgularıyla değerlendirildiğinde hücrelerin hücre siklusunun sentez fazında, hücre sayısında azalma yaşadığı dolayısıyla mitotik katastrofa gittiği fikrimizi desteklemektedir. Uygulama yapılmayan kontrol grubu ve deney grubu ile birlikte yürütülen deneylerden elde edilen veriler Tablo 4.8 ve Şekil 4.18’de gösterilmiştir.

Tablo 4.8: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait BrdU aktivitesi değerleri (450-550 nm) (*Kontrolle göre anlamlı p<0.05).

Zaman (saat)	Absorbans Değerleri (450-550 nm)	
	Kontrol	0,005 µM DTX + 0,5 µM FH535
24	66 x10 ⁻³ ±0,001 ^{SD}	54 x10 ⁻³ ±0,003*
48	12 x10 ⁻³ ±0,002 ^{SD}	9 x10 ⁻³ ±0,001*
72	14,5 x10 ⁻³ ±0,001 ^{SD}	10 x10 ⁻³ ±0,001*



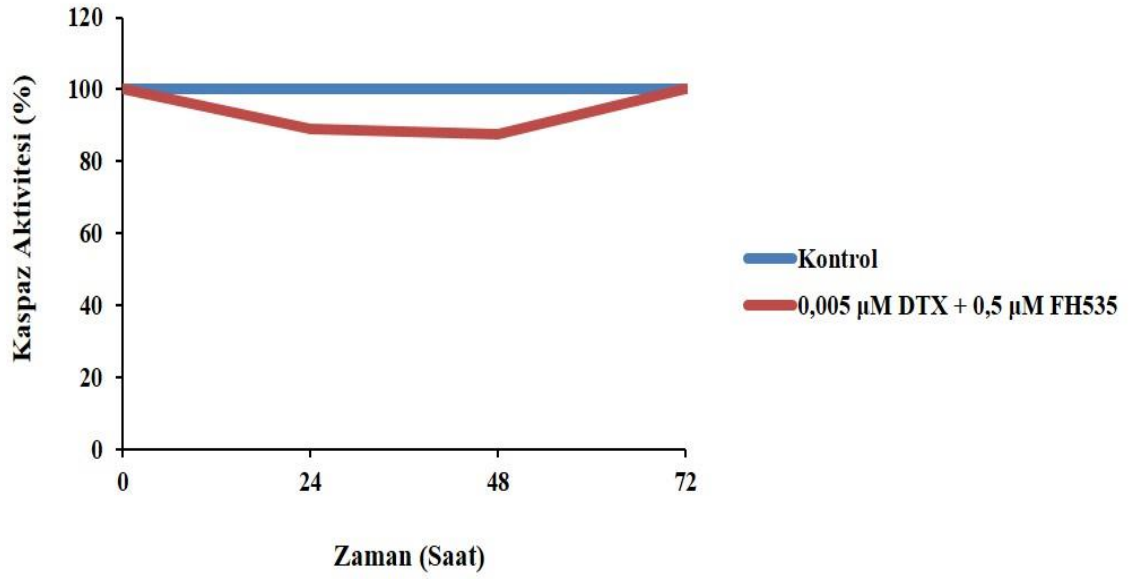
Şekil 4.20: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait % BrdU aktivite değerleri (Kontrole göre anlamlı p<0.05).

4.5. KASP AZ 3,7 AKTİVİTESİ ANALİZİ BULGULARI

0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 kombinasyon dozunun hücre ölümünün mitotik katastrof yoluyla olduğu fikrini desteklemek ve apoptotik yolda bir aktivite olup olmadığını dolayısıyla kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin aktivitesinin artıp artmadığını belirlemek amacıyla yapılan kaspaz 3,7 aktivitesi bulguları incelenmiştir. Kombin doz uygulamasını takiben 24, 48 ve 72 saatlerde cellat kaspazlar olan apoptotik ölüm yolağının var olup olmadığını belirten kaspaz 3,7 aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. Bu sonuç, kanser hücrelerinin, belirlenen kombin doz ile var olan hücre ölümünün apoptotik yol ile olmadığını göstermiştir. Uygulama yapılmayan kontrol grubu ve deney grubu ile birlikte yürütülen deneylerden elde edilen veriler Tablo 4.9 ve Şekil 4.19'da gösterilmiştir.

Tablo 4.9: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait kaspaz 3,7 aktivite değerleri (490-520 nm) (*Kontrole göre anlamlı $p<0.05$).

Zaman (saat)	Floresans Değerleri (490-520 nm)	
	Kontrol	0,005 μM DTX + 0,5 μM FH535
24	174 \pm 11 ^{SD}	155 \pm 13*
48	144,5 \pm 14 ^{SD}	126,67 \pm 12*
72	165 $\times 10^{-3}$ \pm 15 ^{SD}	165,25 \pm 16*



Şekil 4.21: 24, 48 ve 72 saat süresince 0,005 μM DTX+0,5 μM FH535 uygulanan A549 hücrelerine ait % kaspaz 3,7 aktivite değerleri (Kontrole göre anlamlı $p<0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser, mortalite oranı bakımından Dünya’da ve Türkiye’de ikinci sırada yer alan bir hastalıktır (Özgül ve diğ., 2009). 2022 yılının sonunda Amerika Birleşik Devletleri’nde 2 milyona yakın yeni kanser vakası ve 1 milyon kanser ölümünün gerçekleşeceği tahmin edilmektedir. Yapılan istatistiksel veriler göstermiştir ki kanserin tanısı, prognozu ve tedavisinde kullanılan yöntemler, klinik açıdan yetersiz kalmaktadır. Kanser hastalığının moleküler mekanizmasının heterojen yapıda olması, hastalığa neden olan mekanizmanın tam anlamıyla aydınlatılamamış olması ve dolayısıyla tedavi yöntemlerinin kısıtlılığı, pahalılığı ve toksisitesi gibi etmenler kanser gelişimini engelleme ve kanseri tedavi etme konusunda araştırmacıları ve klinisyenleri zorlamaktadır. Bunun yanı sıra KHDAK’de semptomlar hastalık ilerledikten sonra kendini gösterdiği için gecikmiş tanı nedeniyle hastalar cerrahi tedavi şansı bulamamaktadır (Jemal ve diğ., 2011). Tanı koyulduktan sonra dahi KHDAK birinci evre hastalarının sadece %2-5’lik kısmında cerrahi, bir tedavi şansı olarak görülmektedir (Jett ve diğ., 2013). Bu sorunu ortadan kaldırmak için yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Akciğer kanserinin moleküler mekanizmasında rol oynayan hücresel yolların bilinmesi ve bu yolların aktivasyon ve inhibisyon mekanizmalarını hedefleyerek tedavide yeni yöntemlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir (Larsen ve Minna, 2011). Kanser tedavisi yöntemlerinden biri olan hedefe yönelik tedavi, hedeflenen kanser dokusu için uygulanan madde, ilaç, kombine ilaç ve benzeri çalışmalarla sağlıklı doku hücrelerine verilecek minimum zararın yanı sıra kanser hücrelerinin ölümüne sebep olacak ilaçlar ve tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (Baran, 2018). Bu kapsamda akciğer kanserinin alt tiplerinden biri olan ve klinik vaka oranı bakımından diğer akciğer kanseri tiplerine göre daha fazla insidansa sahip olduğu bilinen KHDAK’de çeşitli hedefe yönelik tedavi yöntemleri üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Molina ve diğ., 2016).

Bu çalışmada KHDAK başta olmak üzere kanser tedavisinde kullanılan DTX ve KHDAK’de aşırı aktive gösterdiği bilinen WNT sinyal yolağı inhibitörü olan FH535’in kombin halde kullanımının adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyum hücresi A549 ve sağlıklı bronşiyal epitel hücresi BEAS-2B hücre hatları üzerindeki etkilerinin MTT, gerçek zamanlı hücre analizi ile değerlendirilip A549 kanser hücresinin aktivitesi azaltırken BEAS-2B sağlıklı akciğer hücresinde minimum zararı gösteren kombin dozun belirlenerek kanser hücresinde

mitotik aktivite analizi, BrdU hücre proliferasyon analizi ve kaspaz 3-7 aktivite analizi yöntemleriyle *in vitro* koşullarda hücresel seviyede meydana getireceği etkilerin araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda sağlıklı olan akciğer hücresine minimum zararı verirken; KHDAK hücresinde antiproliferatif etkiyi gösteren dozun belirlenmesiyle birlikte mevcut tedavi protokollerine ek yeni tedavi protokollerinin oluşturulması hedeflenmiştir.

WNT sinyal yolağı, hücre proliferasyonu, sağ kalımı ve farklılaşması gibi pek çok hücresel süreçte önemli rol oynamaktadır. Bu yolda meydana gelen bozuklukların, kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkların patogeneziyle ilişkili olduğu yapılan birçok çalışmayla da desteklenmiştir (L'Episcopo ve diğ., 2012; Liu ve diğ., 2014; Chua ve diğ., 2015). Bu çalışmalardan birinde, KHDAK hücre hatlarının çoğunda aktif WNT sinyalizasyonu veya *WNT-1*'in aşırı ekspresyonu görülmüştür (He ve diğ., 2004; Licchesi ve diğ., 2008; Akiri ve diğ., 2009; Teng ve diğ., 2010). Bu sinyal yolağının hücre proliferasyonu, hareketi gibi hücresel süreçlerde etkin rol alması ve dolayısıyla bu süreçlerin homeostazının bozulmasına sebep olacak herhangi bir etkenin karsinogenezi de etkileyebileceği düşünülmektedir. WNT sinyalizasyonunda meydana gelen bozukluğun kolon, akciğer, meme, tiroit, prostat ve kan kanseri gibi çeşitli kanserlerin oluşumunda etkili olduğunu gösterilmiştir (Jass ve diğ., 2003; Yardy ve Brewster, 2005; Turashvili ve diğ., 2006; Mikesch ve diğ., 2007; Thompson ve Monga, 2007). A549, H1703, H460 ve H838 KHDAK hücre hatları ile yapılan bir çalışmada, WNT-1 proteininin bu hücre hatlarında aşırı eksprese olduğu ve bu proteinlerin ekspresyonu inhibe edildiğinde hücrelerin apoptotik ölüm yoluna girdiği gösterilmiştir (He ve diğ., 2004). KHDAK'de WIF-1'in susturulmasının hastalık patogenezi WNT sinyal yolağının anormal aktivasyonunun önemli bir mekanizma olduğunu göstererek bu yolak ve KHDAK ilişkisini açıklayan araştırma grubu, bunun yanı sıra bu yolda rol alan Dvl proteininin KHDAK'de aşırı eksprese edildiği ve akciğer kanserinde aktif rol aldığı bilinen Rac ve Rho proteinleriyle de ilişki kurduğunu ve dolayısıyla akciğer kanseri patogenezi WNT sinyal yolağının etkin olabileceğini göstermiştir (Mazieres ve diğ., 2004; Mazieres ve diğ., 2005). Tüm bunların yanı sıra, WNT sinyal yolağı antagonistlerinden WIF-1'in plazmid vektör yardımıyla A549 ve H460 akciğer kanseri hücre hatlarına transfekte edildiğinde ve H460 tümör ksenografts nude farelere enjekte edildiğinde hücre büyümesinin inhibe olduğu da gösterilmiştir (Kim ve diğ., 2007).

WNT sinyal yolağının KHDAK'de aşırı aktive olması, araştırmacıları bu aktivasyonu inhibe edecek yollar veya moleküller keşfetmeye yönlendirmiştir. Bu amaçla çeşitli WNT sinyal

yolağı inhibitörleri keşfedilmiştir. Bu inhibitörlerden FH535 adı verilen spesifik β -katenin inhibitörü, β -katenin alınımı baskılayarak β -katenin/TCF'nin aracılık ettiği transkripsiyonu antagonize eder (Handeli ve Simon, 2008). Yapılan çalışmalarda, FH535'in hepatoselüler karsinoma kök hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği, glioma oluşumunda etkili olduğu, mide kanseri hücrelerinin proliferasyonunu engellediği, miyeloid lösemi hücre hatlarında programlı hücre ölümünü arttırdığı, pankreas kanserinde hücre sayısını azalttığı, osteosarkomada hücre büyümesini inhibe ettiği, kolon kanseri hücre hatları olan HT29 ve SW480 üzerinde anjiyogenezi baskıladığı, hepatoselüler karsinoma hücrelerinde siklin D1'in ekspresyonunu azaltarak apoptozu indüklediği görülmüştür (Liu ve diğ., 2016; Tomizawa ve diğ., 2016; Gustafson ve diğ., 2017; Suknuntha ve diğ., 2017; Chen ve diğ., 2017; Liu ve diğ., 2018; Huo ve diğ., 2019; Qian ve diğ., 2019). FH535'in WNT sinyal yolağında hangi mekanizma ile inhibisyon sağladığı henüz bilinmemektedir. Osteosarkomada FH535 kullanılarak yapılan bir çalışmada, FH535'in WNT sinyal yolunu telomerik tekrar bağlama faktörü 1'in DNA'ya bağlanmasını engelleyen tankiraz 1/2 (TNKS1/2) enzimlerini inhibe ederek sağladığını, dolayısıyla inhibitörün etkisini gösterebilmek için kullandığı mekanizmalardan birinin bu olduğunu açığa çıkarılmıştır (Gustafson ve diğ., 2017). Mide kanseri hücre hattı olan MKN45 üzerinde FH535'in hücrelerde büzülme etkisi oluşturduğu, hücre yoğunluğunu azaltarak hücre ölümüne sebebiyet verdiği görülmüştür (Chen ve diğ., 2022). Lösemide WNT sinyal yolağının etkilerini araştırmak amacıyla K562, HL60, THP1 ve Jurkat hücre hatlarında çeşitli WNT sinyal yolağı inhibitörleri denenmiştir. WNT sinyal yolağı inhibitörlerinden AV939, IWP2 ve FH535'in karşılaştırılmalı olarak hücrelere verilmesiyle en etkili WNT sinyal yolağı baskılayıcısının FH535 olduğu ve lösemide kullanılacak bir ajan olduğu gösterilmiştir (Suknuntha ve diğ., 2017). WNT/ β -katenin yolağının aktivasyonu, hepatoselüler karsinomların en az 1/3'ünde gözlemlendiği için bu yolun inhibisyonuyla hepatoselüler karsinomu tedavi etmek için yeni bir yöntem arayışında olan araştırmacılar, β -katenin yolunu bloke ettiği gösterilen FH535'in, karaciğer kanseri kök hücrelerini ve hepatoselüler karsinom hücre hatlarını çoğalmasını inhibe edip edemeyeceğini belirlemek için yaptıkları çalışmada *siklin D1* ve *survivinin* ekspresyonunun azaldığını göstermişlerdir (Gedaly ve diğ., 2014). Bu inhibitörün hepatoselüler karsinomadaki etkisini inceleyen bir başka çalışmada, HepG2 hücrelerinin FH535 ile tedavisi sonucunda, hücrelerin proliferasyonunun inhibe olduğu ve bu inhibisyonun β -katenin proteininin ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili olduğu görülmüştür (Liu ve diğ., 2014). FH535'i göç, invazyon ve büyüme dahil olmak üzere

malign meme kanseri hücrelerinin için potansiyel bir inhibitör olup olamayacağını araştırıldığı bir çalışmada, *in vitro* olarak üçlü negatif meme kanseri hücre hatları olan MDA-MB231 ve HCC38'in büyümesini, göçünü ve invazyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği gösterilmiştir (Iida, ve diğ., 2012). Kolorektal kanserde ise DLD-1 ve SW620 hücre hatlarının proliferasyonunu ve göçünü, G₂/M tutuklamasını önemli ölçüde indükleyerek inhibe ettiği gösterilmiştir (Tu ve diğ., 2019).

Mikrotübülleri depolimerize ederek hücre siklusunun G₂/M fazını bloke eden ve bu şekilde hücre çoğalmasını inhibe ettiği bilinen DTX'in, ileri evre KHDAK tedavisinde hem tek ajan olarak hem de sisplatinle veya gemsitabinle ikili kombinasyonunda etkili bir ajan olduğu pek çok klinik çalışmada gösterilmiştir (Roszkowski ve diğ., 2000; Fossella ve diğ., 2003; Herbst ve Khuri, 2003; Lilenbaum ve diğ., 2007). DTX'in 100 mg/m² dozu ile kanserin faz IV aşamasında bulunan ve kemoterapi tedavisinden sonuç alamayan hastalarda %40 oranında tedaviye cevap alınmıştır ve DTX'in ilerlemiş KHDAK'e karşı önemli bir anti-tümör ilaç olduğu kabul edilmiştir (Erdemoğlu ve Şener, 2000).

Bu çalışmada, KHDAK başta olmak üzere birçok kanserin tedavisinde tek başına ve farklı ilaçlarla kombin olarak kullanılan DTX'in, hastada oluşturduğu yan etkiler ve sağlıklı dokuya verdiği zararlar göz önüne alındığında kanser tedavisinde tek ajan olarak kullanılmasının yerine KHDAK'de aşırı sinyalizasyon gösteren WNT sinyal yolağını inhibe eden FH535 ajanıyla kullanılmasının, sağlıklı hücreye verdiği zararı minimuma indirmek ve kanser hücresinin ölümüne neden olmak veya kanser hücresinin aktivitesini bloke etmek bakımından daha etkili olacağı düşünüldüğü için bu kombinasyon ile çalışılmaya karar verilmiştir.

A549 ve BEAS-2B hücrelerine DTX ve FH535 dozları tek başlarına ve kombin halde uygulanıp hücresel seviyede gösterdikleri sitotoksosite sonuçları değerlendirilerek yapılan MTT çalışmasında, iki hücre hattına 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan DTX, kanser hücre hattına zamana ve doza bağlı olarak 72 saatte etkisini gösterirken sağlıklı akciğer hücre hattına en az zararı 24 saatte, en zararlı etkiyi 72 saatte göstermiştir. Bu sonuçlar, kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan DTX'in kanser hücresinde en etkili olduğu zamanda sağlıklı hücreye de zarar verdiğini, hastalarda DTX kullanımına bağlı olarak görülen komplikasyonların nedeninin bu olabileceğini ve en önemlisi DTX'in tek başına KHDAK tedavisinde etkin bir hedef ilaç olamayacağını göstermektedir.

İki hücre hattına 24, 48 ve 72 saat boyunca uygulanan FH535'in kanser hücresine olan etkisini 48 ve 72 saatlerde gösterdiği; sağlıklı hücreye en az zararı 72 saatte gösterdiği ve bunun yanı sıra 24 ve 48 saatlerinde kanser hücresine öldürücü etki gösterirken aynı saatlerde sağlıklı hücreye minimal zararı verdiği dolayısıyla kanser tedavisinde hedefe yönelik olarak kullanılabilir bir ajan adayı olduğu görülmüştür.

İki hücre hattına DTX+FH535 kombini ve tekli dozların hücreler üzerinde oluşturduğu etki göz önüne alınarak mümkün olan en düşük doz oluşturulmaya çalışılmıştır. 24, 48 ve 72 saat boyunca, kontrol grubu hücrelerine kıyasla kanser hücresinde kombin dozların etkisinin paralel seyrettiği; sağlıklı hücrede ise zararlı etkinin 72 saatten sonra gözlenmeye başladığı görülmüştür. Bu sonuçlar, kombin doz denemesinin her iki hücre hattında uygulanmasının uygun olduğunu ve zamana bağlı, detaylı etkinin hücresel düzeyde değerlendirilmesi için xCELLigence gerçek zamanlı hücre analizinde MTT'de uygulanan dozların 100 saat boyunca 15 dakika aralıklarla denemesinin gerekliliğini göstermiştir. MTT'de etkili olduğu görülen tekli dozlar ile kombin dozlar kullanılmıştır. Kombin dozlarda, tekli dozlardan daha az dozajlar kullanılmasıyla, minimum seviyede doz kullanılarak kullanılan ajanların oluşturabileceği toksik etkinin azaltılması amaçlanmıştır.

xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz verilerine göre, kanser hücresine tek başına uygulanan DTX'in kontrol grubuna kıyasla etkinliğinin olduğunu fakat sağlıklı hücreye tek başına verildiğinde hücreye zarar verdiği; FH535'in kanser hücresinde %50 (IC₅₀ değerine uyumlu olarak) hücresel ölüme yol açtığı, sağlıklı hücrede ise neredeyse herhangi bir toksik etki göstermediği görülmüştür. Belirlenen uygun ve etkili dozajlar kullanılan ajanların oluşturabileceği toksik etkinin azaltılması amacıyla minimuma indirilerek kombin doz halinde A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına verilmiş ve 100 saat boyunca 15 dakika aralıklarla ölçüm alınarak hücresel seviyedeki etkileri izlenmiştir.

Uygun DTX ve FH535 dozlarını belirlemek için A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında ayrı ayrı farklı dozlarda ajanlar verilerek deneyler yapılmıştır. A549 hücresine 1 µM DTX, 5 µM DTX ve 10 µM DTX verildiğinde IC₅₀ değerine en yakın dozun 1 µM doz olduğu görülmüştür. Bu bağlamda deneylere 1 µM DTX ve daha az molarlarda DTX ile devam edilmesi uygun görülmüştür. A549 hücresine 10 µM FH535, 20 µM FH535 ve 30 µM FH535 verildiğinde IC₅₀ değerine en yakın dozun 20 µM FH535 olduğu görülmüştür. A549 hücresinde istenen etkiyi vermesinin yanı sıra BEAS-2B'de de en az zararlı etkiyi veren dozları belirlemek amacıyla

BEAS-2B hücresine 1 μM DTX ve 5 μM DTX uygulanmıştır. Uygulanan her iki dozda aynı toksisiteyi gösterdiği için A549 hücresine verildiğinde etki gösteren en düşük doz olan 1 μM DTX ve daha düşük dozlarda DTX ile kombin çalışmasına devam etmeye karar verilmiştir. Aynı şekilde BEAS-2B hücresine verilen FH535 dozlarıyla, verilen maksimum dozajda gösterdiği etkiyi görebilmek için 30 μM FH535 ve 40 μM FH535 deneye alınmıştır ve literatüre ek katkı sağlayacak olan; yüksek dozlarda FH535'in sağlıklı akciğer hücresine yaygın olarak kullanılan ajanlara göre çok az zarar verdiği verisi elde edilmiştir. Dolayısıyla yüksek doz FH535'in sağlıklı hücreye zarar vermediği, kanser hücresinde ise doz arttıkça öldürücü etkiyi gösterdiği görülmüştür. Fakat, tedavi protokollerinde hastanın minimum kimyasal ajana maruz kalması, organizma sağlığı açısından önem taşıdığı için bu çalışmada 0,5 μM olarak belirlenen FH535 dozu üzerinden deneylere devam edilmiştir.

Sonuçlar göstermiştir ki; kombin doz uygulaması, kanser hücresinde kontrol grubuna kıyasla daha fazla etkinlik göstermiştir. Aynı kombin doz sağlıklı hücrede, tek başına DTX verildiğinde verilen hasarla eş değer hasar yaratmıştır. Bu sonuçlardan hareketle, kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan DTX'in sağlıklı hücreye verdiği zarardan daha fazla zarar vermeyen ve buna karşılık kanser hücresine DTX'in tek başına gösterdiği etkinliktan daha fazla etkinlik gösteren kombin ajan adayı olan DTX+FH535 kombini başarılı bulunmuştur. Elde edilen zamana bağlı hücre indeksi grafiği sonuçları, kombin uygulama yapılan kanser hücresinin anti-mitotik aktivite göstererek etkili olduğunu göstermiştir. MTT ve xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz deneylerinden elde edilen paralel veriler, kanser hücresinde belirlenen kombin uygulamanın hedefe yönelik tedavi için umut vaat ettiğini göstermiştir.

Kombinasyon tedavilerinde daha etkili sonuca ulaşabilmek amacıyla kullanılan %50 toksisite için kombinasyon indeksi hesabı aşağıda verilen formüle göre yapılmıştır.

$$CI = (D)_1 / (D_X)_{1+} + (D)_2 / (D_X)_{2+} + \alpha (D)_1 \cdot (D)_2 / (D_X)_1 \cdot (D_X)_2 \quad (5.1)$$

$(D)_1$: $(D)_2$ ile kombinasyon halinde IC_{50} için ilaç 1'in dozu

$(D)_2$: $(D)_1$ ile kombinasyon halinde IC_{50} için ilaç 2'nin dozu

$(D_X)_1$: Tek başına IC_{50} için ilaç 1'in dozu

$(D_X)_2$: Tek başına IC_{50} için ilaç 2'nin dozu

α : iki ilaçtan biri varken diğeri etki göstermezse “0”; iki ilaç birlikte etki gösteriyorsa “1” olarak kabul edilir ve hesaplanan değer; $CI > 1,3$ ise antagonizmayı, $CI = 1,1-1,3$ ise orta antagonizmayı, $CI = 0,9-1,1$ ise destekleyici etkiyi, $CI = 0,8-0,9$ ise hafif sinerjizmi, $CI = 0,6-0,8$ ise orta sinerjizmi, $CI = 0,4-0,6$ sinerjizmi ve $CI = 0,2-0,4$ ise yüksek sinerjizmi gösterir (Ichite, Chougule, Jackson, Fulzele, Safe, ve Singh, 2009). Bu çalışmada kullanılan kombin dozun A549 hücrelerinde gösterdiği etki 0,37505 kombinasyon indeksi değeriyle yüksek sinerjik etkidir. Bu sonuç, belirlenen kombinasyon dozunun, ayrı ayrı verilen DTX ve FH535 dozlarından daha yüksek bir etki gösterdiğini dolayısıyla A549 hücre hattına uygulanan kombin dozun, hücreler üzerindeki etkisinin tek başına her iki ajanın kullanılmasından daha etkili olduğunu göstermektedir..

A549 kanser hücresinde uygun bulunan kombin doz verilerek mitotik aktivite analizi yapılmıştır. Kanser hücresinin ilk 24 saatteki mitotik aktivitesi kontrol grubuna kıyasla %74’e yükselirken; 48 saatteki mitotik aktivitesi kontrole kıyasla %105’e yükselmiştir. 72 saatteki mitotik aktivitesi ise gerçek zamanlı hücre analiz verileriyle uyumlu olarak kontrole kıyasla %72’ye düşmüştür. Zamana bağlı olarak azalarak değişim gösteren mitotik aktivite, kombin ajan uygulamasının hücreyi mitotik katastrof adı verilen hücre ölüm tipine götürdüğünü; gerçek zamanlı hücre analiziyle de uyumlu olarak kombin uygulamanın kanser hücresi üzerinde anti-mitotik etki gösterdiğini desteklemiştir. Mitotik katastrofta, hücre bölünmesinin mitozda kontrol noktalarında oluşan DNA hasarı sonucunda hücre metafazda ya da metafaza girmeden ölür. Apoptozun aksine kaspaz bağımlı olmaksızın ve nüklear fragmentasyon görülmeyen hücre ölümünde anormal mitoz süreci gerçekleşir. Mitoz durur, mitotik iğ iplikçiklerinde degradasyonlar meydana gelir. Nükleustan bol hücreler oluşur ve kromozom ayrımı başarısızlıkla sonuçlanır (Galluzzi ve diğ., 2018). DTX’in tek başına kanser hücrelerinde anti-mitotik etkisini mikrotübülleri stabilize ederek G_2-M fazını bloke ettiği mekanizmayla yaptığı bilinmektedir (Herbst ve Khuri, 2003). Elde edilen sonuçlar, tübülün heterodimerlerinin β -tübülün alt ünitesine bağlanarak mikrotübül depolimerizasyonunu engelleyen DTX’in bu etkisine literatürdeki diğer çalışmalarla da uyumlu olarak FH535’in de destekleyici etki gösterdiği ve bu şekilde bu kombinasyonun mitoz bölünmeyi azalttığı ve hücreyi mitotik katastrofa sürükleyerek ölüme götürdüğünü göstermektedir.

Mitotik katastrofta kardeş kromatidlerin ayrılması başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Kombin ilaç verilen kanser hücrelerinin mitotik katastrof yoluyla ölüme gittiğini doğrulamak için BrdU

aktivite analizi yapılmıştır. BrdU, DNA yapısında bulunan timidinin analogudur. Hücre proliferasyonunu belirlemek amacıyla kullanılır. BrdU, hücre replikasyon sırasında aktif olarak çoğalan hücrelerin yeni sentezlenen DNA iplikçiklerine dahil olur. Böylelikle proliferen hücrelerde BrdU aktivitesi fazla olur. Kombin ilaç verilen kanser hücresinin 24, 48 ve 72 saatteki BrdU aktivitesinin zamana bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla 72 saatte %68'lere düştüğü, bu sonucun mitotik aktivite analizi sonuçlarına paralel olarak mitoz bölünmenin azalmasıyla proliferen hücre sayısının da azaldığının bir göstergesidir.

Önceki verilerden elde edilen zamana bağlı azalan mitotik aktivite sonucunda kanser hücresinin anti-mitotik etkisinin yanı sıra apoptoz adı verilen programlanmış hücre ölüm tipiyle de ölüme gidip gitmediğini araştırmak amacıyla apoptotik hücre ölüm yolağında apoptozu indükleyen en önemli kaspazlardan olan kaspaz 3 ve kaspaz 7'nin (diğer adıyla cellat kaspazların) aktivitesine bakıldığında, kombin doz uygulaması verilen kanser hücresinin kontrole kıyasla kaspaz 3,7 aktivitesinde anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Bu sonuç, gerçek zamanlı hücre analizinden elde edilen verilerle uyumlu olarak kombin doz uygulaması yapılan kanser hücresinin apoptotik hücre ölümüyle değil anti-mitotik etkiyle ve dolayısıyla mitotik katastrofla ölüme gittiği fikrini desteklemektedir.

Sonuç olarak; A549 ve BEAS-2B hücrelerinde DTX ve FH535'in kombin olarak uygulandığı literatürde ilk kez yapılan bu çalışmada, KHDAK'de kanser patogenezinde rol aldığı düşünülen WNT sinyal yolağındaki aşırı aktivasyonun inhibisyonunu sağlayan WNT sinyal yolağı inhibitörü FH535 ve KHDAK tedavi protokolünde sıklıkla kullanılmasına rağmen hastada yan etki ve sitotoksik etki oluşturduğu bilinen DTX'in kombin olarak uygulanmasıyla, kanser hücresinde antiproliferatif etki gösterirken sağlıklı hücrede minimum zararı gösterecek dozun bulunmasıyla yeni tedavi protokolü oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaçla yapılan MTT, gerçek zamanlı hücre analizi, mitotik aktivite analizi, BrdU hücre proliferasyon analizi ve kaspaz 3-7 aktivite analizi deneyleriyle 0,005 µM DTX+0,5 µM FH535 kombinasyonunun KHDAK hücre hattı olan A549'da anti-mitotik etki göstererek mitotik katastrofa neden olduğu; sağlıklı akciğer hücresi BEAS-2B'ye minimum zararı vererek tek başına DTX kullanımında verilen sitotoksik etkiden daha fazla zararlı etkiyi vermediği görülmüştür. Böylelikle literatürde ilk kez yapılan bu çalışma, KHDAK tedavisinde kullanılabilecek yeni bir protokolünün oluşturulmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Aapro, M.S., 1997, Combination Docetaxel/Vinorelbine for Metastatic Breast Cancer and Non-Small-Cell Lung Cancer, *Oncology*, 11 (8), 46-49.
- Adams, J. M., Cory, S., 2001, Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family, *Trends in biochemical sciences*, 26 (1), 61-66.
- Adrain, C., Martin, S. J., 2001, The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome seas, *Trends in Biochemical Sciences*, 26 (6), 390-397.
- Akiri, G., Cherian, M. M., Vijayakumar, S., Liu, G., Bafico, A., Aaronson, S. A., 2009, Wnt pathway aberrations including autocrine Wnt activation occur at high frequency in human non-small-cell lung carcinoma, *Oncogene*, 28 (21), 2163-2172.
- Alar, T., Şahin, E. M., 2012, Akciğer kanseri: birinci basamakta tanı, tedavi ve korunma, *Symrna Tıp Dergisi*, 68 (1), 1-7.
- Guimarães, A. C., Linden, R., 2004, Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles, *European journal of biochemistry*, 271 (9), 1638-50.
- Aung, H. H., Sivakumar, A., Gholami, S. K., Venkateswaran, S. P., Gorain, B., Shadab, 2019, An Overview of the Anatomy and Physiology of the Lung, *Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Lung Cancer*, 1–20.
- Baran, Y., 2018, *Kanser Moleküler Biyolojisi*, Kısayol Yayıncılık, Ankara, ISBN: 9786052329306.
- Behrens, J., 1994, Cadherins as determinants of tissue morphology and suppressors of invasion, *Acta anatomica*, 149 (3), 165-169.
- Behrens, J., Kries, J. P. V., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., ve diğ., 1996, Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1, *Nature*, 382 (6592), 638-642.
- Bienz, M., Clevers, H., 2000, Linking colorectal cancer to Wnt signaling, *Cell*, 103 (2), 311-320.
- Bilello, K. S., Murin, S., Matthay, R. A., 2002, Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer, *Clinics in chest medicine*, 23 (1), 1-25.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A., 2018, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA: a cancer journal for clinicians*, 68 (6), 394-424.
- Brembeck, F. H., Rosário, M., Birchmeier, W., 2006, Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin, *Current opinion in genetics & development*, 16 (1), 51-59.

- Bui, T. D., Beier, D. R., Jonssen, M., Smith, K., Dorrington, S. M., Kaklamanis, L., ve diğ., 1997, cDNA cloning of a human dishevelled DVL-3 gene, mapping to 3q27, and expression in human breast and colon carcinomas, *Biochemical and biophysical research communications*, 239 (2), 510-516.
- Cabadak, H., 2008, Hücre Siklusu ve Kanser, *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 9 (3), 51-61.
- Cadigan, K. M., Liu, Y. I., 2006, Wnt signaling: Complexity at the surface, *Journal of Cell Science*, 119 (3), 395-402.
- Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P., Karagin, P., 2020, Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi, *Güncel Gastroenteroloji*, 24 (3), 103-111.
- Cetin, I., Topcul, M. R., 2017, In vitro antiproliferative effects of nab-paclitaxel with liposomal cisplatin on MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines, *Journal of B.U.O.N.*, 22 (2), 347-354.
- Chen, J., Wang, X., Zhang, J., Chang, J., Han, C., Xu, Z., ve diğ., 2022, Effects of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway on Proliferation and Apoptosis of Gastric Cancer Cells, *Contrast media & molecular imaging*, 2022 (7):1-6.
- Chen, X., Yang, J., Evans, P. M., Liu, C., 2008, Wnt signaling: the good and the bad, *Acta Biochim Biophys Sin*, 40 (7), 577-594.
- Chen, Y., Rao, X., Huang, K., Jiang, X., Wang, H., Teng, L., 2017, FH535 inhibits proliferation and motility of colon cancer cells by targeting Wnt/ β -catenin signaling pathway, *Journal of Cancer*, 8 (16), 3142-3153.
- Chua, H. H., Tsuei, D. J., Lee, P. H., Jeng, Y. M., Lu, J., Wu, J. F., ve diğ., 2015, RBMY, a novel inhibitor of glycogen synthase kinase 3 β , increases tumor stemness and predicts poor prognosis of hepatocellular carcinoma, *Hepatology*, 62 (5), 1480-1496.
- Cortes, J. E., Pazdur, R., 1995, Docetaxel, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 13 (10), 2643-2655.
- Coşkun, G., Özgür, H., 2011, Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması, *Arşiv*, 20 (3), 145-158.
- Curtin, J. F., Cotter, T. G., 2003, Live and let die: Regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis, *Cellular Signalling*, 15 (11), 983-992.
- D'Arcy, M. S., 2019, Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy, *Cell Biology International*, 43 (6), 582-592.
- Coudreuse, D., Korswagen, H. C., 2007, The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion, *Development*, 134 (1), 3-12.
- Doble, B., Woodgett, J. R., 2003, GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase, *J Cell Sci.*, 116 (7), 1175-1186.

- Dönmez, H. G., Demirezen, Ş., Beksaç, M. S., 2011, Wnt/Beta-katenin Sinyal Yolunun Sitoplazmik Biyomolekülleri, *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 25 (3), 189-199.
- Duda, P., Akula, S. M., Abrams, S. L., Steelman, L. S., Martelli, A. M., Cocco, L., ve diğ., 2020, Targeting GSK3 and Associated Signaling Pathways Involved in Cancer, *Cells*, 9 (5), 1110.
- Elmore, S., 2007, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicologic pathology*, 35 (4), 495-516.
- Erdemoğlu, N., Şener, B., 2000, Erdemoğlu, N., Şener, B., 2000, Taksan Sınıfı Bileşiklerin Antitümör Etkileri, *J. Fac. Pharm.*, 29(1) 77-90.
- Fanto, M., McNeill, H., 2004, Planar polarity from flies to vertebrates, *Journal of cell science*, 117 (4), 527-533.
- Fearnhead, N. S., Britton, M. P., Bodmer, W. F., 2001, The ABC of APC, *Human molecular genetics*, 10 (7), 721-733.
- Fossella, F., Pereira, J. R., von Pawel, J., Pluzanska, A., Gorbounova, V., Kaukel, E., ve diğ., 2003, Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: the TAX 326 study group, *Journal of clinical oncology :official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21 (16), 3016-3024.
- Futreal, P. A., Kasprzyk, A., Birney, E., Mullikin, J. C., Wooster, R., Stratton, M. R., 2001, Cancer and genomics, *Nature*, 409 (6822), 850-852.
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., ve diğ., 2018, Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018, *Cell Death & Differentiation 2018 25:3*, 25 (3), 486-541.
- Gao, Z. H., Seeling, J. M., Hill, V., Yochum, A., Virshup, D. M., 2002, Casein kinase I phosphorylates and destabilizes the β -catenin degradation complex, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (3), 1182-1187.
- Gedaly, R., Galuppo, R., Daily, M. F., Shah, M., Maynard, E., Chen, C., ve diğ., 2014, Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in liver cancer stem cells and hepatocellular carcinoma cell lines with FH535, *PloS One*, 9 (6), 823-832.
- Giles, R. H., Van Es, J. H., Clevers, H., 2003, Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 1653 (1), 1-24.
- Gustafson, C. T., Mamo, T., Shogren, K. L., Maran, A., Yaszemski, M. J., 2017, FH535 Suppresses Osteosarcoma Growth In Vitro and Inhibits Wnt Signaling through Tankyrases, *Frontiers in pharmacology*, 8 (MAY), 285.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A., 2011, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144 (5), 646-674.

- Handeli, S., Simon, J. A., 2008, A small-molecule inhibitor of Tcf/ β -catenin signaling down-regulates PPAR γ and PPAR δ activities, *Molecular Cancer Therapeutics*, 7 (3), 521-529.
- He, B., You, L., Uematsu, K., Xu, Z., Lee, A. Y., Matsangou, M., ve diğ., 2004, A monoclonal antibody against Wnt-1 induces apoptosis in human cancer cells, *Neoplasia*, 6 (1), 7-14.
- Herbst, R. S., Khuri, F. R., 2003, Mode of action of docetaxel - A basis for combination with novel anticancer agents, *Cancer Treatment Reviews*, 29 (5), 407-415.
- Hill, B. T., Whelan, R. D. H., Shellard, S. A., McClean, S., Hosking, L. K., 1994, Differential cytotoxic effects of docetaxel in a range of mammalian tumor cell lines and certain drug resistant sublines in vitro, *Investigational new drugs*, 12 (3), 169-182.
- Hirsch, F. R., Suda, K., Wiens, J., Bunn, P. A., 2016, New and emerging targeted treatments in advanced non-small-cell lung cancer, *The Lancet*, 388 (10048), 1012-1024.
- Horn, L., Lovly, C., 2018, *Neoplasms of the Lung*, Harrison's Principles of Internal Medicine, Jameson, J. L. (ed), Chapter 74, McGraw Hill, Germany, ISBN: 78-1-259-64403-0.
- Howe, L. R., Brown, A. M. C., 2004, Wnt signaling and breast cancer, *Cancer biology & therapy*, 3 (1), 36-41.
- Huang, H. C., Klein, P. S., 2004, The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways, *Genome Biology*, 5 (7), 234.
- Huelsken, J., Behrens, J., 2002, The Wnt signalling pathway, *Journal of cell science*, 115 (Pt 21), 3977-3978.
- Huo, Y., Chen, W. S., Lee, J., Feng, G. S., Newton, I. G., 2019, Stress Conditions Induced by Locoregional Therapies Stimulate Enrichment and Proliferation of Liver Cancer Stem Cells, *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR*, 30 (12), 2016-2025.
- Ichite, N., Chougule, M. B., Jackson, T., Fulzele, S. V., Safe, S., Singh, M., 2009, Enhancement of Docetaxel Anti-cancer Activity by A Novel Diindolylmethane (DIM) Compound in Human Non-Small Cell Lung Cancer, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15 (2), 543.
- Iida, J., Dorchak, J., Lehman, J. R., Clancy, R., Luo, C., Chen, Y., ve diğ., 2012, FH535 inhibited migration and growth of breast cancer cells, *PloS one*, 7 (9), e44418.
- Ilyas, M., 2005, Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development, *The Journal of Pathology*, 205 (2), 130-144.
- Institut, N. C., 2012, Cancer Statistic, <https://www.cancer.gov/>, [Ziyaret Tarihi: 20.10.2021].
- Institut, N. C., 2017, Cancer Stat Facts: Lung and Bronchus Cancer, <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/lungb.html>, [Ziyaret Tarihi: 20.10.2021].
- Jager, M., Dayraud, C., Mialot, A., Quéinnec, E., Le Guyader, H., Manuel, M., 2013, Evidence for Involvement of Wnt Signalling in Body Polarities, Cell Proliferation, and the Neuro-

- Sensory System in an Adult Ctenophore, *PLOS ONE*, 8 (12), e84363.
- Jass, J. R., Barker, M., Fraser, L., Walsh, M. D., Whitehall, V. L. J., Gabrielli, B., ve diğ., 2003, APC mutation and tumour budding in colorectal cancer, *Journal of clinical pathology*, 56 (1), 69-73.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011, Global cancer statistics, *CA: a cancer journal for clinicians*, 61 (2), 69-90.
- Jett, J. R., Schild, S. E., Kesler, K. A., Kalemkerian, G. P., 2013, Treatment of small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines, *Chest*, 143 (5 Suppl).
- Kahn, M., Kim, Y., 2014, The role of the Wnt signaling pathway in cancer stem cells: prospects for drug development, *Research and Reports in Biochemistry*, 4 (1), 1-12.
- Kawano, Y., Kypta, R., 2003, Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway, *Journal of cell science*, 116 (Pt 13), 2627-2634.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R., 1972, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British journal of cancer*, 26 (4), 239-257.
- Kerr, J. F., Winterford, C. M., Harmon, B. V., 1994, Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy, *Cancer*, 73 (8), 2013-2026.
- Kestler, H. A., Kühl, M., 2008, From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363 (1495), 1333.
- Kikuchi, A., 1999, Roles of Axin in the Wnt signalling pathway, *Cellular signalling*, 11 (11), 777-788.
- Kim, J., You, L., Xu, Z., Kuchenbecker, K., Raz, D., He, B., ve diğ., Wnt inhibitory factor inhibits lung cancer cell growth, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 133 (3), 733-737.
- Kishida, S., Yamamoto, H., Hino, S., Ikeda, S., Kishida, M., Kikuchi, A., 1999, DIX Domains of Dvl and Axin Are Necessary for Protein Interactions and Their Ability To Regulate β -Catenin Stability, *Molecular and Cellular Biology*, 19 (6), 4414.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Löhler, J., Stöter, M., 2005, The casein kinase 1 family: Participation in multiple cellular processes in eukaryotes, *Cellular Signalling*, 17 (6), 675-689.
- Kohn, A. D., Moon, R. T., 2005, Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways, *Cell calcium*, 38 (3-4), 439-446.
- Komiya, Y., Habas, R., 2008, Wnt signal transduction pathways, *Organogenesis*, 4 (2), 68-75.

- Kühl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R., Moon, R. T., 2000, The Wnt/Ca²⁺ pathway A new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape, *Trends in Genetics*, 16 (7), 279-283.
- Kumar, N., 1981, Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action., *The Journal of Biological Chemistry*, 256 (20), 10435-10441.
- L'Episcopo, F., Tirolo, C., Testa, N., Caniglia, S., Morale, M. C., Deleidi, ve diğ., 2012, Plasticity of subventricular zone neuroprogenitors in MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine) mouse model of Parkinson's disease involves cross talk between inflammatory and Wnt/ β -catenin signaling pathways: Functional consequences for neuroprotection and repair, *Journal of Neuroscience*, 32 (6), 2062-2085.
- Lai, S. L., Chien, A. J., Moon, R. T., 2009, Wnt/Fz signaling and the cytoskeleton: potential roles in tumorigenesis, *Cell Research 2009 19:5*, 19 (5), 532-545.
- Lane, S. W., Wang, Y. J., Lo Celso, C., Ragu, C., Bullinger, L., Sykes, S. M., ve diğ., 2011, Differential niche and Wnt requirements during acute myeloid leukemia progression, *Blood*, 118 (10), 2849-2856.
- Larsen, J. E., Minna, J. D., 2011, Molecular biology of lung cancer: clinical implications, *Clinics in chest medicine*, 32 (4), 703-740.
- Lee, J., Kim, M. S., 2007, The role of GSK3 in glucose homeostasis and the development of insulin resistance, *Diabetes research and clinical practice*, 77 (1), 49-57.
- Licchese, J. D. F., Westra, W. H., Hooker, C. M., Machida, E. O., Baylin, S. B., Herman, J. G., 2008, Epigenetic alteration of Wnt pathway antagonists in progressive glandular neoplasia of the lung., *Carcinogenesis*, 29 (5), 895-904.
- Lilenbaum, R., Rubin, M., Samuel, J., Boros, L., Chidiac, T., Seigel, L., ve diğ., 2007, A randomized phase II trial of two schedules of docetaxel in elderly or poor performance status patients with advanced non-small cell lung cancer, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 2 (4), 306-311.
- Liu, C. C., Tsai, C. W., Deak, F., Rogers, J., Penuliar, M., Sung, Y. M., ve diğ., 2014, Deficiency in LRP6-Mediated Wnt Signaling Contributes to Synaptic Abnormalities and Amyloid Pathology in Alzheimer's Disease, *Neuron*, 84 (1), 63-77.
- Liu, C., Li, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G. H., Tan, Y., ve diğ., 2002, Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism, *Cell*, 108 (6), 837-847.
- Liu, Ji., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., ve diğ., 2022, Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities, *Signal Transduction and Targeted Therapy 2021 7:1*, 7 (1), 1-23.
- Liu, J., Li, G., Liu, D., Liu, J., 2014, FH535 inhibits the proliferation of HepG2 cells via downregulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, *Mol Med Rep*, 9 (4), 1289-1292.
- Liu, L., Zhi, Q., Shen, M., Gong, F. R., Zhou, B. P., Lian, L., Shen, B., ve diğ., 2016, FH535,

- a β -catenin pathway inhibitor, represses pancreatic cancer xenograft growth and angiogenesis, *Oncotarget*, 7 (30), 47145-47162.
- Liu, Q., Lu, Y., Xiao, Y., Yuan, L., Hu, D., Hao, Y., ve diğ., 2021, Effects of Docetaxel Injection and Docetaxel Micelles on the Intestinal Barrier and Intestinal Microbiota, *Advanced Science*, 8 (24), 2102952.
- Liu, X., Du, P., Han, L., Zhang, A., Jiang, K., Zhang, Q., 2018, Effects of miR-200a and FH535 combined with taxol on proliferation and invasion of gastric cancer, *Pathology, research and practice*, 214 (3), 442-449.
- Liu, Y. L., Yang, H. P., Zhou, X. D., Gong, L., Tang, C. L., Wang, H. J., 2011, The hypomethylation agent bisdemethoxycurcumin acts on the WIF-1 promoter, inhibits the canonical Wnt pathway and induces apoptosis in human non-small-cell lung cancer, *Current cancer drug targets*, 11 (9), 1098-1110.
- Lustig, B., Behrens, J., 2003, The Wnt signaling pathway and its role in tumor development, *Journal of cancer research and clinical oncology*, 129 (4), 199-221.
- Maher, M. T., Flozak, A. S., Stocker, A. M., Chenn, A., Gottardi, C. J., 2009, Activity of the β -catenin phosphodestruction complex at cell-cell contacts is enhanced by cadherin-based adhesion, *The Journal of Cell Biology*, 186 (2), 219-228.
- Malumbres, M., 2011, Physiological relevance of cell cycle kinases, *Physiological reviews*, 91 (3), 973-1007.
- Matthews, H. K., Bertoli, C., de Bruin, R. A. M., 2021, Cell cycle control in cancer, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2021 23:1, 23 (1), 74-88.
- Mazieres, J., He, B., You, L., Xu, Z., Jablons, D. M., 2005, Wnt signaling in lung cancer, *Cancer Letters*, 222 (1), 1-10.
- Mazieres, J., He, B., You, L., Xu, Z., Lee, A. Y., Mikami, I., ve diğ., 2004, Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer, *Cancer research*, 64 (14), 4717-4720.
- McPhie, D. L., Coopersmith, R., Hines-Peralta, A., Chen, Y., Ivins, K. J., Manly, S. P., ve diğ., 2003, DNA Synthesis and Neuronal Apoptosis Caused by Familial Alzheimer Disease Mutants of the Amyloid Precursor Protein Are Mediated by the p21 Activated Kinase PAK3, *The Journal of Neuroscience*, 23 (17), 6914.
- Mikels, A. J., Nusse, R., 2006, Wnts as ligands: processing, secretion and reception, *Oncogene*, 25 (57), 7461-7468.
- Mikesch, J. H., Steffen, B., Berdel, W. E., Serve, H., Müller-Tidow, C., 2007, The emerging role of Wnt signaling in the pathogenesis of acute myeloid leukemia, *Leukemia*, 21 (8), 1638-1647.
- Miller, V. A., Rigas, J. R., Francis, P. A., Grant, S. C., Pisters, K. M., Venkatraman, E. S., ve diğ., 1995, Phase II trial of a 75-mg/m² dose of docetaxel with prednisone premedication

- for patients with advanced non-small cell lung cancer - PubMed, *Clinical Trial*, 75 (4), 968-72.
- Mizutani, K., Miyamoto, S., Nagahata, T., Konishi, N., Emi, M., Onda, M., 2005, Upregulation and overexpression of DVL1, the human counterpart of the Drosophila dishevelled gene, in prostate cancer, *Tumori*, 91 (6), 546-551.
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., Adjei, A. A., 2008, Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship, *Mayo Clinic proceedings*, 83 (5), 584-594.
- Moon, R. T., 2005, Wnt/beta-catenin pathway, *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2005 (271).
- Mosmann, T., 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *Journal of immunological methods*, 65 (1-2), 55-63.
- Naghavi, M., Wang, H., Lozano, R., Davis, A., Liang, X., Zhou, M., ve diğ., 2015, Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013, *The Lancet*, 385 (9963), 117-171.
- Nakamura, Y., Nawata, M., Wakitani, S., 2005, Expression profiles and functional analyses of Wnt-related genes in human joint disorders, *The American journal of pathology*, 167 (1), 97-105.
- Näthke, I., 2005, Relationship between the role of the adenomatous polyposis coli protein in colon cancer and its contribution to cytoskeletal regulation, *Biochemical Society transactions*, 33 (Pt 4), 694-697.
- National Cancer Institute, 2018,a, Cancer Statistics Review, 1975-2014 - SEER Statistics,. https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2014/, [Ziyaret Tarihi:18.09.2022].
- National Center for Biotechnology Information,b, 2022, 2,5-dichloro-N-(2-methyl-4-nitrophenyl)benzenesulfonamide|C13H10Cl2N2O4S-PubChem,. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/fh535>, [Ziyaret Tarihi:18.09.2022].
- National Center for Biotechnology Information, 2022,c, Docetaxel | C43H53NO14 -PubChem,. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/148124>, [Ziyaret Tarihi:18.09.2022].
- Ng, L. F., Kaur, P., Bunnag, N., Suresh, J., Sung, I. C. H., Tan, Q. H., ve diğ., 2019, WNT Signaling in Disease, *Cells*, 8 (8), 1-31.
- Nusse, R., 2005, Wnt signaling in disease and in development, *Cell research*, 15 (1), 28-32.
- Nusse, R., Varmus, H. E., 1992, Wnt genes, *Cell*, 69 (7), 1073-1087.
- Öktem, S., Özhan, M. H., Özol, D., 2001, Apoptozisin Önemi, *Toraks dergisi*, 2 (1), 91-95.
- Özgül, N., Olcayto, E., Gültekin, M., 2009, *Türkiye'de kanser kontrolü Koza Matbaacılık*,

Ankara.

- Patel, S., Alam, A., Pant, R., Chattopadhyay, S., 2019, Wnt Signaling and Its Significance Within the Tumor Microenvironment: Novel Therapeutic Insights, *Frontiers in Immunology*, 10, 2872.
- Pavlopoulou, A., Spandidos, D. A., Michalopoulos, I., 2015, Human cancer databases (review), *Oncology reports*, 33 (1), 3-18.
- Perez-Moreno, P., Brambilla, E., Thomas, R., Soria, J. C., 2012, Squamous cell carcinoma of the lung: molecular subtypes and therapeutic opportunities, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18 (9), 2443-2451.
- Povelones, M., Nusse, R., 2002, Wnt signalling sees spots, *Nature Cell Biology*, 4 (11), E249-E250.
- Qian, Y., Lu, X., Li, Q., Zhao, S., Fang, D., 2019, The treatment effects and the underlying mechanism of B cell translocation gene 1 on the oncogenesis of brain glioma, *Journal of cellular biochemistry*, 120 (8), 13310-13320.
- Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M., Matrisian, L.M., 2014, Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States, *Cancer Research*, 74 (11), 2913-21.
- Roszkowski, K., Pluzanska, A., Krzakowski, M., Smith, A. P., Saigi, E., Aasebo, U., Parisi, A., ve diğ., 2000, A multicenter, randomized, phase III study of docetaxel plus best supportive care versus best supportive care in chemotherapy-naïve patients with metastatic or non-resectable localized non-small cell lung cancer (NSCLC), *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 27 (3), 145-157.
- Rowles, J., Slaughtert, C., Moomaw, C., Hsut, J., Cobb, M. H., 1991, Purification of casein kinase I and isolation of cDNAs encoding multiple casein kinase I-like enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 9548-9552.
- Rüttinger, D., Hatz, R., Jauch, K.W., Fox, B., 2009, *Novel Strategies for Lung Cancer Immunotherapy*, General Thoracic Surgery, In: Shields, V., Thomas, M.D., (Ed), Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins, ISBN: 0781779820.
- Schimming, R., Mason, K. A., Hunter, N., Weil, M., Kishi, K., Milas, L., 1999, Lack of correlation between mitotic arrest or apoptosis and antitumor effect of docetaxel, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 43 (2), 165-172.
- Şensoy, E., Öznurlu, Y., 2009, Hücre Adezyon Molekülleri, *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil*, 4 (1), 57-68.
- Shi, L. S., Huang, G., Yu, B., Wen, X. Q., 2009, Clinical significance and prognostic value of serum Dickkopf-1 concentrations in patients with lung cancer, *Clinical chemistry*, 55 (9), 1656-1664.

- Shitashige, M., Hirohashi, S., Yamada, T., 2008, Wnt signaling inside the nucleus, *Cancer Science*, 99 (4), 631-637.
- Sholl, L. M., 2014, Large-cell carcinoma of the lung: a diagnostic category redefined by immunohistochemistry and genomics, *Current opinion in pulmonary medicine*, 20 (4), 324-331.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., Jemal, A., 2022, Cancer statistics, 2022, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 72 (1), 7-33.
- Smaili, S. S., Hsu, Y. Te., Youle, R. J., Russell, J. T., 2000, Mitochondria in Ca⁺² signaling and apoptosis, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 32 (1), 35-46.
- Sonderegger, S., Pollheimer, J., Knöfler, M., 2010, Wnt signalling in implantation, decidualisation and placental differentiation--review, *Placenta*, 31 (10), 839-847.
- Strasser, A., O'Connor, L., Dixit, V. M., 2000, Apoptosis signaling, *Annual Review of Biochemistry*, 69, 217-245.
- Suknuntha, K., Thita, T., Togarrati, P. P., Ratanachamnong, P., Wongtrakoongate, P., Srihirun, S., ve diğ., 2017, Wnt signaling inhibitor FH535 selectively inhibits cell proliferation and potentiates imatinib-induced apoptosis in myeloid leukemia cell lines, *International journal of hematology*, 105 (2), 196-205.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., ve diğ., 2021, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71 (3), 209-249.
- Swiatek, W., Tsai, I. C., Klimowski, L., Pepler, A., Barnette, J., Yost, H. J., ve diğ., 2004, Regulation of Casein Kinase Iε Activity by Wnt Signaling, *Journal of Biological Chemistry*, 279 (13), 13011-13017.
- T.C.Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2017, Türkiye Kanser İstatistikleri 2017, <http://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri> [Ziyaret Tarihi: 20.10.2021).
- Teng, Y., Wang, X., Wang, Y., Ma, D., 2010, Wnt/beta-catenin signaling regulates cancer stem cells in lung cancer A549 cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 392 (3), 373-379.
- Tennis, M., Van Scoyk, M., Winn, R. A., 2007, Role of the Wnt Signaling Pathway and Lung Cancer, *Journal of Thoracic Oncology*, 2 (10), 889-892.
- Teo, J. L., Kahn, M., 2010, The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators, *Advanced drug delivery reviews*, 62 (12), 1149-1155.
- Tetsu, O., McCormick, F., 2003, Proliferation of cancer cells despite CDK2 inhibition, *Cancer Cell*, 3 (3), 233-245.

- Thompson, M. D., Monga, S. P. S., 2007, WNT/ β -catenin signaling in liver health and disease, *Hepatology*, 45 (5), 1298-1305.
- Tomizawa, M., Shinozaki, F., Motoyoshi, Y., Sugiyama, T., Yamamoto, S., Ishige, N., 2016, FH535 suppresses the proliferation and motility of hepatocellular carcinoma cells, *International Journal of Oncology*, 48 (1), 110-114.
- Travis, W. D., 2011, Pathology of lung cancer, *Clinics in chest medicine*, 32 (4), 669-692.
- Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., ve diğ., 2015, The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification, *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10 (9), 1243-1260.
- Tu, X., Hong, D., Jiang, Y., Lou, Z., Wang, K., Jiang, Y., ve diğ., 2019, FH535 inhibits proliferation and migration of colorectal cancer cells by regulating CyclinA2 and Claudin1 gene expression, *Gene*, 690, 48-56.
- Turashvili, G., Bouchal, J., Burkadze, G., Kolar, Z., 2006, Wnt signaling pathway in mammary gland development and carcinogenesis, *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 73 (5), 213-223.
- Van Roy, F., 2014, Beyond E-cadherin: Roles of other cadherin superfamily members in cancer, *Nature Reviews Cancer*, 14 (2), 121-134.
- Vaux, D. L., Korsmeyer, S. J., 1999, Cell death in development, *Cell*, 96 (2), 245-254.
- Veeman, M. T., Axelrod, J. D., Moon, R. T., 2003, A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling, *Developmental cell*, 5 (3), 367-377.
- Verheyen, E. M., Gottardi, C. J., 2009, Regulation of Wnt/ β -Catenin Signaling by Protein Kinases, *Dev. Dyn.*, 239 (1), 34-44.
- Verheyen, E. M., Gottardi, C. J., 2010, Regulation of Wnt/ β -Catenin Signaling by Protein Kinases, *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 239 (1), 34.
- Vousden, K. H., Lu, X., 2002, Live or let die: the cell's response to p53, *Nature reviews. Cancer*, 2 (8), 594-604.
- Wallingford, J. B., Habas, R., 2005, The developmental biology of Dishevelled: An enigmatic protein governing cell fate and cell polarity, *Development*, 132 (20), 4421-4436.
- Wang, L. G., Liu, X. M., Kreis, W., Budman, D. R., 1999, The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review, *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 44 (5), 355-361.
- Wawrzak, D., Luyten, A., Lambaerts, K., Zimmermann, P., 2009, Frizzled-PDZ scaffold interactions in the control of Wnt signaling, *Advances in Enzyme Regulation*, 49 (1), 98-

106.

- Wei, Q., Zhao, Y., Yang, Z. Q., Dong, Q. Z., Dong, X. J., Han, Y., ve diğ., 2008, Dishevelled family proteins are expressed in non-small cell lung cancer and function differentially on tumor progression, *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 62 (2), 181-192.
- Wijsman, J. H., Jonker, R. R., Keijzer, R., Van de Velde, C. J. H., Cornelisse, C. J., Van Dierendonck, J. H., 1993, A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA, *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 41 (1), 7-12.
- Willert, K., Jones, K. A., 2006, Wnt signaling: is the party in the nucleus?, *Genes & development*, 20 (11), 1394-1404.
- Wu, G., Huang, H., Abreu, J. G., He, X., 2009, Inhibition of GSK3 phosphorylation of β -catenin via phosphorylated PPPSPXS motifs of Wnt coreceptor LRP6, *PLoS ONE*, 4 (3), e4926.
- Xu, H. T., Wei, Q., Liu, Y., Yang, L. H., Dai, S. D., Han, Y., ve diğ., 2007, Overexpression of axin downregulates TCF-4 and inhibits the development of lung cancer, *Annals of surgical oncology*, 14 (11), 3251-3259.
- Yamamoto, S., Nishimura, O., Misaki, K., Nishita, M., Minami, Y., Yonemura, S., ve diğ., 2008, Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex, *Developmental cell*, 15 (1), 23-36.
- Yardy, G. W., Brewster, S. F., 2005, Wnt signalling and prostate cancer, *Prostate Cancer and Prostatic Diseases 2005* 8:2, 8 (2), 119-126.
- Yener, N. A., Düşmez, D., 2014, Akciğer Kanserinde Morfolojik Tanı ve Sınıflama, *Türk Radyoloji Derneği*, 281-289.
- Yücel, A. H., 2018, *Dere Anatomi Atlası ve Ders Kitabı*, Akademisyen yayınevi, ISBN: 9786052396896.
- Zhang, J., Xu, M., 2002, Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis, *Trends in Cell Biology*, 12 (2), 84-89.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Eda Nur AVŞAR
Doğum Yeri	
Doğum Tarihi	Tarih girmek için tıklayın veya dokununuz.
Uyruğu	<input checked="" type="checkbox"/> T.C. <input type="checkbox"/> Diğer:
E-Posta Adresi	
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	18.06.2019

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Biyoteknoloji

Makale ve Bildiriler	
Avsar, E.N., Cetin, I., Topcul, M., 2022, An Overview of the Effect of the Wnt Signaling Pathway in Lung Cancer, <i>Cellular and Molecular Biology</i> , 68 (8): 41-46. (Basım aşamasında).	