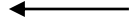


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

SUNITİNİB DİRENÇLİ BÖBREK KANSERİ HÜCRE
SERİLERİNDE, DİRENÇ YANITINDA ETKİLİ GEN
EKSPRESYONLARININ, SÜKSİNİK ASİT TEDAVİSİ
SONRASI KARŞILAŞTIRILMASI.

BARIŞ ERTUĞRUL

DANIŞMAN
PROF. DR. BEDİA ÇAKMAKOĞLU

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. SİNEM BİRELLER

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Bariş Ertuğrul



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim öğretim dönemimin başlangıcından bu yana birlikte çalışmaktan mutluluk ve onur duyduğum, akademik sürecimizin içerisinde her gün farklı bir bilgiye yol gösterici olan, Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Bedia Çakmakoglu'na her daim sağladığı maddi-manevi destek, moral ve motivasyonu için gönülden, sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Lisansüstü eğitimim ve tez sürecim boyunca birlikte çalıştığımız, bilgi ve birikimini, zor süreçlerde moral ve motivasyon desteğini esirgemeyen, Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi, 2. tez danışmanı hocam Doç. Dr. Sinem Bireller'e içtenlikle teşekkür ederim.

Tez sürecimde ve birlikte yer aldığımız çalışmalarda, hiçbir zaman desteği ve yardımlarını esirgemeyen, her daim dostane bir tavırla dinleyip, tecrübelerini samimiyetle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Arzu Ergen'e sonsuz teşekkür ederim.

Toplantı ve görüşmelerimizde her zaman motivasyon ve destek veren değerli hocam Prof. Dr. Ebru Emekli Alturfan'a teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim ve doktora tez sürecim boyunca, moral ve motivasyon desteğini esirgemeyen veren Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Prof. Dr. Özlem Küçükhuşeyin'e ve tez sürecimdeki motivasyon desteği için Öğr. Gör. Mehmet Tolgahan Hakan'a teşekkür ederim.

Moleküler Tıp Anabilim Dalı bölüm başkanımız Prof. Dr. İlhan Yaylın, anabilim dalı öğretim üyelerimizden Prof. Dr. Hülya Yılmaz Aydoğan, Prof. Dr. Oğuz Öztürk, Prof. Dr. Ş. Ümit Zeybek, Doç. Dr. Canan Cacına ve Doç. Dr. Özlem Timirci Kahraman'a bugüne dek kattıkları için sonsuz teşekkür ederim. Çalışma arkadaşlarım; PhD(c) Merve Nur Ataş ve tez sürecindeki desteği için PhD(c) Göksu Kaşarcı'ya teşekkür ederim. Yine çalışmalarım sırasında moral ve desteği için Arş. Gör. Dr. Berker Kaya'ya teşekkür ederim.

Haklarını asla ödeyemeyeceğim, hayatımın her döneminde olduğu gibi, bu dönem boyunca da, destek, moral ve motivasyon kaynağı olan değerli aile üyelerim; canım kardeşim Enes Ertuğrul'a, kıymetli babam Sedat Ertuğrul'a ve değerli annem Ayşe Ertuğrul'a sonsuz şükran ve teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Son olarak, hayatlarımızı birleştiren sürece girdiğimizden bu yana her daim ziyadesiyle yanımda olabilen, günlük yaşantıda olduğu gibi ekseriyetle akademik hayatta ve tez sürecindeki en stresli dönemlerimde dahi sığınabildiğim, huzur bulabildiğim, derdime neşeme ortak bir liman olabildiği için, ve ayrıca tez sürecimdeki harici maddi manevi emek, destek, motivasyon ve anlayışı için sevgili eşim Aybike Sena Ertuğrul’a gönülden teşekkür ederim.

Bu alışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36717

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	İİ
İTHAF.....	İİİ
TEŞEKKÜR.....	İV
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Böbrek Kanseri ve Epidemiyolojisi	3
2.2. Renal Hücreli Karsinomlar	4
2.3. Histolojik Alt Tipleri.....	4
2.4. Renal Hücreli Karsinomların Evrelemesi	7
2.5. Renal Hücreli Karsinomlarda Genetiğin Rolü	10
2.6. Anjiyogenez süreci ve ilişkili genler.....	13
2.6.1. VEGF-A ve VEGF-C.....	15
2.6.2. PDGF-A	16
2.6.3. HIF-1A	17
2.6.4. TGF-β.....	18
2.6.5. VHL	19
2.6.6. ANGPT1 -TIE2 (TEK) Yolağı	20
2.7. Metastatik Renal Hücreli Karsinomlar	23
2.8. Tedavi Yöntemleri	24
2.9. Tirozin Kinaz İnhibitörleri	25
2.10. Sunitinibin Tedavideki Yeri ve Direnç Durumundaki Başarısı	26
2.11. Süksinik Asit ve Metabolizmadaki Etkileri	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1. Hücre Yetiştirme Aşamalarında Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	33

3.2. Hücre Hatlarının Yetiştirilmesi.....	33
3.3. Sunitinibin renal kanser hücreleri üzerindeki IC ₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi	34
3.4. Sunitinib stok çözeltisinin ve diğer konsantrasyonların hazırlanması	34
3.5. Sunitinib Direncinin Oluşturulması	35
3.6. Crystal Violet / Hücre Koloni Analizi	37
3.6.1. Boyama Solüsyonunun Hazırlanması ve Ekim Prosedürü	37
3.6.2. Hücre Parçalama Solüsyonunun Hazırlanması ve Prosedür	38
3.7. Süksinik Asit Dozunun Sunitinib-Dirençli Hücreler için Belirlenmesi.....	38
3.8. VEGF-A, HIF-1A ve VHL için ELISA Deneyleri	38
3.8.1. Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması	38
3.8.2. ELISA yöntemi ile protein seviyelerinin tespiti	39
3.8.3. ELISA ile VEGF Düzeylerinin Belirlenmesi.....	39
3.8.4. ELISA ile HIF-1A Düzeylerinin Belirlenmesi	40
3.8.5. ELISA ile VHL Düzeylerinin Belirlenmesi.....	40
3.9. RNA İzolasyonu İçin Ön Hazırlık	40
3.9.1. TRIzol ile RNA İzolasyonu	40
3.9.1.1. Hücre Homojenizasyonu.....	40
3.9.1.2. Faz Ayırma Adımı.....	41
3.9.1.3. RNA'nın Çöktürülmesi	41
3.9.1.4. RNA Yıkama İşlemi.....	41
3.9.1.5. RNA'nın Çözünmesi	41
3.9.1.6. RNA Saflık ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	42
3.9.2. Elde edilen RNA'lardan cDNA dönüşümlerinin gerçekleştirilmesi.....	42
3.9.3. Real-Time PZR yöntemi ile gen ifadelerinin tayini.....	43
4. BULGULAR.....	46
4.1. ELISA Sonuçları.....	47
4.2. Real-Time PCR Sonuçlarına göre gen ekspresyon değişim sonuçları.....	52
4.2.1. Sunitinibe duyarlı gruplar arasındaki karşılaştırma	52
4.2.2. Sunitinibe dirençli grupların, duyarlı gruplara göre kıyaslanması.....	54
4.2.3. Sunitinibe dirençli gruplar arasındaki karşılaştırma	55
4.3. Birlikte değerlendirilen hedefler	60
4.3.1. VEGF-A, HIF-1A ve VHL protein ve gen ekspresyonları	60
4.3.2. VEGF-A, VEGF-C ve PDGF-A gen ekspresyonları	62

4.3.3. HIF-1A, VHL ve TGF- β gen ekspresyonları	63
4.3.4. ANGPT1 ve TIE2 gen ekspresyonları	65
4.3.5. Korelasyonların Değerlendirilmesi	67
5. TARTIŞMA	72
KAYNAKLAR	80
HAM VERİLER	91
FORMLAR	92
ETİK KURUL KARARI	93
PATENT HAKKI İZNİ	94
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	95
ÖZGEÇMİŞ	96

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Renal Hücreli Karsinomaların Sınıflandırılması.....	6
Tablo 2-2: TNM sistemine göre renal hücreli karsinom evrelemesi.	8
Tablo 2-3: Fuhrman, Delahunt ve DSÖ/ISUP sınıflandırmaları.	10
Tablo 2-4: Metastatik renal hücreli karsinoma tedavisinde kullanılan bazı tirozin kinaz inhibitörleri ve hedefleri.	26
Tablo 3-1: Sunitinib konsantrasyonlarının hazırlanması	35
Tablo 3-2: RNA örneklerinden cDNA eldesi, reaksiyon içeriği	42
Tablo 3-3: mRNA için gerekli PZR koşulları.....	43
Tablo 3-4: qPZR reaksiyonu için protokol	43
Tablo 3-5: Hedef primerlerin dizileri ve erime noktası dereceleri (Tm)	44
Tablo 3-6: Gerçek zamanlı PZR koşulları	45
Tablo 4-1: Sunitinibe duyarlı hücrelerdeki protein düzeylerinin, tedavi gruplarına göre karşılaştırılması.....	49
Tablo 4-2: Sunitinibe dirençli hücrelerdeki protein düzeylerinin duyarlı grup ile karşılaştırılması.....	50
Tablo 4-3: Dirençli hücrelerdeki protein düzeylerinin yalnızca dirençli grup içinde karşılaştırılması.....	51
Tablo 4-4: Sunitinibe duyarlı gruplarda, tedavi gruplarına göre elde edilen gen ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması.....	57
Tablo 4-5: Sunitinibe dirençli gruplarda, tedavi gruplarına göre elde edilen gen ekspresyon değerlerinin duyarlı grup ile karşılaştırılması.....	58
Tablo 4-6: Sunitinibe dirençli gruplarda, tedavi gruplarına göre elde edilen gen ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması.....	59
Tablo 4-7: Sunitinibe duyarlı hücrelerde incelenen gen ve proteinlerin ilişkilerinin Spearman korelasyon testi sonuçlarına göre gösterilmesi	68
Tablo 4-8: Sunitinibe dirençli hücrelerde incelenen gen ve proteinlerin ilişkilerinin Spearman korelasyon testi sonuçlarına göre gösterilmesi	69

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Böbrek kanseri insidans ve mortalitesinin, dünya ülkelerindeki dağılımı (23)	4
Şekil 2-2: VEGF sinyalizasyonunun tümör sürecinde tetiklediği mekanizmalar	16
Şekil 2-3: PDGF sinyalizasyon basamakları	17
Şekil 2-4: VHL ve HIF- α etkileşimleri	20
Şekil 2-5: ANGPT1-TIE2 iletişiminin kontrol mekanizması	22
Şekil 2-6: Sunitinib tedavi hedef noktaları	27
Şekil 2-7: Trikarboksilik asit döngüsü	30
Şekil 2-8: Süksinat dehidrogenaz enzim kompleksi ve elektron transferi	30
Şekil 2-9: SDH ve FH enzim aktivasyonlarının kaybına bağlı görülen değişiklikler	31
Şekil 4-1: ACHN hücrelerinde sunitinib IC ₅₀ değerinin belirlenmesi	46
Şekil 4-2: Kristal viyole boyama sonuçları	47
Şekil 4-3: VEGF-A ELISA standartlarına ait eğri grafiği	48
Şekil 4-4: HIF-1A ELISA standartlarına ait eğri grafiği	48
Şekil 4-5: VHL ELISA standartlarına ait eğri grafiği	48
Şekil 4-6: VEGF-A, HIF-1A, VHL protein ve genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin sunitinibe duyarlı gruplarda birlikte gösterilmesi	60
Şekil 4-7: VEGF-A, HIF-1A, VHL protein ve genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin sunitinibe dirençli gruplarda birlikte gösterilmesi	61
Şekil 4-8: VEGF-A, VEGF-C ve PDGF-A genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin, sunitinibe duyarlı hücre gruplarında birlikte gösterilmesi	62
Şekil 4-9: VEGF-A, VEGF-C, PDGF-A genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin, sunitinibe dirençli hücre gruplarında birlikte gösterilmesi	63
Şekil 4-10: HIF-1A, VHL ve TGF- β genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin, sunitinibe duyarlı hücre gruplarında birlikte gösterilmesi	64
Şekil 4-11: HIF-1A, VHL ve TGF- β genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin, sunitinibe dirençli hücre gruplarında birlikte gösterilmesi	65
Şekil 4-12: ANGPT1 ve TIE2 genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin, sunitinibe duyarlı hücre gruplarında birlikte gösterilmesi	66
Şekil 4-13: ANGPT1 ve TIE2 genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin, sunitinibe dirençli hücre gruplarında birlikte gösterilmesi	67

Şekil 4-14: Sunitinibe duyarlı gruplara spesifik olarak anlamlı korele bulunan gen ilişkilerinin gösterilmesi	69
Şekil 4-15: Sunitinibe duyarlı ve sunitinibe dirençli grupların her ikisinde de ortak olarak anlamlı korele bulunan gen ilişkilerinin gösterilmesi.....	70
Şekil 4-16: Sunitinibe dirençli gruplara spesifik, anlamlı korele bulunan gen ilişkilerinin gösterilmesi.....	71



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ANGPT:	Anjiyopoietin
ATCC:	Amerikan Tip Hücre Kültür Koleksiyonu
BAP1:	BRCA1 İlişkili Protein 1
bhRHK:	Berrak Hücreli Renal Hücreli Karsinom
CCK-8:	Hücre Sayım Kiti-8
cDNA:	Komplementer DNA
CT:	Eşik değer
DMSO:	Dimetil sülfoksit
dNTP:	Deoksi nükleik trifosfat
DSÖ:	Dünya Sağlık Örgütü
EGF:	Epidermal Büyüme Faktörü
ELISA:	Enzim Bağlı İmmün Assay
EMEM:	Eagle's Minimum Essential Medium
EMG:	Epitelyal Mezenkimal Geçiş
FBS:	Fetal Sığır Serumumu
FH:	Fumarat Hidrataz
FLCN:	Follikulin
GLOBOCAN:	Küresel Kansere İnsidans, Mortalite ve Prevelansı
HGF:	Hepatosit Büyüme Faktörü
HIF:	Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör
IC ₅₀ :	Maksimum yarı inhibitör konsantrasyonu
IL-2:	İnterlökin-2
ISUP:	Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği
mRNA:	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
mTOR:	Rapamisininin Memeli Hedefi
PBRM1:	Polibromo 1
PBS:	Fosfat destekli salin ortam çözeltisi
PDGF:	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PNS:	Para Neoplastik Sendromlar
PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RHK:	Renal Hücreli Karsinoma

SDH:	Süksinat Dehidrogenaz
SN:	Sitoredüktif Nefrektomi
SUCNR1:	Süksinat reseptörü 1
TCA:	Trikarboksilik Asit
TGF:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TIE:	TEK reseptör tirozin kinaz
TKİ:	Tirozin Kinaz Inhibitör
VEGF:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VHL:	von Hippel–Lindau
dk:	Dakika
≈:	Yaklaşık
µl:	Mikrolitre
µm:	Mikrometre
µM:	Mikromolar
ml:	Mililitre
µg:	Mikrogram

ÖZET

Ertuğrul, Barış. Sunitinib Dirençli Böbrek Kanseri Hücre Serilerinde, Direnç Yanıtında Etkili Gen Ekspresyonlarının, Süksinik Asit Tedavisi Sonrası Karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp AD. Doktora Tezi. İstanbul. 2023.

Kanserde ilaç direncinin üstesinden gelebilmek, tedavilerde tümörü etkisizleştirebilmek adına önemli bir konudur. Hastalarda, renal hücreli karsinoma tedavilerinde sıklıkla kullanılan sunitinibe gelişen direnç, sağkalım ve tedavi başarısını zedelemektedir. Sunitinibe karşı oluşan bu direnci kırmaya yönelik yapılan çalışmalar, özellikle etkin bir ikinci terapötik ajanın sunitinib kombinasyonunda kullanımı şeklinde uygulanmaktadır. Ancak karmaşık yapısı düşünüldüğünde, topyekün direnç mekanizmasının kolay anlaşılması ve tedavi uygulamalarında kullanılan ajanların tek seferde başarılı olabilmesi pek kolay olamamaktadır. Özellikle kendilerine sürekli farklı bir kaçış yolağı bulan kanser hücreleri, anjiyogenez yeteneği çok yüksek olabilen renal hücreli kanser için de önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Doğal bir dikarboksilik asit olan süksinik asitin apoptotik ve antiproliferatif etkileri daha önceki çalışmalarımızda farklı kanser hücre hatlarında gösterilmiştir. Süksinik asitin bu yönleri ile kullanımı amaçlanarak, tez çalışmamızda, sunitinib ile kombinasyondaki tedavi başarısı ve sunitinib direncine karşı anjiyogenez ilişkili yolaklardaki etkinliği ACHN böbrek kanseri hücre serisinde incelenmiştir.

Sunitinib direnci oluşturulan ACHN hücrelerinde süksinik asit ile kombine edilen sunitinib tedavisi öncesi ve sonrasında, VEGF-A, VEGF-C, PDGF-A, HIF-1A, TGF- β , VHL, ANGPT1 ve TIE2 gen ekspresyonları ile, VEGF-A, HIF-1A ve VHL'nin protein ekspresyonları incelenmiştir.

Çalışmamızda sunitinibe dirençli grupta süksinik asitin 25 μ M doz kombinasyon tedavisi sonrasında dirençli kontrol grubuna kıyaslandığında, HIF-1A, TGF- β , ANGPT1 ve TIE2 gen ekspresyon seviyelerini azalttığı bulunmuştur.

Çalışma sonuçlarımız, renal hücreli karsinomada sunitinibe karşı gelişen dirençle alevlenen anjiyogenik faktörlerin, çalışmamızda incelenen hedeflerle ilişkili diğer kontrol noktalarında yapılacak ileri çalışmalarla, süksinik asitin tedavide kullanımına öncülük edecek bir aracı olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler : Süksinik asit, renal hücreli karsinom, sunitinib direnci, anjiyogenez, ilaç direnci

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 36717



ABSTRACT

Ertugrul, B. Comparison of Gene Expressions in the Resistance Response in Sunitinib-Resistant Renal Cancer Cell Lines Following Succinic Acid Treatment. Istanbul University, Institute of Graduate Studies in Health Sciences, Department of Molecular Medicine. PhD Thesis. Istanbul. 2023

Overcoming drug resistance in cancer is vital to inactivate the tumor in treatments. Resistance to sunitinib, which is widely used in renal cell carcinoma treatments, affects survival. Studies to prevent this resistance are being applied through the use of an effective second therapeutic agent in combination with sunitinib. Considering the complex nature of the resistance mechanism, agents used in treatment applications are not simple to be successful at once. Cancer cells, which constantly find a different escape route, are also a problem for renal cell cancer, which can have a very high angiogenesis ability. The apoptotic and antiproliferative effects of succinic acid, a natural dicarboxylic acid, have been demonstrated in different cancer cell lines in our previous studies. In this study, following succinic acid treatment, sunitinib-resistant renal cancer cell line were investigated via angiogenesis-related pathways.

Sunitinib resistance developed ACHN, VEGF-A, VEGF-C, PDGF-A, HIF-1A, TGF- β , VHL, ANGPT1, and TIE2 gene expressions before and after sunitinib treatment combined with succinic acid, VEGF-A, HIF-1A protein expressions of α and VHL were investigated.

HIF-1A, TGF- β , ANGPT1 and TIE2 gene expression levels were significantly decreased in the sunitinib-resistant group compared to the resistant control group after 25 μ M dose combination therapy of succinic acid.

Our study results suggest that angiogenic factors that increase with resistance to sunitinib in renal cell carcinoma may lead to the use of succinic acid in treatment with further studies on other checkpoints related to the targets examined in our study. Key Words: Succinic acid, renal cell carcinoma sunitinib resistance, angiogenesis, drug resistance

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 36717

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Amerika’da 2021 verilerine göre yılda 76 000 böbrek ve renal pelvis kanserli vaka tanımlanacağı bildirilmiş olup, bunlardan 14 000’e yakın bir kısmının ise hastalık nedenli mortaliteyle sonuçlanacağı öngörülmüştür. Erken teşhis yöntemlerinin zamanla daha yaygınlaşarak, başarıya ulaşmasıyla birlikte böbrek kanseri insidansı giderek artmaktadır. Renal hücreli karsinom (RHK), böbrek tümörlerinin %90’a yakın bir kısmını temsil ederken, bunların arasında da en yaygın tip olarak berrak hücreli renal hücreli karsinom ((bhRHK) gelmektedir (1).

RHK risk faktörleri arasında sigara, hipertansiyon ve obezite başı çekmektedir (2). En yaygın genetik risk faktörleri arasında; von Hippel–Lindau (VHL), polybromo-1 protein (PBRM-1) ve BRCA1-ilişkili protein 1 (BAP1) ile ayrıca hipoksi ve rapamisinin memeli hedefi (mTOR) yolağındaki mutasyonlar gelmektedir (3). Tümörün yerleşimi, metastaz yeteneği ve evresi sağkalım üzerinde oldukça belirleyici unsurlar arasında gelmekte olup, tedavi sürecinde kullanılacak ajanların tercihinde de ayrıca önemli bir yere sahiptir. Metastaz yeteneğine sahip RHK’ler daha agresif bir yönde seyredeceği için, tedavi seçeneklerinde de farklı yaklaşımları ve çoğunlukla tedavi ajanlarına karşı gelişebilecek olan direnç karşı hazırlıklı olmayı ve çok hızlı alınması gereken reaksiyonlarla, bu dönemlerde tedavi başarısına odaklanmaktaki hassasiyete duyulan ihtiyacı beraberinde getirmektedir (4). Daha önceki dönemlerde izlenen, genel bağışıklık sistemini güçlendirmek üzerine kurulu sitokinlerle tedavi mentalitesinden uzaklaşarak, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve diğer tirozin kinazların hedeflendiği daha spesifik tedavilere doğru bir yönelim olmuştur. Son dönemdeki başlıca sunitinib, sorafenib, pazopanib, aksitinib ve daha birçok tirozin kinaz; c-Kit, VEGF, PDGF, FLT3, RET, TIE2 gibi noktaların bir veya birkaçını hedefleyerek etki göstermektedir. Ayrıca immün bir kontrol nokta inhibitörü ile de tedavideki başarının artırılması hedeflenmektedir (5, 6). Tedavi ajanları ve sürece katılan yenilikler, eskiye nazaran tedavi başarısını belirli bir noktaya taşımış olsa da, hastaya uygunluk, etkin ajanların kombinasyonunda ve sonrasında gelişen tümörlerin farklı yanıtlar vermesi gibi konularda aşılamayan problemler hala süregeldiğinden, özellikle toksisitenin düşürülerek, sağkalımın artmasına yönelik yeni arayışlar devam etmektedir (7).

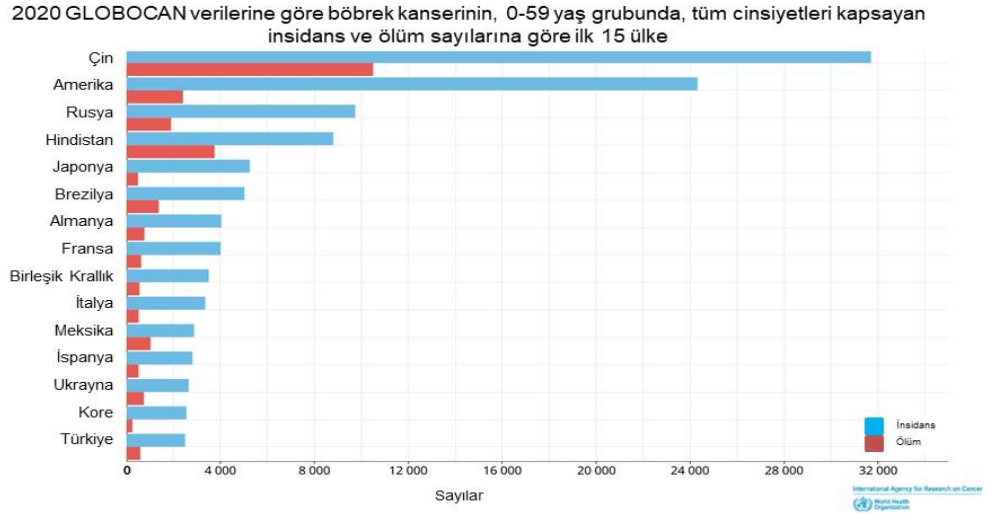
Sunitinib malat, VEGF reseptörünü ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörünü hedef alan, metastatik RHK tedavilerinde oral olarak kullanılan çoklu tirozin kinaz inhibitörlerinden biridir (8). RHK hastalarının çok büyük bir kısmı erken dönemde tedaviye karşı ilaç direnci gelişimine bağlı, hastalığın nüksü ile karşı karşıya kalmaktadır. Tüm yeniliklere rağmen, sunitinibe direnç gelişiminde etkin role sahip tümör ve diğer mekanizmaların karmaşık bir seyir izliyor olması, henüz net bir başarı için zemin oluşturulmasını engellemektedir. Son dönemde bu sorunu aşabilmek adına, özellikle anjiyogenez faktörlerinin hedeflenmesine yönelik, sunitinibe ek ikincil bir ajan kullanımı ile kombinasyon temelli tedavi arayışları hız kazanmıştır (9).

Apoptotik ve kanser hücrelerinin proliferasyonundaki inhibe edici yönlerini daha önceki tez projesi çalışmalarımızda endometrium (10), lösemi (11) ve böbrek kanseri (12) hücre hatları üzerinde ortaya koyduğumuz süksinik asitin, metabolik süreçlerin doğal bir ürünü ve sağlıklı hücrelerde toksik etkisi bildirilmemiş bir dikarboksilik asit olarak (13), doğrudan kanser hücrelerini hedefleyerek kullanımı amaçlanmıştır. Tez çalışmamız kapsamında süksinik asitin, sunitinibe karşı direnç geliştirdiğimiz metastatik RHK hücre hattı olan ACHN üzerinde, sunitinib tedavisi öncesinde ve sonrasında, dirençli hücre grupları üzerindeki, özellikle anjiyogenez ilişkili VEGF-A, VEGF-C, PDGF-A, HIF-1A, TGF- β , VHL, ANGPT1 ve TIE2 gen ekspresyonlarında meydana getirdiği yanıtlar incelenip karşılaştırılarak, sunitinib direnci gösteren hastalarda, anjiyogenez temelli hedeflere yönelik tedavi uygulamalarındaki noktalara katkı sunmak amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbrek Kanseri ve Epidemiyolojisi

Böbrek kanseri, yetişkin erkeklerde %5, kadınlarda ise %3 oranında görülen, tüm insan kanserleri arasında erkeklerde 7., kadınlarda ise 10. sırada seyreden bir kanser türüdür (14). Yıllık insidansı son dönemde, özellikle gelişmiş ülkelerdeki ilerleyen tanı ve görüntüleme yöntemleri ile hastalığa altyapı oluşturan çeşitli ajanlara karşı artan maruziyetlere bağlı artmış olsa bile erken teşhis yöntemleri sayesinde mortalitenin özellikle gelişmiş ülkelerde düştüğü rapor edilmiştir (15). Hastalığın temelinde yatan risk faktörleri değerlendirildiğinde; aile öyküsü, obezite, hipertansiyon, sigara ve çeşitli kimyasal ajanlara maruziyetin başı çektiği bilinmektedir (16, 17). Küresel kanser insidans, mortalite ve prevelansı (GLOBOCAN) tarafından 2020 yılına ait yayınlanan veriler incelendiğinde, dünya genelinde, 2020 yılında böbrek kanseri teşhisi alan vaka sayısı 431 288 ve bu kansere bağlı ölüm sayısı ise 179 368 olarak bildirilmiştir (18). Amerikan Kanser Derneği'nin yayınladığı raporlara göre ise 2022 yılında 79 000 yeni vaka ekleneceği tahmin edilmiş, bunun 50 290 erkek, 28 710 kadın olarak dağılması, toplamda ise yaklaşık 13 920 kişinin de hastalığa bağlı ölümü öngörülmüştür. Raporda, 2009-2018 arasında böbrek kanseri için yıllık insidansın %1 oranında arttığı belirtilmiştir (19). 2009-2015 yılları arasında Amerikada 5 yıllık sağkalım oranları incelendiğinde, böbrek karsinomlarının %76 oranı ile en ölümcül ürolojik kanser olarak işaret edildiği görülmektedir. Sağkalım oranının düşük olmasında, metastatik gücün artışı ve lokalize tümörlerin bölgesel yayımlara geçiş noktasına evrilmesi etkilidir (20). Türkiyede 2012-2015 arasındaki dönem için, böbrek kanseri insidansı %4,57 olarak bildirilmiştir (21). Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Türkiye Kanser İstatistikleri tarafından 2021 yılında yayınlanan ve 2013-2017 yıllarını kapsayan verilere göre, böbrek ve renal pelvis kanseri vaka sayıları sırasıyla 11 153 ve 362 olarak bildirilmiş olup, ayrıca ülkemizdeki erkekler için tüm yaş gruplarında en sık görülen 7. kanser olarak sıralanmıştır (22). Diğer taraftan, Şekil 2-1 üzerinde gösterildiği gibi, 2020 yılı GLOBOCAN verilerine göre Türkiye, dünya ülkeleri arasında böbrek insidans ve ölüm oranları bakımından değerlendirildiğinde, ilk 15 ülke arasında yer aldığı görülmektedir (23).



Şekil 2-1: Böbrek kanseri insidans ve mortalitesinin, dünya ülkelerindeki dağılımı (23)

2.2. Renal Hücreli Karsinomlar

Böbrek kanserlerinin en sık görülen tipi, %80-85’lik dilimini oluşturan “renal hücreli karsinom” (RHK)’dur (24). En yaygın klinik semptomlar arasında; kanlı idrar, bel ağrıları, yorgunluk, iştahsızlık, anemi ve karında belirgin kitlelerin varlığı sayılmaktadır (25). Tümörün lokal veya uzak yayılımına atfedilemeyen semptom ve bulgular olarak tanımlanan paraneoplastik sendromlar RHK ürolojik maligniteler ile sıklıkla ilişkilidir (26). Ancak belirtiler hastaların çok az bir kısmında görülmekle birlikte, hiperkalsemi, eritrositozis gibi paraneoplastik sendromların da eşlik ettiği metastatik tümör varlığında (27), birçok hastaya çok ileri evrelerde tanı konulabilmesine yol açmaktadır (28). Bu da metastaz yeteneği artan RHK olgularında, özellikle kemik, beyin, akciğer, karaciğer ve adrenal bez metastazına sebebiyet vermektedir (29). Tüm bunların aksine, ilerleyen teknoloji ile birlikte özellikle gelişmiş ülkelerde olmak üzere, güncel bilgisayar temelli görüntüleme tekniklerinden, tomografi, magnetik rezonans görüntüleme ve ultrasonografinin kullanımı, renal kanserin erken teşhis edilmesine büyük katkılar sağlamıştır (30, 31).

2.3. Histolojik Alt Tipleri

Yaklaşık yirmi yıl önce, RHK’ler şeffaf hücreli ve granüler hücreli varyantlar olarak ikiye bölünmüştü (32), ancak günümüzde ise 2004 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflandırmasına göre, birkaç histolojik RHK alt tipi tanımlanmış olup, yine 2022

yılında güncellenen ancak temelde en sık görülen histolojik alt tipler olan, bhRHK, papiller renal hücreli karsinomlar ve onkositik-kromofob renal hücreli karsinomları içermekte olup, bu üç alt tip birlikte tüm RHK'lerin %90'ından fazlasını temsil etmektedir (33-35). RHK sınıflandırması, son DSÖ 2022 güncellemeleri göz önüne alınarak, Singh ve ark.'nın yaptığı çalışmadaki tablodan uyarlanarak (36), Tablo 2-1 üzerinde gösterilmiştir.



Tablo 2-1: Renal Hücreli Karsinomaların Sınıflandırılması.
(Singh ve ark., 2020'den değiştirilerek uyarlanmıştır).

<i>Alt Tip</i>	<i>İnsidans</i>
<i>Berrak hücreli tip</i> İleri evrede ve metastazlarla eşlik eder. Vakaların %90'ında von Hippel-Lindau tümör baskılayıcı geni kromozom 3 bölgesinde değişimler görülür.	%70-90
<i>Papiller tip</i> Düşük evrelerde veya hastalığın çıkış noktasında tespit edilir. Çoğunlukla agresif bir tiptir.Y kromozomlarının 7 ve 17. bölgesinde mutasyonlara neden olur.	%10-15
<i>Onkositik ve kromofob tip</i> Tanıda böbrekle sınırlı tümör özelliğinde, genelde iyi prognoz gösterir. Hipodiploidi, mutasyonlar çoklu kromozom sayı kopyasına neden olur.	%5
<i>Toplayıcı duktal karsinoma</i> Renal medulladan kaynaklanan, agresif bir tiptir. Gama glutamil transferaz aktivitesindeki artış barizdir. Sağkalım 2 yılın altında seyreder.	%1
<i>Diğer renal tümörler</i> – Berrak hücreli papiller renal hücreli tümör – Müsinöz tübüler ve içsi hücreli karsinom – Tübülökistik renal hücreli karsinom – Edinilmiş kistik hastalıkla ilişkili renal hücreli karsinom – Eozinofilik solid ve kistik renal hücreli karsinom – Renal hücreli karsinom NOS	%1
<i>Moleküler ilişkisi tanımlanmış renal tümörler</i> – TFE3- TFEB translokasyonları – Fumarat-hidrataz enzim eksikliği – Süksinat dehidrogenaz enzim eksikliği – ALK-translokasyonları – SMARCB1 eksikliği	Nadir

2.4. Renal Hücreli Karsinomların Evrelemesi

RHK için evreleme, ilk olarak Robson sınıflandırması temel alınarak oluşturulmuş (37), ardından Uluslararası Kanser Savaş Örgütü ve Amerikan Kanser Ortak Komitesi tarafından da geliştirilerek tümör, lenf nodu, metastaz (TNM) sistemi olarak kullanılan günümüzdeki halini almıştır (38). Tümör T evresi: T0 evresinden T4 evresine kadar beş aşamadan oluşur. Evre T1, T2 ve bunların alt bölümleri sadece boyuta göre tanımlanırken, T3 ve T4 evreleri renal vene, inferior vena kavaya, Gerota fasyasına ve ipsilateral adrenal beze lokal bölgesel yayılma özelliklerine göre gruplandırılır. Tümörün bölgesel lenf nodu oluşturma yetenekleri yönünden ise N0 ve N1 olarak; uzak bölgelere metastaz yapabilme durumlarına göre ise M0 ve M1 olarak değerlendirilmektedir (Tablo 2-2) (38, 39).

Tablo 2-2: TNM sistemine göre renal hücreli karsinom evrelemesi.
(Tablo Ridge ve ark., 2014'den değiştirilerek uyarlanmıştır).

Evre	Altsınıf	Tanım
Tümör Evresi		
T0	Primer tümör belirtisi yok	
T1	1a: < 4 cm 1b: > 4 cm ve < 7 cm	< 7 cm en büyük boyutta, böbrekle sınırlı
T2	2a: > 7 cm < 10 cm 2b: > 10 cm	> 7 cm en büyük boyutta, böbrekle sınırlı
T3	3a: Tümör renal ven dallarına uzanmaktadır veya perirenal ve/veya renal sinüs yağını invaze etmektedir 3b: Tümör subdiyafragmatik inferior vena kavaya uzanır 3c: Tümör supradiyafragmatik inferior vena kavaya uzanır	Büyük damarlara veya perinefrik dokulara uzanır, ancak ipsilateral adrenal beze veya Gerota fasyasının ötesine geçmez
T4	Tümör, Gerota fasyasının ötesine ve/veya ipsilateral adrenal bezin bitişik uzantısına invazedir	
Bölgesel Lenf Nodu Durumu		
N0	Bölgesel lenf nod metastazı yok	
N1	Bölgesel lenf nodlarına metastaz görülür	
Uzak Metastaz Yeteneği		
M0	Uzak metastaz yok	
M1	Uzak metastaz görülür	

Ayrıca, nükleer morfolojinin temel alındığı diğer bir sınıflandırma 1982 yılında Fuhrman'ın önerdiği dört kademeli sistem olup, uzun yıllar temel alınarak kullanılmıştır (40). Ancak nükleolar belirginliğin net bir ayrımının dikkate alınarak yeni bir

sistematğin oluşturulması zamanla gereklilik gösterdiği için, 2012 yılında Uluslararası Ürolojik Patoloji Derneği (ISUP)'nin önerisi doğrultusunda, DSÖ tarafından da onaylanan ortak bir DSÖ/ISUP evreleme sistemi gündeme getirilerek kullanılmaya başlanmıştır (41). Bunun yanında Delahunt tarafından da, tümör nekroz varlığı ile ilişkilendirilerek kromofob tip renal karsinom için bir sınıflandırma sistemi de ayrıca sunulmuştur (42). Bu üç sistem arasındaki farklar, ve tanıda ayırıcı özellikler olarak kullanılan ayrıntılardan nükleol varlığı ile morfolojik durumları, nekroz varlığı ve çekirdek büyüklükleri arasındaki belirgin detaylar Tablo 2-3 üzerinde gösterilmiştir.



Tablo 2-3: Fuhrman, Delahunt ve DSÖ/ISUP sınıflandırmaları.
(Rabjerg ve ark., 2021'den değiştirilerek uyarlanmıştır).

Evreleme Sistemi	Fuhrman	DSÖ / ISUP	Delahunt
Evre I	Küçük ($\approx 10 \mu\text{m}$) yuvarlak tekdüze çekirdekler, nükleol yoktur veya göze çarpmaz	$\times 400$ büyütmede yok veya bazofilik, göze çarpmayan nükleol	ISUP Evre I gibi, ek olarak nekrozlu/nekrozsuz ve nekrozsuz ISUP Evre II özellikleri
Evre II	Dış hatları düzensiz olan ve $\times 400$ büyütmede görülebilen büyük nükleollü ($\approx 15 \mu\text{m}$) çekirdekler	Çekirdekçik $\times 400$ büyütmede belirgin eozinofilik bir morfoloji, ancak $\times 100$ büyütmede belirgin değil	Nekrozlu bir ISUP Evre II ve nekrozsuz ISUP Evre III şeklinde temsil edilebilir
Evre III	Düzensiz dış hatlara ve $\times 100$ büyütmede görülebilen nükleollere sahip büyük çekirdekler ($\approx 20 \mu\text{m}$)	Nükleol belirgin ve $\times 100$ büyütmede eozinofilik morfoloji	Nekrozlu ISUP Evre III ve nekrozsuz ISUP Evre IV
Evre IV	Çok loblu dev hücreler ve ağır kromatin yığınları ile büyük, pleomorfik hücreler, aşırı düzensiz görünüm	Rabdoid veya sarkomatoz farklılaşma, dev tümör hücreleri ve kromatin kümelenmesi ile aşırı nükleer pleomorfizm	Nekroz veya sarkomatoid/rabdoid özelliklere sahip ISUP Evre IV

2.5. Renal Hücreli Karsinomlarda Genetiğin Rolü

RHK'ler gösterdiği genetik heterojenite sebebiyle tedavide kullanılan ajanlara farklı yanıt verilmesine neden olmakta, dolayısıyla sağkalıma dair başarıyı da tehdit etmektedir. von Hippel–Lindau (VHL) gibi oksijen duyarlılığını, Polibromo 1 (PBRM1) gibi kromatin bütünlüğünü düzenleyen genlerdeki mutasyonlar sıklıkla görülür (43). Kromozom 3 kısa kolunda 25-26 mutasyonları renal hücreli karsinomların %90'ında temsil ediliyor olup, öncelikle VHL gen aktivasyonunun kaybına neden olmakta ve buna

bağlı olarak, hipoksi ile indüklenabilir faktör-1 α (HIF-1A) ve hipoksi ile indüklenabilir faktör-2 α (HIF-2 α) protein seviyelerinde artış üzerinden vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) gibi anjiyogenez öncülerini tetikleyerek tümörogeneze öncülük etmektedir (43, 44). VHL, MET, FLCN, fumarat hidrataz (FH), süksinat dehidrojenaz (SDH), TSC1 ve TSC2 genleri, oksijen, demir, enerji ve/veya besin ilişkili yollarda yer alarak böbrek kanserine zemin oluşturabilir. Trikarboksilik asit (TCA) döngüsündeki enzimlerinden FH ve SDH enzim defektleri olgularında, TCA döngüsünün işlevinin bozulmasıyla hücre, enerji üretimi için glikolize bağımlı hale gelir, bu enzimlerin aktivasyon kaybı, pirolil hidroksilaz domain (PHD) işlevini bozarak, HIF işlev kaybında VHL'den bağımsız bir rol oynar (45). Öte yandan renal hücreli karsinomalarda en sık rastlanan diğer mutasyonlardan, PBRM1 ve KDM5C'nin her birinin tek başına veya birlikte işlev kaybı, kazanılan anjiyojenik özelliklerle ilişkilendirilirken, CDKN2A/B ve TP53 dahil olmak üzere tümör baskılayıcı genlerin işlev kaybı ise, proliferasyon ve anabolik metabolizma hızında kazanılan artış yetenekleri ile, tümörü destekleyici kayıplar olarak ilişkilendirilmiştir (46). PBRM1, HIF yanıtına neden olarak, VHL mutasyonlarının görevini destekleyici yönde davranır. Yapılan hücre kültürü çalışmasında, PBRM1 gen ifadesi eksiltelen hücrelerde, DNA metiltransferaz inhibitörü olarak kullanılan tedavi ajanının etkinliğinin arttığı, tümör baskılayıcı XAF1 geninin yeniden aktive edilerek p53 sinyal yolları aracılığıyla, hücre döngüsünün G2/M fazında durdurulmasıyla apoptozun tetiklendiği gösterilmiştir (47). SETD2 mutasyonlarıyla birlikte görüldüğünde de kötü prognozun oldukça güçlü bir şekilde tetiklendiği değerlendirilmiştir (48). SETD2, normal koşullar altında histon proteinlerini metilleyerek kromozom stabilitesinde görev alırken, renal hücreli karsinomda yaygın olarak mutasyona uğrayan bir proteindir (49). BRCA1 ilişkili protein 1 (BAP1) ise, kromozom 3 kısa kolunda yerleşim gösteren, tümör baskılayıcı genlerden olup, somatik mutasyonların yaklaşık %10 kadarının renal kanserlerle ilişkili olduğu bilinen önemli bir belirteçtir. Hücre döngüsü kontrol noktaları, DNA hasar tamiri, kromatin modifikasyonu, programlı hücre ölümü gibi birçok belirleyici işleyiş içerisinde deubikinasyon etkinliği göstererek, tümör baskılayıcı bir yönde davranırlar. BAP1 gen mutasyonları uveal melanom, malign mezotelyoma, kutanöz melanom (50) ve özellikle ilerlemiş renal hücreli karsinom gibi birçok agresif kanserle ilişkilendirilmiştir (51). PBRM1, BAP1 ve SETD2, VHL mutasyonlarına eşlik ederek renal hücreli

karsinomların agresiflik derecesini belirleyen yaygın kromozom 3 kısa kolu mutasyonları arasında temsil edilmektedir (52).

MET, reseptör tirozin kinaz c-Met'i kodlayan bir proto- onkogendir (53). Hepatosit büyüme faktörü (HGF) bu reseptör için ligand olarak işlev görüyor olup, HGF'nin c-Met'e bağlanması, normal hücrelerde embriyogeneze ve yara iyileşmesi ile ilgili bir dizi hücre içi sinyalin öncüsüdür. Diğer taraftan, kanser hücrelerinde görülen c-Met gen mutasyonları, HGF/c-MET yolağında anormal bir aktivasyona neden olarak, PI3K/Akt, Ras/MAPK, JAK/STAT, SRC, Wnt/ β -katenin gibi sinyalizasyon yollarının aktive ederek tümör gelişimini teşvik eder (54). Sağlıklı bir böbreğin aksine, c-Met yukarı yönlü düzenlenmesi RHK için tedavi direnci ve hastalığın ilerlemesi ile ilişkili olarak değerlendirilmiş olup, tedavi hedefi olarak da kullanılmış ancak ilaca gelişen direnç nedeniyle başarı elde edilememiş hedeflerdendir (55). Rapamisinin memeli hedefi (mTOR) sinyalizasyon yolağı, TSC1, TSC2, PI3K/Akt, özellikle PTEN olmak üzere bu geçişlerdeki haberleşme adımlarındaki noktalarda bir veya birden fazla kontrol noktasında meydana gelebilecek mutasyonlar renal hücreli karsinoma gelişimine elverişli bir ortamın altyapısını rahatlıkla sağlayabilir (56).

Follikulin (FLCN), bir tümör baskılayıcı gen olarak, Birt–Hogg–Dubé (BHD) hastalığına sahip bireylerde tespit edilerek isimlendirilmiş bir proteindir (57). Yapılan çalışmalarda FLCN gen mutasyonlarının özellikle BHD bireylerde, mTOR yolağının daha aktif bir forma dönüşüp, kontrolsüz büyümeye ortam hazırlaması ile tümoreenez aşamasına ortam hazırladığı görülmüştür (58). FLCN etkinliğinin HIF-2 α üzerindeki etkisini HIF-2 α 'ya bağlanarak siklin D1 and MMP9 ekspresyonlarını baskılamak yoluyla hücre proliferasyon ve invazyon noktasındaki yeteneklerini kısıtlamak yönüyle gerçekleştirdiği öngörülmüştür. FLCN gen knockout yapıldığında, yıkımı kısıtlanan HIF-2 α 'nın çekirdeğe girişinin mümkün kılındığını ve tipik agresif tümör yeteneklerinin kazanımına neden olduğu görülmüştür (59). TSC1 ve TSC2 sırasıyla kromozom 9q34,37 ve kromozom 16p13.3 üzerinde yerleşim gösteren ve tüberöz skleroz ilişkili olan bu genlerin mutasyon sonucu inaktifleşmesiyle (60), bu bölgedeki inhibe edici etki kaybolduğunda, kritik noktalardan biri olan mTOR kontrolünün de kaybolmasıyla oluşan, renal lezyonlar ve renal kanser ile ilişkili bulgulardan bahsedilmiştir (61, 62).

Süksinatı fumarata dönüşümü için hidroksile eden SDH enzim kompleksi dört protein alt biriminden (SDHA, SDHB, SDHC ve SDHD) oluşur ve fumarat hidratazı kodlayan FH ile birlikte trikarboksilik asit döngüsünün önemli elemanlarından (63,

64). Hem FH hem SDH, her ikisi de elektron transport zincirinin yanı sıra sitrik asit döngüsüne de katkıda bulunan iç mitokondriyal zarın önemli birimleri olup, tümör inhibisyon etkinliğine sahiplerdir (65). Mitokondriyal enzimler FH ve SDH için SDHB/C/D alt birimleri kodlayan nükleer genlerdeki germ hattı mutasyonları, papiller renal hücreli karsinom-2, kalıtsal leiomyomatoz, renal hücre kanseri ve kalıtsal paragangliomatozis (HPGL) olarak adlandırılan tümör sendromlarının gelişimine neden olabilmektedir (66-68). Herediter leiomyomatosis ve renal hücreli kansere sahip bireyler, oldukça malign ve agresif olabilen RHK gelişimine yatkınlık gösterirler. Azalan FH seviyelerinin, HIF-2a birikmesine yol açarak renal karsinogenezi teşvik ettiği, ayrıca FH'nin aşırı ekspresyonunun hücre göç ve invazyonunu baskıladığı ortaya konulmuştur (69). FH ve SDH eksikliği olan tümörlerde, substratların, fumarat ve süksinat birikmesine ve dolayısıyla HIF-1A stabilizasyonuna da neden olduğu gösterilmiştir (70).

Normal fonksiyonu bozulmamış bir hücre için tümör baskılayıcı işlev gören p53, ancak mutasyon durumunda birçok farklı kanser tipi için bugüne kadar sorumlu tutulan önemli genlerden yalnızca birisidir. Renal kanserlerle mutasyon yönünden ilişkisi için literatürde net bir fikir birliğine ulaşılamamış olsa da, bazı çalışmalar, p53'ün böbrek kanseri dokularında yüksek oranda ifade edildiğini ve bunun sonucu olarak p53'ün böbrek kanserini teşvik edici bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir (71, 72). Özellikle, hastalarda çok düşük bir sağkalım yüzdesi ve çok agresif bir hastalık seyrine neden olduğu bildirilmiştir (73). Bunun yanında MDM2 ve p53 birbirinden bağımsız düşünülmemesi gerekeceği için, bu ikilinin seviyelerine ilişkin bulgular, renal kanserlerde mutasyon anlamında olmasa da, ekspresyon seviyelerinin artışı üzerinden değerlendirilerek hastalığın seyri ile ilgili bilgi sunabilecek etmenlerdendir (74). Literatürdeki p53 ekspresyonunun RHK hastalık prognozu için tartışmalı olmasının nedeni, RHK dokusundaki p53'e ait vahşi tip, mutant tip ayrımının yapılamaması, vahşi tip p53'ün düşük seviyelerde eksprese edilmesi nedeniyle kanserde tespit edilememesi, ayrıca p53'ün MDM2 aracılı bağlanması, birçok yerde bulunması gibi sebeplere dayandırılmaktadır (75).

2.6. Anjiyogenez süreci ve ilişkili genler

Anjiyogenez, normal ve tümör hücrelerinin besin, oksijen ve kan damarları gibi kaynaklara ulaşabilmesi ve olgunlaşma dönemlerini tamamlayabilmeleri açısından

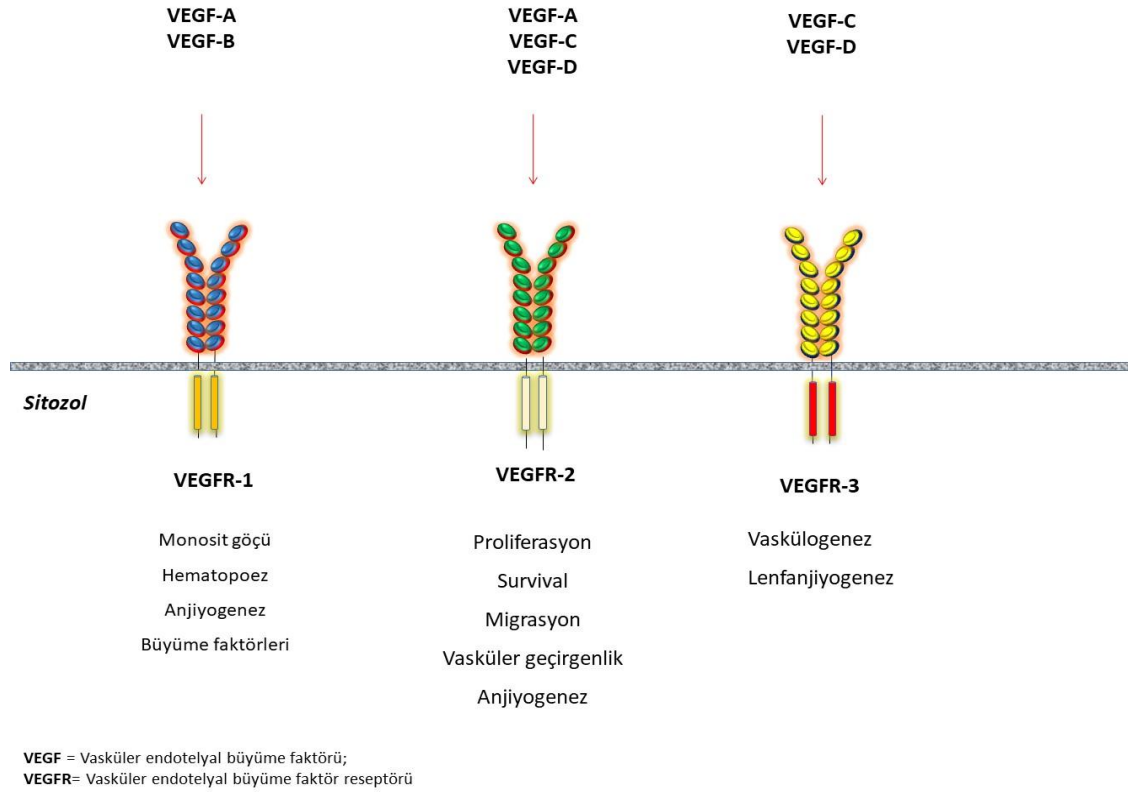
önemli bir süreçtir. Özellikle tümör kitlesi gelişip yayılabilmek, yeni damarlarla taşınacak kaynaklara ulaşabilmek, ve diğer organlara metastaz adımını sağlamak için şiddetle anjiyogeneze bağımlıdır. Bu karmaşık yol haritasında yer alan genler, bir diğerinin aktivitesini tümörün gelişimine katkı sağlayacak biçimde gen ekspresyonunu artırmak veya tümör baskılayıcı genler üzerinde inhibe edici etkiler göstermek yoluyla sonuçlandırmaktadır (76). Neoplastik hücre gelişimi ve ilerlemesinden sorumlu biyolojik mekanizmalar özellikle metastatik berrak hücreli renal karsinomun evrilme sürecinde de elzem role sahiptirler. Tümörün gelişim basamaklarında, malignitenin oluşumunu tamamlayabilmesi için tümör anjiyogenezi, patolojik tümör metabolizmasına, genetik istikrarsızlığa, enflamasyona, mikroçevresel bozulmaya, tümör hücre invazyonuna ve metastaz yeteneklerinin güçlenebileceği tarzda elverişli bir ortama temel oluşturur. Anjiyogenezi uyarıcı ve baskılayıcı faktörler arasındaki denge için, oksijen seviyeleri oldukça önemli karar mekanizmaları olarak davranmaktadırlar. Anjiyogenezi uyarıcı etmenler arasında; VEGF, EGF, fibroblast büyüme faktörü (FGF), platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF), prostaglandin ve tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) sayılabilirken, anjiyogenezi inhibitörleri olarak ise anjiyostatin, trombospondinler, anjiyopoietinler, endostatin, osteospondin, vazostatin ve hücreler arası iletişim ağı faktörlerinden bahsetmek mümkündür (77). Anjiyogenik faktörlerden HIF-1 α ve HIF-2 α transkripsiyon faktörlerinin uyarılarak aktif hale gelmesine neden olan VHL tümör baskılayıcı genin bialelik inaktivasyon durumunun görüldüğü, vaskülerite yetenekleri yüksek derecede gelişmiş tümör olma özelliği, bHCHK'lerin en belirgin özelliklerindendir (78). Yine bu noktalarda oldukça etkili olan TGF- β , tümörün göç ve istila yeteneklerini kamçılayan, birçok kanserde olduğu gibi renal hücreli karsinomalar için de oldukça önemli bir noktadır (79). Anjiyopoietin (ANGPT) G1 ve TIE2 (TEK reseptör tirozin kinaz) arasındaki bağlantı, adeta kanser ve anjiyogenezi arasında bir köprüye benzetilebilir, bu noktada evrimsel gelişim sürecinin normal büyüme adımlarında da işlevsel bir kontrol noktasıdır ancak bu adımlardaki iletişimdeki aşırı sinyalizasyon veya baskılanma; anjiyogenezi, vaskülarizasyonu uyararak VEGF gibi faktörler üzerinden karsinogenezi tetikleyebilmektedir (80, 81). Tümörler, yüksek vaskülarizasyon kabiliyetlerine rağmen sıklıkla hipoksik bir ortam yaratır ve bu patolojik durum, apoptoz, nekroz olayları ile; lenfosit, nötrofil, makrofaj ve mast hücreleri gibi enflamatuvar hücrelerin birikimi ve aktivasyonuna sebebiyet verir. Öte yandan, anti-anjiyogenik tedavilerin, artan tümör hipoksisine neden olarak, metastatik

bir avantaj sağlayan epitelyal mezenkima geçişe (EMG) yol açtığı bildirilmiştir (82). Yine bu tedavilerin, hipoksi ile ilişkili olmayan edinilmiş direnç yanıtları ile tümör hücrelerinin metastatik gücünü perinleyebileceği belirtilmiş olup, bu tedavi hedeflemesinin, tümörün potansiyel metastaz yeteneklerine katkı açısından yararlı mı yoksa zararlı mı olacağı henüz aydınlatılabilmiş değildir. İlaça karşı gelişen dirençle ilgili yanıtları ortadan kaldırabilmek adına, geniş bir spektrumda etki gösterebilecek potansiyel bileşiklerin kullanılması soruna yönelik daha net czmler sağlayabilecektir. Uzun dönem tedavi gerektiren bu durum için, tedavi ajanlarının mutlak suretle toksisite yönünden ck düşük etkiye sahip olması önemli bir tercih sebebi ve başarı oranını artıracak bir etmendir. Kombinasyon tedavilerinin düşük dozlarda birlikte kullanımı, ilaç toksisitesini önemli derecede azaltarak tedavi yanıtını daha etkili kılabilir (83).

2.6.1. VEGF-A ve VEGF-C

VEGF, RHK hastaları için ck önemli bir tümör belirteci olup, anjiyogenez, neoanjiyogenez, adhezyon, migrasyon, hücre proliferasyonu ve apoptoz süreçlerinde merkezi rol oynayarak, metastatik renal kanserlere zemin hazırlar (84, 85). Özellikle VHL mutasyonlarının öncülük ettiği HIF disreglasyonları, VEGF, PDGF gibi anjiyogenez ilişkili genlerin ekspresyon artışı üzerinden, tümör gelişimine ve diğer yandan immün supresif yanıtının oluşmasına öncülük etmektedir (86). Artmış VEGF-A seviyeleri, renal kanser hastalarındaki sağkalımın daha kısa sürmesine neden olmaktadır. Farklı kanser türlerinde yapılan calışmalarda kanserli hücrelerdeki VEGF-A ekspresyon seviyelerinin, normal hücrelerdeki seviyelere oranla daha yüksek olduğu bildirilmiş olup, bu süreçlerde VEGF-A'nın, anjiyogenez sürecine olan katkısının doğrudan, ya da aynı zamanda diğer anjiyogenez ilişkili gen ekspresyonlarının teşvik edilmesiyle gerçekleştiğinin altı çizilmiştir (87-89). VEGF-C'nin RHK dokularındaki mesajcı ribo nükleik asit (mRNA) ekspresyon seviyelerinin, normal böbrek dokularına oranla daha yüksek seviyelerde olduğu, ve özellikle lenf nodu metastazı ile pozitif bir ilişki seyrettiği gösterilmiştir (90). Endotelyal lenfatik hücreler üzerinde, lenfanjiyogenezi teşvik ettiği bilinen ve embriyonik dönemde yüksek miktarlarda eksprese edilen VEGF-C'nin kanserdeki ařırđ ekspresyonları, iyi gelişmiş bir lenfatik damar ağı oluşumuna sebebiyet verdiğinden, lenfödemli hastalarda yeni terapötik strateji gerekliliğini de beraberinde getirir. VEGF, tirozin kinaz hücre reseptörlerine (VEGFR'ler) bağlandığı için, anti-VEGF ve anti-VEGFR hedefli tedavileri kullanılarak

kanserde veya diğer patolojik süreçlerde anjiyogenezi bloke etmek son derece önem teşkil etmektedir (85). VEGF birimlerinin renal kanser sürecinde tümör mekanizmasının yararına sundukları iletişim kanalları Şekil 2-2’de gösterilmiştir (91).



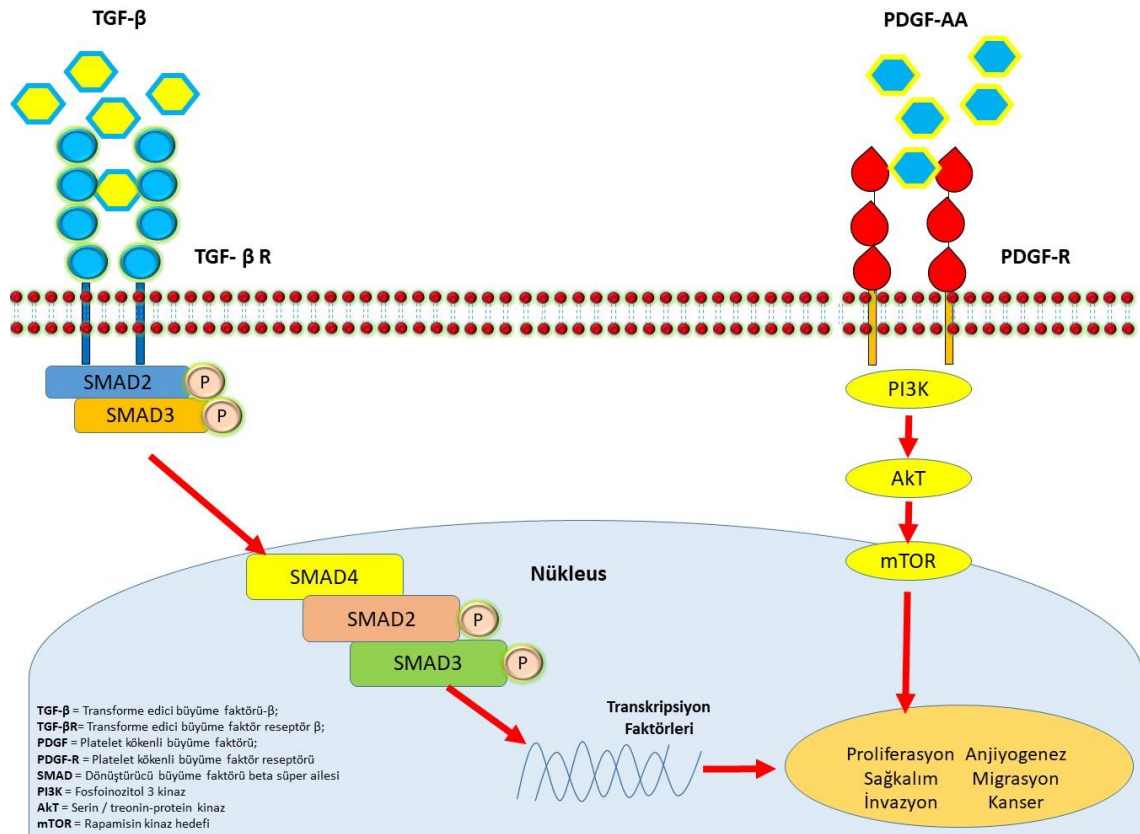
Şekil 2-2: VEGF sinyalizasyonunun tümör sürecinde tetiklediği mekanizmalar

(Lange ve ark., 2016’dan değiştirilerek uyarlanmıştır).

2.6.2. PDGF-A

PDGF ve reseptörleri, Şekil 2-3 üzerinde gösterildiği gibi embriyonel gelişim, doku onarımı, hücre göçü, çoğalması gibi rollere sahip olmasının yanı sıra, aşırı ekspresyonları veya çeşitli mutasyonlar sonucunda, özellikle anjiyogenez süreci ile ilişkili önemli bir fonksiyon merkezi gibi, otokrin ve parakrin etkiler göstererek, kanserin ilerleyişinde altyapı oluşturan başlıca genlerdendir. PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF,D olmak üzere 4 alt tip olarak ele alınan bu gen, reseptörlerine bağlarak aktive olurken, kontrolsüz eksprese edildiği durumlar için ateroskleroz, çeşitli kanserler, böbrek ve akciğer hastalıkları ile ilişkili olduğu bilinmektedir (92-94). Son dönemdeki çalışmalar, özellikle PDGF-B üzerine yoğunlaşmış olmakla birlikte, renal kanser ilişkisini daha güçlü biçimde destekler nitelikte olsa da, PDGF-A’nın bHRHK

evrelemesi ile oldukça ilişkili olduğunu, ve özellikle 3. ve 4. evre kanserlerin çok daha yüksek PDGF-A ekspresyonlarına sahip olduğuna işaret eden çalışmalar mevcudiyetini korumaktadır (95). Yapılan çalışmada, meme kanserinde FOXM1'in PDGF/AkT yolağını PDGF-A üzerinden aktive ederek, tümör oluşumunu güçlendirdiği gösterilmiştir (96). Farklı kanserler için PDGF-A ekspresyonları kötü prognoz ile ilişkili bulunmasına rağmen, Wilms'böbrek tümörlerinde, PDGF-A ve reseptörünün vakaların yarısında eksprese edildiği ve durumun iyi prognoz ile ilişkilendirildiği gösterilmiştir (97). VHL, HIF kontrol mekanizmasındaki aksaklıklarla birlikte, anjiyogenez ilişkili VEGF, PDGF gen ekspresyon seviyelerinin tetiklendiği bilindiği için bu noktalardaki kompleks mekanizmayı aydınlatmaya yönelik çalışmalar değerli olacaktır (86).



Şekil 2-3: PDGF sinyalizasyon basamakları

(Saito ve ark., 2017'den değiştirilerek uyarlanmıştır).

2.6.3. HIF-1A

HIF-1A temelde hipoksiye dayalı hücresel cevabı, indüklenebilir α-alt birimini stabilize ederek, post-translasyonel hidroksilasyonu ve ardından proteazom yoluyla bozulmayı önlemek suretiyle düzenlemektedir (98). Yarı ömrü kısa bir protein olan

HIF-1A, VHL proteini-E3 ubiquitin ligaz yoluyla üzerinden parçalanmaktadır. Temel olarak, büyüme faktörlerinin yanı sıra, O₂ bağımlı gerçekleşen bu aşamalar, normoksik koşullarda O₂ bağımlı prolin hidrolaz ile HIF-1A yıkımının gerçekleşmesiyle sonuçlanırken, diğer yandan hipoksik koşullar için sistemin etkisiz kalması ve dolayısıyla HIF-1A yıkımının gerçekleşmemesine neden olacaktır (99). VHL inaktivasyonunun neden olduğu süreçte, Şekil 2-4 içerisinde özetlendiği gibi HIF-1A ve HIF-2A yıkım mekanizmasının kontrol kaybına bağlı olarak özellikle bHbRHK hastalarında anjiyogenez, tümörögenез süreçleri ile gelişmiş vaskülarizasyon yeteneklerini bu anjiyojenik faktörlerin sürekli uyarımı ile kazanmaktadır (78). Diğer yandan, özellikle FH ve SDH enzim defekti kaynaklı süksinat ve fumarat birikiminin, HIF-1A yıkımını engelleyerek, stabilizasyonuna sebep olduğu ve bu durumun, HIF-1A aracılı düzenlenen tıpkı VEGF gibi anjiyogenez ilişkili genler üzerindeki ekspresyonu artırdığı aşikardır (66). HIF-1A ile ilgili, RbRHK hastalarında gerçekleştirilen çalışmaların bir kısmı onkojenik aktivite gösterdiği, bir kısmı da tümör baskılayıcı nitelikte olduğu fikrini öne sürmekte olup, bu genin bir biyobelirteç ve hedef olarak kullanılmasına ilişkin çalışmaların detaylandırılması gereklidir (75).

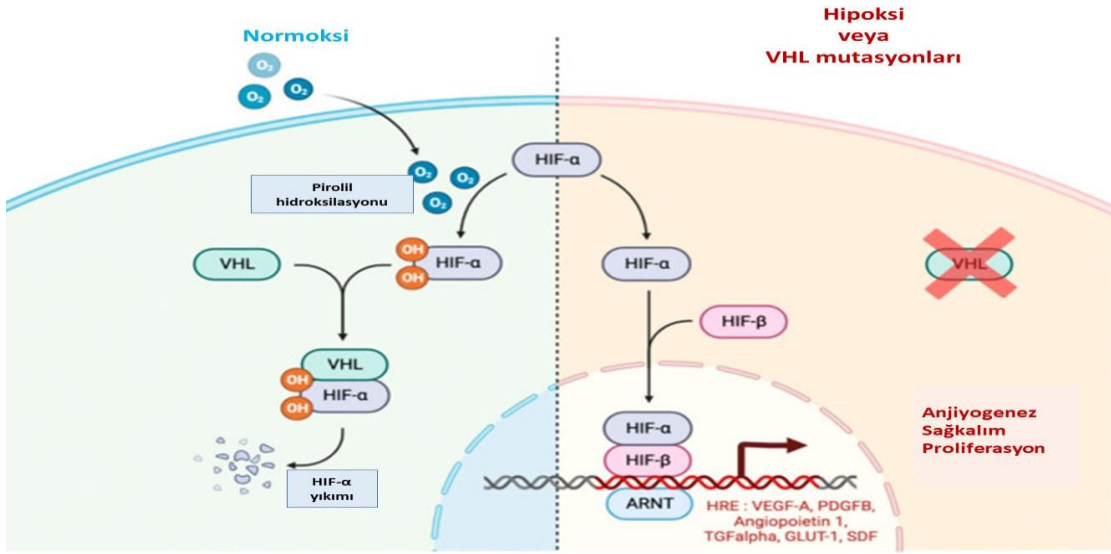
2.6.4. TGF- β

TGF- β üyeleri 3 izoformu (TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3), normal gelişim süreci ve hastalıklarla ilişkili olarak; embriyonik gelişim, hücre düzenlemesi, hücre farklılaşması, yara iyileşme, anjiyogenez, ve büyüme inhibisyonu gibi süreçlerde önemli roller üstlenen, her biri farklı bir doku ifadesi göstermesine rağmen, TGF- β ve buna karşılık gelen reseptörler hemen hemen her hücre tipi tarafından üretilir (100). Bu sitokinler, spesifik tip I ve tip II serin/treonin kinaz reseptörleri ve hücre içi SMAD'lerin çekirdeğe hareketi sonucunda, Şekil 2-3 üzerinde gösterildiği gibi transkripsiyon faktörleri yoluyla endotelial ve mural hücreler dahil olmak üzere hücreler üzerindeki etkilerini yansıtır (101). SMAD'lere ek olarak, TGF- β 'nin aracılık ettiği sinyalizasyon süreci, MAPK ve PI3K gibi hedeflerinin aktivasyonunu ihtiva edebilir. Endotel hücrelerinde hem tip I reseptörleri ALK1 hem de ALK5 eksprese edilir ve TGF- β sinyal yolu, her iki SMAD proteini sınıfının aktivasyonu ile sonuçlanır (102). TGF- β , ALK'ler tarafından farklı yönlerde bir eğilime girebilir, ALK1 ve ALK5 yolları arasındaki bu değişen denge, TGF- β 'nin proanjiyojenik etkisinde belirleyici bir rol oynar (100, 101, 103). TGF- β 'nin düşük seviyeleri, anjiyojenik faktörleri ve proteazları düzenleyerek

anjyogeneze katkıda bulunurken, fazla eksprese edilen TGF- β , bazal membranı yeniden şekillenecek yönde uyarır, farklılaşmayı artırır ve endotel hücre büyümesini inhibe eder. Öte yandan, çeşitli ajanlara dirençli hale gelen tümör hücreleri TGF- β 'ye dönüşerek büyümeyi baskılayan bu uyarılara yanıt vermeyebilir, bu da tümör hücresinin anjyogeneze, hücre invazyonu ve tümör hücresi etkileşimlerinin artmasıyla, sınırsız çoğalabilme imkanını sağlamış olur (102, 103). TGF- β 1'in aşırı ekspresyonu mide, meme, kolon, hepatoselüler, akciğer ve pankreas kanserlerinde tespit edilmiştir ve özellikle metastaz, kötü prognoz gibi süreçleri teşvik edici özellikleri tümör anjyogenezi ile doğrudan ilişkili olduğunun kanıtıdır (104). Yapılan çalışmalarda TGF-y inhibisyonu gerçekleşen bhRHK hücrelerinde, invaziv yeteneklerin azaltıldığı, TGF-y -VHL arasındaki hipoksik koşullarda, yeniden VHL düzenlenmesi adımındaki ilişkinin, VHL'nin yeniden üretilmesi sonrasında TGF-y yolu aktivitesinin azaldığına yönelik bulgular elde edilmiştir (79).

2.6.5. VHL

Von Hippel-Lindau, hücre bölünme, hücre farklılaşması, hücre ölümü ve hücrel strese karşı yanıt mekanizmalarında önemli bir tümör baskılayıcı gen olarak davranmaktadır. Fonksiyon kaybı mutasyonları, HIF-1A üzerindeki kontrol mekanizmasının kaybolmasına yol açar. VHL'nin başı çektiği mutasyonlardan kaynaklanan sinyalizasyon basamaklarındaki aksamalar, diğer birçok tümör baskılayıcı gen fonksiyonunun bozulmasında da öncü olarak görülebilir (44). Yalnız mutasyon veya diğer defektlere bağlı olarak değil, Şekil 2-4'te gösterilmiş olduğu gibi ortamın oksijen ve demir seviyelerindeki düşüslere bağlı olarak da VHL aktif olarak HIF-1A yıkımını gerçekleştiremeyecektir ve buna bağlı olarak mTOR / PI3K gibi anjyogeneze ilişkili yolların aktiflenmesinden bahsedilebilir (45).



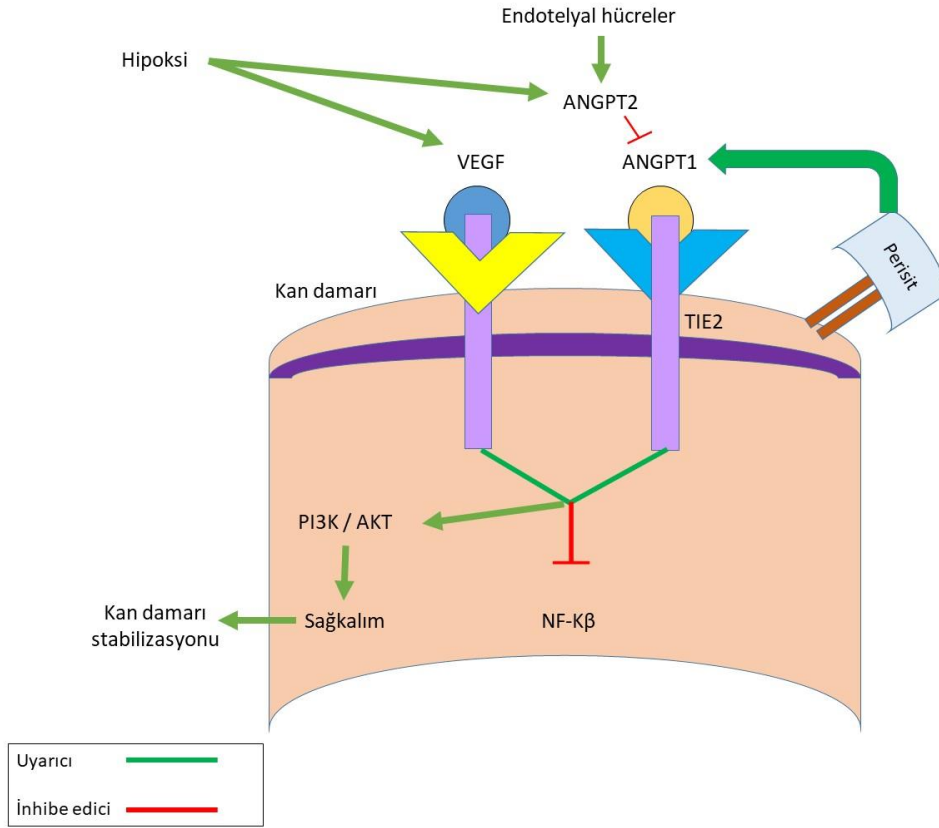
Şekil 2-4: VHL ve HIF- α etkileşimleri
(Guillame ve ark., 2022'den uyarlanmıştır).

bhRHK vakalarının %80'inde, VHL biallelik mutasyonların görülmesi, bu birçok gen ve yolak ile ilgili başı çeken bu gen açısından önem teşkil eden bir husustur (86). Ancak, yine de VHL'nin mutasyon kayıpları, bu karmaşık tümör oluşum mekanizmasının ilerleyişini yönetmek için tek başına yeterli değildir; VHL'ye eşlik eden PBRM1, BAP1, SETD2 genlerinde meydana gelecek delesyonların, tümörün ilerleyişindeki mekanizma için oldukça elverişli bir ortam yarattığından bahsedilebilir (52). VHL mutant fare böbrek epitel hücrelerinde HIF-1A stabilizasyonunun, anjiyogenez, vaskülarizasyon süreçlerini indüklediğini göstermeleri nedeniyle, bhRHK gelişiminde zincirleme etkileri tetiklediği gösterilmiştir. HIF-1A, insan böbrek tübüler hücrelerinde VHL gen mutasyonunun çok erken bir sonucu olarak neoanjiyogenezi indükleyen muhtemel faktör olarak değerlendirilmektedir (78). VHL mutasyonlarının görüldüğü RHK vakalarındaki tedavi, diğer onkojenik aktiviteye neden olan hedeflerin elimine edilmesi yoluyla, hücre proliferasyonunun önüne geçmek üzerine kuruludur (105).

2.6.6. ANGPT1 -TIE2 (TEK) Yolağı

Anjiyopietin ligand ailesinde yer alan ANGPT1, ANGPT2, ANGPT3 ve ANGPT4 proanjiyogenik ve vasküler büyüme faktörleri olup, TIE2 reseptörlerine bağlanarak aktive olurlar (80). Embriyonik gelişim esnasındaki anjiyogenez süreciyle

ilişkili olan ANGPT1, yeni oluşan kan damarlarının yeterli miktara ulaştığında oluşumunun baskılanmasını sağlamakta olup, bu durum, tümördeki anjiyogenezi sınırlayıcı etkisini anlamamız için önemlidir (106). ANGPT1, TIE2 reseptörünü aktive ederek bir agonist gibi davranırken, ANGPT2, TIE2 için bir antagonist görevi görür. Bu ilişki şekilde özetlenmiştir. VEGF-A'nın varlığında ANGPT2 anjiyogenezi teşvik edecek ve VEGF-A'nın yokluğunda ANGPT2 damar regresyonuna neden olacaktır (80, 107). Tümör anjiyogenezinin seyrinde, ANGPT1-TIE2 sistemi oldukça önemli bir karar mekanizması gibi işlev görmektedir. Bu durum, Şekil 2-5 üzerinde görselleştirilmeye çalışılmıştır. Yapılan çalışmalarda, ANGPT1 ve ANGPT2 birlikte inhibe edildiğinde, tümör vaskülarizasyonunun azaldığı gözlenmiştir. Ancak tümör damarı oluşum mekanizmasının normalizasyonu için, ANGPT1 sinyali yokluğu önemli bir noksanlık olarak değerlendirilmiş olup bu durumda ANGPT2'nin yokluğunda gözlenen damar normalizasyonunun ANGPT1'e bağımlı olduğu sonucuna varılabileceği fikri elde edilmiştir (81). Yine benzer bir çalışmada, ikili ANGPT 1/2 inhibitörü kombinasyon tedavisinin, metastatik bhRHK modelindeki antimetastatik aktiviteyi arttırdığı gösterilmiştir (108). ANGPT1 için düşük ekspresyon seviyelerinin, endometrium kanseri hastalarında daha iyi bir OS'ye ve ayrıca kötü prognoza neden olduğu ve ANGPT1'in aşırı ekspresyonunun bu hastalarda tümör mikroçevre bağışıklık hücreleri ile ilişkili olabilecek azalmış hayatta kalma ile sonuçlandığı gösterilmiştir.



Şekil 2-5: ANGPT1-TIE2 iletişiminin kontrol mekanizması
(Bupathi ve ark., 2014'den değiştirilerek uyarlanmıştır).

Antianjiyojenik ilaçlar, tirozin kinaz inhibitör (TKİ)'ler, tümörlerin büyümesini ve gelişimini geciktirmek için VEGF reseptörlerinin yanısıra anjiyopoietin / TIE2 yolunun inhibisyonunu hedefleyebilir (109). Öte yandan, ANGPT1'in hepatoselüler karsinoma örneklerindeki ekspresyon seviyeleri, tümöre komşu hücelere göre daha yüksek tespit edilmiş olup aynı zamanda anjiyogenezi teşvik ederek tümör büyümesinde ve metastazda yer aldığı bildirilmiştir (110). ANGPT1 ve ANGPT2'nin TIE2 reseptörü üzerindeki agonist-antagonist etkileşimlerinin karmaşık yapısı düşünüldüğünde, anjiyogenezi inhibe ederken TIE2 yolağını hedefleyen girişimler, VEGF gibi diğer hedeflere nazaran daha zorlu hale gelmektedir (80). Ayrıca, ANGPT / TIE2 yolunun inhibisyonunun, ANGPT1 ve ANGPT2'nin TIE2'ye bağlanmasını nötralize ederek meme, prostat ve yumurtalıktaki insan karsinoma hücre hatlarını T hücresi aracılı saldırıya karşı önemli ölçüde daha duyarlı hale getirildiği bulunmuştur (111). ANGPT1 / TIE2 iletişimi hem normal hem de tümör dokularında kan damarı olgunlaşmasına ve stabilizasyonuna yol açmakta, ve bu ikilinin endotel hücreleri üzerinden oluşan VEGF

yanıtını düzenlediği bilinmektedir. Bu noktadaki ANGPT1-TIE2-MET kinaz yolağı hedeflemelerinin, tümör metastazını engelleyebilecek tümör mikroortam değişiklikleriyle sonuçlanabileceği bilindiği için bu noktaları hedefleyen tedaviye yönelik çalışmalar son derece önemlidir (108).

2.7. Metastatik Renal Hücreli Karsinomlar

Metastatik renal hücreli karsinomlar, kemoterapi ve radyoterapilere oldukça dirençli olduğu için, hastaların çok ciddi bir kısmı kötü prognoz gösterir (112). Renal hücreli karsinomlar, metastaz yeteneği yönünden hastaların 5 yıllık sağkalımına göre kıyaslandığında, metastatik tipli hastaların sağkalımı %10 iken; metastatik olmayan renal hücreli karsinoma sahip bireylerin sağkalımı %85 olarak görülmüştür (113). Renal hücreli karsinom hastalarının %33-50'si, genelde tanı aldıklarında halihazırda metastaz yapmış olarak tespit edilmektedir (114). Yine tedavi sonrasında da hastaların %20-30 kadarını tehdit etmeye devam eden diğer önemli bir sorun, nefrektomi ve destek tedaviler uygulanan bireylerin ilerleyen dönemde tekrar metastaz geliştirebilme ihtimalidir (115). İlaç direnci, karmaşık bir süreç olup, çoklu ilaç direnci, apoptoz inhibisyonu, ilaç metabolizmasındaki değişiklikler, bireylerdeki genetik karakterlerin farklılık göstermesi gibi birçok nedene dayandırılabilir. Çoklu ilaç direnci mekanizması, kanser hücrelerinin birden fazla ilaca karşı ayakta kalabilme yetisi olarak tanımlanacak olursa, bu yeti, ilacın hücre dışına atılması ne kadar fazla gerçekleşirse ilaç emilimini o kadar etkisiz kılarak artacak ; ilacın kansere karşı etki ve başarısını da aynı yönde azaltacaktır (116). ABC taşıyıcıları olarak bilinen taşıyıcı proteinler, ilaç ve lipidlere hücre zar yapısının içinden dış kısmına doğru yön verebildikleri için, birçok kanser türünde MDR mekanizmalarına aracılık eden bir zar proteinleri üst ailesi olarak bilinmektedir. P-glikoproteinler, MDR'de yer alan ABC taşıyıcıları arasında aşırı ekspresyon ve aktiviteleri sonucunda, ilacın hücre dışına atılmasına yol açabilir (117). RHK'de tedaviye karşı oluşan direnç mekanizmasının, başarı oranını düşürmekle birlikte, metastazı da, anjiyogenez gibi yetenekleri teşvik ederek daha güçlü hale getirdiği bilinmektedir. Bu anlamda son dönemde özellikle tümör kökenli eksozomlar bu konuyla ilişkili önemli bir örnek olarak gösterilebilir. Güçlü kapsül yapıları sayesinde, etraflarına korunaklı bir kalkan yapısı oluşturarak, proteazların parçalayıcı etkilerinden kurtuldukları bilinmektedir (118).

2.8. Tedavi Yöntemleri

RHK tedavilerinde öncelikli yaklaşım, tümörün lokalize mi yoksa metastatik mi olduğunu belirlemektir. Bunun ardından, 7 cm'e kadar ulaşan lokalize küçük tümörler, özellikle de kronik böbrek rahatsızlığı öyküsü olan hastalar için, eğer tümör yerleşim ve evreleme kriterleri de uygunsa kısmi nefrektomi yaygın olarak uygulanan prosedürdür. Ancak tümör oldukça büyük ve böbrek çalışma fonksiyonlarını sekteye uğratabilecek nitelikteyse, radikal nefrektomi uygulanan yoldur (119). Diğer lokalize tedavi yöntemleri arasında nefrektomiye alternatif olarak ipsilateral adrenalektomi (120) sayılabilir. İlerlemiş tümör görülen, cerrahi müdahale şansının mümkün olmadığı ağırlı ve kanamalı hastalar için ise embolizasyon uygulaması, cerrahi operasyona alternatif olarak gösterilebilir (121). Metastatik tümörlerin tedavisi için ise, adjuvan tedavilerin öncesinde ve/veya sonrasında, sitoredüktif nefrektomi (SN) bir kesim için oldukça önemli ve gerekli görülmekte, ancak SN uygulanacak hastaların, primer tümör açısından büyük, metastatik tümör kitlesi olarak ise yoğunluğunun az olması tercih sebebi olup, tedaviye başlangıç için belirleyici unsurlardır (122, 123). Tek başına SN'yi takiben sistemik tedavilerin uygulanması ile tedavi başarısının artırılması hedefdir. Sistemik tedavi, özellikle tekrar eden metastatik renal hücreli karsinomu olan veya cerrahi seçeneğin mümkün olmadığı hastalarda gündeme getirilebilir (124). Renal hücreli metastatik karsinomların klasik kemoterapötik uygulamalara iyi yanıt vermediği bilindiğinden, antitümör immün yanıtı iyileştirmeyi hedef alan immünoterapötik ajanların arayışına da gidilmiştir. SN için, tümör kaynaklı T hücre inhibitör faktörlerini azaltmak ve tümör kaynaklı büyüme faktörlerini baskılamak yoluyla metastatik RHK'nin gerilemesine katkıda bulunduğu düşünülmektedir (123). Metastatik RHK sistemik tedavileri ele alındığında, VEGF hedefleri için reseptör TKİ, mTOR inhibitörleri ile immünterapi için ise interferon- α (IFN- α) ve interlekin-2 (IL-2) gibi sitokinlerin kullanımı oldukça yaygındır (125, 126). Son dönem tedavilerindeki genel yaklaşım, immünterapi ve tirozin-kinaz inhibitörlerinin kombinasyonundan yararlanmak üzerine evrilmeye devam etmektedir (127).

Uluslararası metastatik renal kanser veri konsorsiyumunun 2019 yılında güncelleyerek yayınladıkları rehberinde, risk durumu daha düşük hasta gruplarının ilk basamak tedavisi için sunitinib veya pazopanib, ikinci ve üçüncü basamak için cabozantinib veya nivolumab öneriliyorken; risk durumu orta seviye olarak görülen hastaların başlangıç tedavisi için ipilimumab/nivolumab, ikinci basamak tedavileri için

cabozantinib veya VEGF hedefli terapiler, üçüncü basamak için ise cabozantinib veya ona alternatif bir terapi önerilmiştir. Risk durumu daha yüksek olan hastalar için ilk basamak tedavi cabozantinib, sunitinib, pazopanib, ikinci basamak tedavileri için VEGF hedefli ajanlar veya nivolumab, üçüncü basamak tedavileri için ise nivolumab veya alternatif hedefli tedaviler önerilmiştir (128).

2.9. Tirozin Kinaz İnhibitörleri

Hücre büyümesi, farklılaşması ve metabolizma üzerinde etkin role sahip bu tirozin kinaz protein ailesine ait üyeler, onkogenezis sürecine katkıları her zaman mümkün olabildiği için, kanser tedavisinde önemli hedefler olarak tercih edilirler (129). Anjiyogenez ve tümör gelişimini baskıladıkları gibi, immün yanıt mekanizmalarını da çeşitli noktalardan düzenlemeye yardımcı olmaktadır (130). Sunitinib, sorafenib, pazopanib, axitinib, cabozantinib, tivozanib, lenvatinib özellikle metastatik renal karsinoma tedavisinin ilk zamanlarından bu yana, etkin TKİ'ler olarak rol oynamaktadırlar. VEGF, VEGF reseptörlerini, mTOR ve immün kontrol noktası reseptörü programlı ölüm 1 (PD-1) sinyal yolunu hedef alan ajanlar, ileri seviye ve metastatik renal hücreli karsinom hastalarında oldukça iyi etkiler göstermelerine rağmen, hastaların genel sağkalımlarına farklı etkiler gösteren kombinasyon tedavilerinin ve monoterapilerin iyi belirlenmesi önceliktir. Aslında temel olarak yalnızca VEGFR inhibisyonu değil buna ek olarak, ileri seviye ve metastatik renal hücreli karsinom hastalarında kullanılan birçok TKİ'leri, diğer farklı tirozin kinazları da birlikte hedefleyerek inhibe edebilmektedir (131). Bu noktada özellikle metastatik renal hücreli karsinoma tedavisinde sıklıkla kullanılan TKİ'leri ve bunların hedef aldığı tirozin kinazlar Tablo 2-4 içerisinde gösterilmiştir (132).

Tablo 2-4: Metastatik renal hücreli karsinoma tedavisinde kullanılan bazı tirozin kinaz inhibitörleri ve hedefleri.

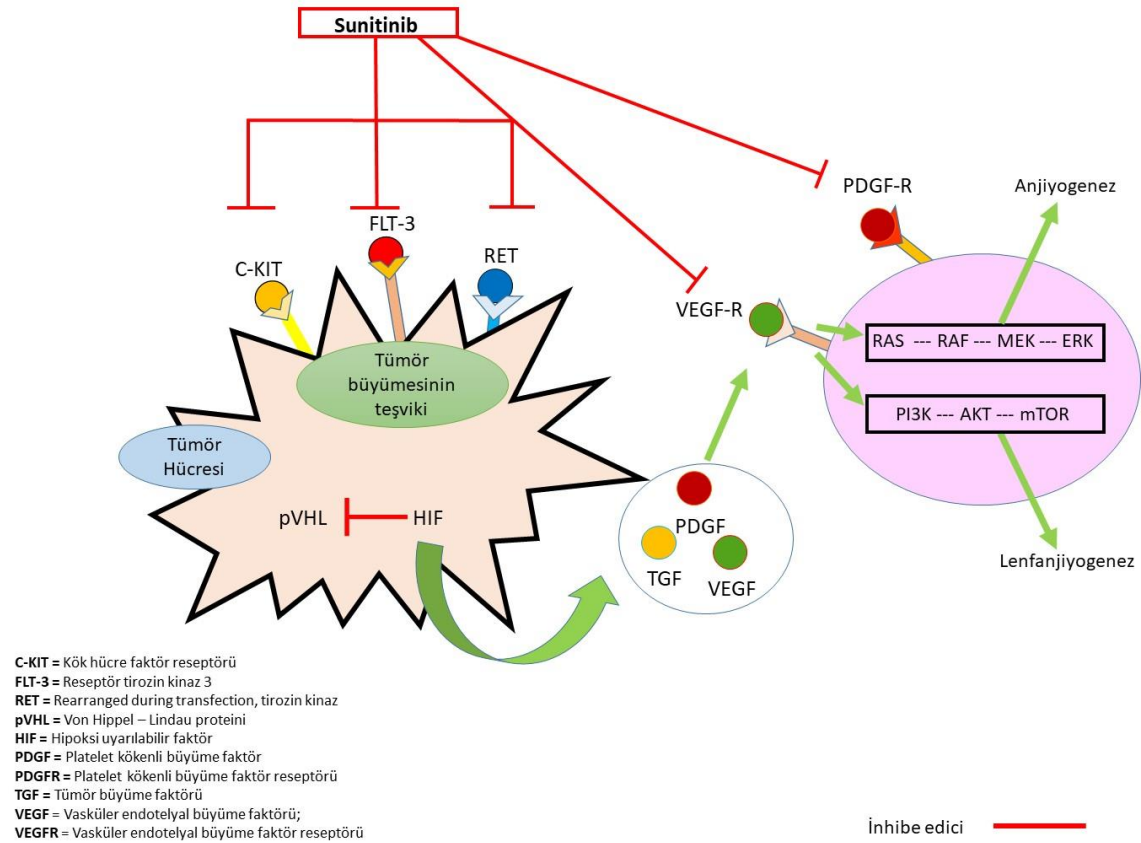
(Michaelis ve ark., 2022'den düzenlenerek uyarlanmıştır).

<i>İlaç</i>	<i>Hedef bölgeler</i>
Sunitinib	c-Kit, VEGFR1-3, PDGFR- α , PDGFR- β , FLT3, CSF-1R, RET
Cabozantinib	ET, MET, VEGFR-1-3, KIT, TRKB, FLT-3, AXL, TIE2
Tivozanib	VEGFR1-3, PDGFR- α/β , c-Kit, TIE2, ephb2
Sorafenib	VEGFR2, FLT3, PDGFR, FGFR1
Pazopanib	VEGFR1-3, P PDGFR- α/β , FGFR1/3, c-kit
Lenvatinib	VEGFR, PDGFR α , KIT; RET, FGFR
Axitinib	VEGFR1-3

2.10. Sunitinibin Tedavideki Yeri ve Direnç Durumundaki Başarısı

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi'leri seviye ve metastatik RHK hastalarının tedavisinde, kullanım için onayladığı ilk ilaçlardan olan sunitinib (131), Şekil 2-6 içerisinde özetlendiği gibi c-Kit, PDGFR- α , PDGFR- β , FLT3, CSF-1R, RET gibi tirozin kinazların yanısıra çok önemli bir VEGF hedefleyeni ve oral olarak kullanılan bir inhibitördür (132). Bu yönüyle tümörün proliferatif, anjiyogenik ve metastatik yeteneklerini önemli ölçüde kısıtlayarak tedavide aktif bir rol oynamaktadır. Sunitinib ile birlikte, sorafenib ve pazopanib başlıca kullanılan TKİ'leridir (44, 125). Birinci basamak tedaviler göz önüne alındığında, özellikle düşük ve orta seviye riske sahip hastalarda, sunitinibin en etkili tirozin kinazlardan olduğu yapılan Faz III çalışmaları ile gösterilmiş olmakla birlikte, en yaygın kullanılan tedavi ajanıdır. Yine nivolumab, ipilimumab kombinasyon tedavilerinin özellikle orta ve düşük riskli hastalarda etkili olduğu; ancak daha yüksek risk gösteren hasta gruplarında sunitinibin hem tedavi yanıtı hem de progresyonsuz sağkalım yönünden değerlendirildiğinde, daha etkili olduğu gösterilmiştir (14). Ancak en önemli dezavantaj olarak, tedaviyi izleyen ortalama 12 aylık süreç içerisinde, sunitinibe karşı gelişen direnç sonucunda karşılaşılan artmış anjiyogenez yetenekleri gösterilebilir (131). Anti-anjiyogenik olarak etki göstermesi

beklenen sunitinib gibi tirozin kinazlara karşı gelişen dirençten tümörün kazandığı anjiyogenez yetenekleri ile doğrudan ilişkili olan PDGF, VEGF ve homologlarının primer sorumlu olduğu çıkarımı yapılması yanlış olmayacaktır.



Şekil 2-6: Sunitinib tedavi hedef noktaları

(Møller ve ark., 2019'dan değiştirilerek uyarlanmıştır).

Kazanılan bu yeteneklere ek olarak, beraberinde tümör invazivite yeteneğinin evrilmesi de, ilaç etkinliğinin tüm tümör hücrelerini hedef almasına engel olmakla birlikte, özellikle sunitinibe karşı oluşan direnci de önemli derecede artırmaktadır (133). Tümör anjiyogenez yeteneğinin ortadan kaldırılabilmesi için anjiyopietin-TIE2 sinyalizasyonunun da tedavide hedeflenmesi oldukça değerli olup, sunitinib direncine altyapı oluşturan mekanizmalardan biri olduğuna dair veriler mevcuttur (134).

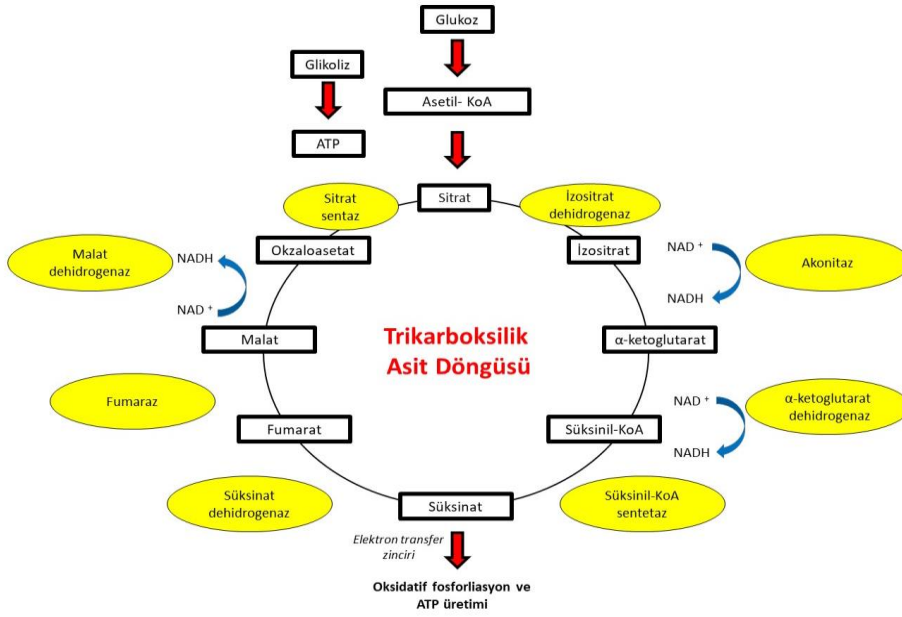
Sunitinibe karşı gelişen direncin sorumlusu olarak değerlendirilen mekanizmalar arasında, proanjiyogenik faktörlerin ifadesindeki artışlar, endoplazmik retikulum stresi, tümör mikroçevrenin yeniden düzenlenmesi, genetik faktörler, miRNA, halkasal RNA, uzun kodlanmayan RNA'lar bulunmaktadır. Tıpkı diğer birçok kanser tedavisinde,

tedavi ajanlarına karşı oluşan dirençte olduğu gibi, renal kanser tedavi sürecinde de sunitinibe karşı oluşan direnç, primer (genetik faktörlerin oluşturduğu) veya sekonder (edinilmiş, ilaca spesifik) olarak ortaya çıkmakta ve tümörün bir süre sonra tedaviye yanıtı sekteye uğratması ve nüksetmesiyle birlikte, başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (9). Bu durum, uzun dönemde sunitinibin göstermesi gereken etkinin hiçe sayılmasına yol açarak, tedavi başarısını gölgelemektedir. Bu nedenle, tedavilerde, sunitinib direncini elimine edebilmek adına, kombinasyon ajanlarının tedavi sürecine dahil edilmesine yönelik çalışmalar, hızla süregelmektedir (9, 135). Sunitinib, özellikle metastatik RHK tedavisinde standart olsa bile, hastaların çok büyük bir çoğunluğu bir şekilde tedaviye direnç geliştirebilmektedir. VEGFR inhibitörlerinin vaskülerite yeteneklerini baskılaması sonucunda, tümörün regresyonu veya duraksaması bir noktada görülecek, ancak zaman içerisinde artan hipoksik mikroçevre koşulları, EMG'yi tetikleyeceği için, VEGF hedefli bu tedaviye karşı direnç böylelikle gelişecektir. Bu oluşum sırasında, VEGF'ten bağımsız anjiyopoietin, fibroblast, MET gibi yolakların ifadelerinde ise artış görülmesi kaçınılmaz olacaktır. Sunitinibe dirençli hücrelerin, HIF-1A gibi faktörlerin ifadelerini artırmak üzerinden, anjiyogenez ilişkili gen ve yolakların tetiklenmesi ve doğal olarak tekrar tümörün lehine bir avantaj elde ettiği düşünülebilir (124, 136, 137). Sunitinib direncinin seyredildiği hastalarda, iki farklı ilaç kombinasyonu ile ikinci bir tedavi başlanmasının ardından, aslında bu TKİ'lerinin, istenilen başarıyı yakalayamadığı, dolayısıyla bu ajanlar yerine, daha etkili alternatiflerin koyulması gerekliliği önemini korumaktadır. Sunitinibe karşı direnç geliştirme potansiyeline sahip hastaları önceden saptayabilmek hala mümkün bir durum olmadığı için, bu noktada yönlendirici olabilecek belirteçlerin araştırılması da ayrıca önemlidir (138). Metastatik RHK tedavilerinin başlarında çok uzun bir süre boyunca ilk basamak tedavisi olarak kullanılmış olan interferon alpha IL-2 için yansıyan başarı oranları %5-20 seviyelerine ancak ulaşabilmiş, sonrasında sunitinib tedavisi ile birlikte başarı oranı %40 dolaylarına tırmanmış olup, böylelikle tedavide ilk tercih sebebi olması için değerlendirilmeye başlanmıştır (139). Büyüme faktör sinyal yolaklarının yukarı veya aşağı yönlü ilerleyişlerindeki çeşitli moleküllerin tedavi hedefi olarak değerlendirilmesi, kanser tedavisindeki yöntemlerin temellerinden birisi olup, RHK tedavisi için de, sunitinib ve bazı diğer çoklu TKİ'lerinin kullanımı oldukça yaygındır. Ancak, uygulanan dozların yüksek olması sebebiyle, hedef dışı istenmeyen etkilerin görülmesi ve ciddi yan etkilerin ortaya çıkması söz konusudur. Renal kanser tedavilerinde, uzun dönemde

alınması gereken faydanın önüne geçen sunitinib direncini ortadan kaldıracı olarak adını, sunitinib ile kombine düşük doz kullanımı uygun yeni ajanlar denenerek (140, 141), en etkin kombinasyon seçeneği arayışına yönelik çalışmalara olan ihtiyaç halen sürmektedir (138).

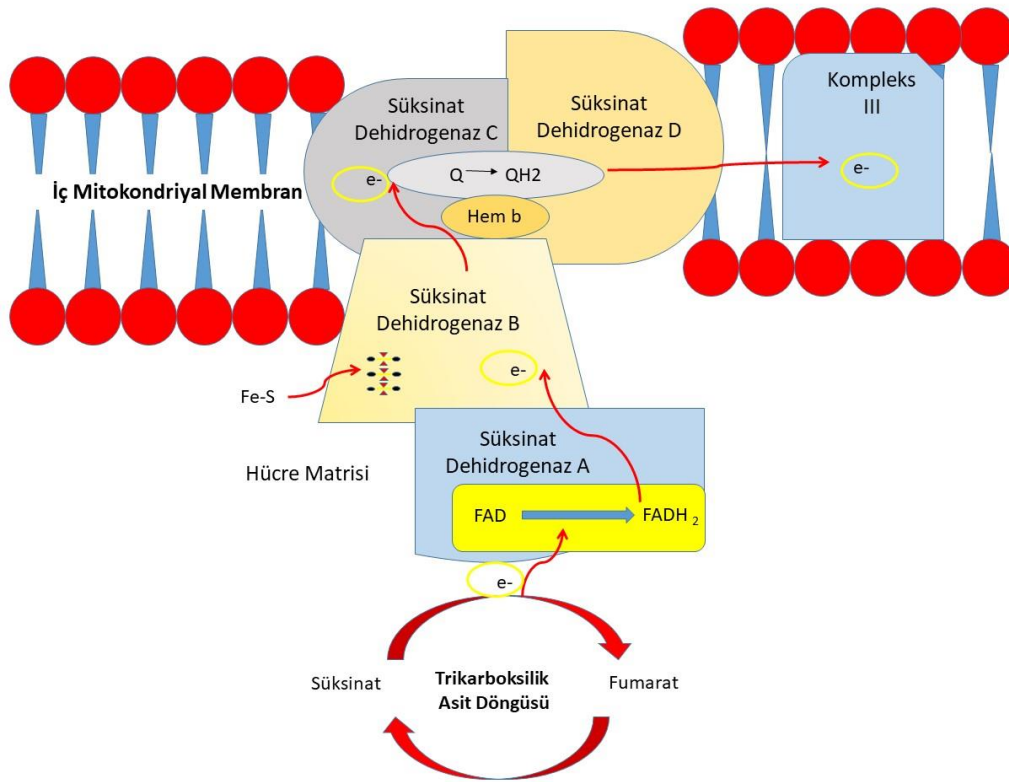
2.11. Süksinik Asit ve Metabolizmadaki Etkileri

Süksinik asit, TCA döngüsünün ara elemanlarından dört karbonlu bir dikarboksilik asittir. İlk defa amber üzerinden distilasyon yoluyla eldesi gerçekleştirilen süksinik asit (142), zaman içerisinde metabolizma üzerinde zararsız olduğu görüldüğünden bu yana, günümüzde tarım, sanayi, ilaç, gıda gibi önemli sektörlerde değerlendirilerek, çeşitli madde ve bileşenlerin üretiminde veya bunların raf ömrünü uzatacak bir etken olarak kullanılmaktadır (143). Özellikle endüstriyel fermantasyon yoluyla, canlı organizmalar üzerinden doğal süksinik asit üretiminin sürekliliği, kolay elde edilebilirlik ve bu alanlarda sürekli kullanılabilirliği açısından olumlu bir çıkarım sağlamaktadır (144). Anabolik ve katabolik yolların merkezinde, süksinat-fumarat geçişinde, TCA için ise asetil-KoA oksidasyonu için önemli bir araçtır. Oksaloasetat ve asetil-KoA'nın birlikteliği altı karbona sahip sitrat oluşumuna öncülük eder bu reaksiyonun katalizörü ise sitrat sentetaz enzimidir. Ardından sırasıyla Şekil 2-7'de gösterildiği gibi, izositrat, alfa-ketoglutarat, süksinil KoA, süksinat, fumarat, malat, oksaloasetat ve tekrar sitrat oluşumları döngü şeklinde diğer enzim ve kofaktörlerin aracılığıyla devam eder. cis-akonitata dönüşür, ara ürün olan cis-akonitat bir ileriki adımda izositrata dönüşümü ve bu tam döngü sonucunda, metabolizmanın ihtiyacı olan ATP eldesi sağlanmış olur (145). SDH enzim aktivitesini de belirleyen önemli bir metabolit olan süksinik asit, dallı zincirli aminoasit, keton cisimcikleri ve hem gibi sentezinde de rol almaktadır. Yıkım ve koruyuculuk anlamında, süperoksit, hidrojen peroksit, reaktif oksijen türlerinin homestazında ve ortadan kaldırılmasında da rol üstlenirler (142). Süksinat dehidrogenz enzim alt birimleri SDHA, SDHB, SDHC ve SDHD olarak tanımlanmış olup, mutasyonları renal karsinom tipleri ile ilişkili bulunur. SDHA ve SDHB katalitik alt birimler; SDHC ve SDHD ise iç zardaki yerleşik birimler olarak bilinmekte ve enerji geçişindeki rolleri Şekil 2-8'de gösterilmiştir (146).



Şekil 2-7: Trikarboksilik asit döngüsü

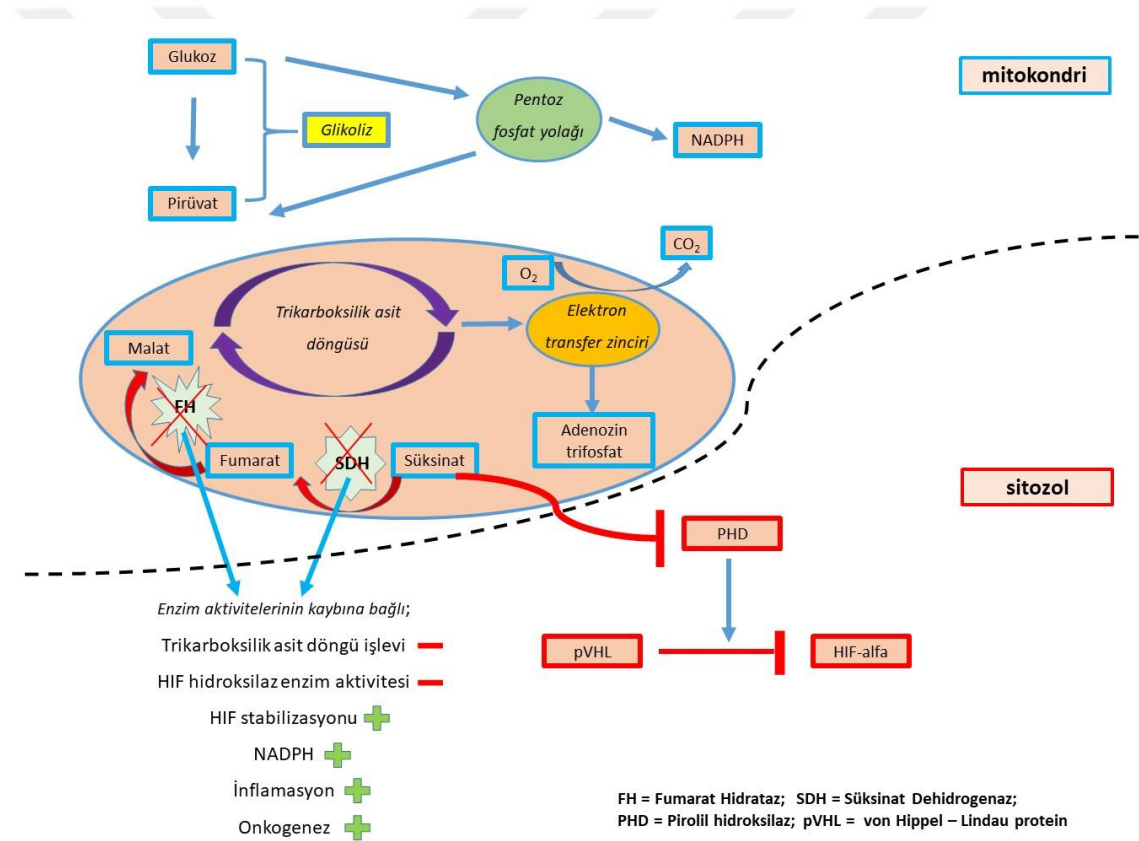
(Ryan ve ark., 2019'dan değiştirilerek uyarlanmıştır).



Şekil 2-8: Süksinat dehidrogenaz enzim kompleksi ve elektron transferi

(Moosavi ve ark., 2019'dan değiştirilerek uyarlanmıştır).

SDH ve FH, TCA döngüsü için vazgeçilmez bir noktayı temsil ederler. SDH, süksinat ve fumarat enerji zincirine ek olarak trikarboksilik asit döngüsü için gerekli, iç mitokondriyal zarın önemli düzenleyici birimleridir (63-65). FH ve SDH birimlerindeki mutasyonlar, papiller renal hücreli karsinom, renal hücre kanserine altyapı oluşturabilir (66-68). FH miktarının düşüşüne bağlı olarak, HIF-2 α artışı, Şekil 2-9 üzerinde de gösterildiği gibi buna eşlik eden SDH enzim eksikliğinde HIF-1A stabilizasyonu, aniyogenez yeteneklerinin kazanılması ve onkogenezin indüklenmesi olarak karşımıza çıkmaktadır (147). FH'nin artışı durumunda ise hücre göç ve invazyon yeteneklerinin engellendiği bildirilmiştir (69).



Şekil 2-9: SDH ve FH enzim aktivasyonlarının kaybına bağlı görülen değişiklikler

(Kancherla ve ark., 2020'den değiştirilerek uyarlanmıştır).

Literatürde süksinik asit ve analoglarının sağlıklı dokulara zarar vermeden, çeşitli kanser hücrelerinde, antiproliferatif, antiinflamatuvar, antihipoksik yönlerini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (148, 149). Süksinik asit, çeşitli kanserlerde,

hipoksiye ve ayrıca SDH enzim aktivitesinin bozulmasına bağılı olarak onkometabolit olma yönüyle değerlendirildiğinde, seviyeleri artmış olarak tespit edilmektedir (150). Ancak kansere yönelik tedavi ajanı olarak etkisi henüz net olarak aydınlatılabilmemiş olmamakla birlikte; farklı kanser türleri üzerinde antikarsinojenik, antiproliferatif, apoptotik özelliklerinin gösterildiği çalışmalar mevcut olup (10-12), öte yandan E vitamini ile kombine edilerek özellikle bu iki ajanın antioksidan özelliklerinin kanserin anjiyogenik yönlerinin baskılanması ve tedavi başarısına yönelik çalışmalar devam etmektedir (151). Süksinik asitin eritropez, hücre proliferasyonu, apoptoz ve glukoz metabolizması gibi önemli süreçler üzerinde HIF-bağımlı stabilizasyon etkisine sahip olduğu, ve bu dolaylı etki üzerinden tümörögenez etkisini, PI3K sinyalizasyon yolağı üzerinden Süksinat reseptörü 1 (SUCNR1) veya alfa-keto bağımlı dioksijenaz aktivitesini bozarak gerçekleştirdiğine dair değerlendirmeler mevcuttur (152). Süksinik asitin, metabolizmadaki hem doğal bir metabolit olma yönüyle, hem de kanser metabolizmalarındaki onkometabolit olarak bulunduğu konumu açısından, yine hem endojen varlığı, hem de eksojen olarak alımının farkı yönüyle iyi analiz edilmesi gereken bir dikarboksilik asit olduğu söylenebilir. Süksinik asitin farmakokinetiği, fareler üzerinde karbon işaretleme ile intravenöz ve oral yollarla uygulanması sonrasında özellikle endojen, eksojen ayrımı yönüyle de değerlendirilmiş olup, maruziyet açısından karaciğer, adipoz dokular ve böbreklerin en çok etkilenen bölgeler olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca etkin ve güvenilir doz aralığının belirlenebilmesi, diğer ilaçlarla kombinasyonunun öngörülebilmesi adına bu noktadaki değerlendirmeler de önemlidir (153). Süksinat özellikle iskemi hasarı sırasında dikarboksilik taşıyıcı ile katalizlenmesi sonucu malata dönüşümü gerçekleştirilerek, mitokondriden sitozole aktarıldığı düşünülmektedir. Bu durum aslına süksinatın iki yolda ilerleyebileceğini, bunlardan ilkinin yeniden mitokondriye girmek şartıyla ROS üretimini kontrol görevini sürdürmesi veya ikinci seçenek olarak hücre dışına atılmasıdır. Bu iskemi-reperfüzyon hasarı çalışmalarında süksinatın kalpten dışarı atılımının da mümkün olduğu düşünülmektedir ancak, mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır (154). Fakat, dolaşıma salınan süksinatın reseptörü olan SUCNR1 tarafınca kendisine yanıt bulduğu bilinmektedir. Böyle bir durum için, yani dolaşıma salınan süksinatın bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonu gibi ve diğer birtakım patolojik koşulların çözümlenebilmesi için aktif bir role sahip olabileceğinin altı çizilmektedir (155).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Yetiştirme Aşamalarında Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Çalışmamız kapsamında kullandığımız insan böbrek kanser hattı olan ACHN (CRL-1611) ve CAKI-2 (HTB-47) hücreleri ATCC (American Type of Cell Culture) firmasından daha önceki çalışmalarımızda ticari olarak satın alınarak büyütüp çoğalttığımız ve azot tankında erken pasaj numaralı olarak sakladığımız hücrelerdir. Hücrelerin altkültürleme işlemlerinde phosphate buffered saline (PBS) 1X, 500 ml, PAN BIOTECH, P04-36500) kullanılmıştır. ACHN hücrelerinin büyüme ortamı olarak, Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (ATCC 30-2003) ve CAKI-2 hücrelerinin büyüme ortamı olarak McCoy's 5A (ATCC 30-2007) kullanılmıştır. Besiyeri ortamlarını desteklemek için Fetal Bovine Serum (FBS) (ATCC 30-2020), antibiyotik olarak Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL) (GIBCO, 15140122), antimikotik olarak Amphotericin B solüsyon (SIGMA, A2942) kullanılmıştır. Hücrelerin altkültürleme aşamasında tutunma proteinlerini bozmak için Trypsin-EDTA (SIGMA, T4049-100ML) kullanılmıştır. Hücre dondurma işlemlerinde kullanmak üzere, dimetil sülfoksit (DMSO) (Glentham Life Sciences, GK2245) kullanılmıştır. İlaç uygulamalarında sunitinib maleat 5 mg (SIGMA, LOT 030M4706V) ve süksinik asit 100 mg (SIGMA, LOT BCCD3885) kullanılmıştır. Hücre canlılık testleri için, Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (ABBKINE, KTA1020), WST-1 (ROCHE, 5015944001), Tripan mavisi (SIGMA, RNBH 4603), hücre sayım disketi (INVITROGEN, C10312) ve otomatize sayım cihazı (Countess Automated Cell Counter) kullanılmıştır. Klonal hücre takibi için toz haldeki Crystal violet (Glentham Life Sciences, GA9809 259) kullanılmıştır. Hücre morfolojilerini incelemek için, Leica inverted mikroskop kullanılmıştır.

3.2. Hücre Hatlarının Yetiştirilmesi

ACHN ve CAKI-2 renal kanseri hücre hatları uygun inkübasyon koşulları olan 37°C sıcaklık ve %5 karbondioksit oranına sahip etüvde, deneyler için yeterli miktarda çoğaltılmıştır. Beslenme ortamlarında ACHN ve CAKI-2 için %10 FBS (Fetal Bovine Serum) içeren besiyerleri kullanılmıştır. Besiyeri ortamları 10% FBS'e ek olarak %1 antibiyotik, ve buna ek olarak fungal bir kontaminasyonu engellemek adına %1 oranında amfoterisin B eklenmiştir. Hücrelerin gelişimleri sırasında besiyeri ortamları

büyüme seyirlerine bağlı olarak ortalama 2-3 günde bir tazelesiyle değiştirilmiş olup, sayıca yeterli düzey ve pasajlanma aşamasına geldiklerinde pasaj ve dondurma işlemleri uygulanıp, deneyler için yeterli miktarda hücre stoklanmıştır. Büyüme safhasında olan hücreler karbondioksit etüvünde inkübe edilmeye devam etmiştir. Aynı zamanda, herhangi bir kontaminasyon olmadığını doğrulamak için, kullanılan besiyeri ortamları, hücre içermeyen besiyeri kaplarında haftada bir değiştirilerek, tazelik ve sterillik yönünden takip edilmiştir.

3.3. Sunitinibin renal kanser hücreleri üzerindeki IC₅₀ Değerlerinin Belirlenmesi

Böbrek kanseri hücre serileri ACHN ve CAKI-2, ticari olarak sipariş ettiğimiz sunitinib etken maddesinin artan dozlarına maruz bırakılarak hücre sitotoksite testleri gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılık/ölüm oranı tayini sırasında WST-1 hücre proliferasyon kiti ve sonuçları doğrulamak adına CCK-8 kiti kullanılmıştır. Hücre canlılık çalışması için, 96 kuyulu plakalar kullanılmış olup, farklı zamanlarda 3 kez tekrar edilmiş ve her doz için 5 kuyu tekrarlı çalışılmıştır. Kuyu başına 100 µl besiyeri içinde $0,005 \times 10^6$ hücre ekimi gerçekleştirilerek başlanmıştır. 24 saat inkübasyona bırakılan hücreler, inkübasyonun ardından besiyeri ortamları değiştirilerek, hazırlanan doz uygulamaları, kuyu başına total 100 µl hesaplanarak gerçekleştirilmiştir. Tüm kuyular 72 saat inkübasyon sonrasında besiyeri ortamları değiştirilerek, yeni besiyeri kuyu başına 90 µl ekildikten sonra, hem CCK-8 hem de WST-1 uygulamaları için ayrı ayrı, 10 µl bu reaktiften eklenmiştir. Her iki yöntem için de 3,5 saatlik inkübasyon süresi temel alınarak deneyler tamamlanmış ve absorbans değerleri 460 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçülmüştür. Her yöntem için doz uygulanan ve ilaç uygulanmayan kontrol kuyuları dışında, yalnızca hücre-DMSO kuyuları da değerlendirilmiştir. Ayrıca ilk ilaç uygulanan saat sırasındaki hücre miktarını değerlendirmek için, aynı şartlarda sürdürülmüş 0.saat kuyuları ve yine inkübasyon süresi sonunda yani 72. saat sırasında da ayrıca WST-1 ve CCK-8 uygulamalarına tabi tutulmuş olup, ilaç uygulanmayan hücrelerdeki proliferasyon sayısı belirlenip değerlendirme yapılmıştır.

3.4. Sunitinib stok çözeltisinin ve diğer konsantrasyonların hazırlanması

Moleküler ağırlığı 532,565 g/mol olan 5 mg sunitinib, 0,94 ml DMSO içerisinde çözdürülerek 10 mM ana stok çözelti hazırlanmıştır. Ana stoktan alınan 0,2 ml karışıma 1,8 ml taze besiyeri eklenerek homojenize edilmiş ve 1 mM ara stok elde edilmiştir.

Hazırlanan 10 mM ana stok çözeltisi, gerektiğinde kullanılmak üzere, etiketlenip steril tüplere bölünerek -20°C sıcaklıktaki dolapta saklanmıştır. Ara stok kullanılarak, seyreltme (dilüsyon) yöntemi ile sırasıyla 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,13 µM ve 1,56 µM dozlarının hazırlanışı, Tablo 3-1’de verilmiştir.

Tablo 3-1: Sunitinib konsantrasyonlarının hazırlanması

Dilüsyon Numarası	Kullanılacak solüsyon ve miktar	Eklenecek besiyeri miktarı (µL)	Sunitinib konsantrasyonu (µM)
1	1 mM ara stok (200 µL)	1800	100
2	Dilüsyon 1 (1000 µL)	1000	50
3	Dilüsyon 2 (1000 µL)	1000	25
4	Dilüsyon 3 (1000 µL)	1000	12,5
5	Dilüsyon 4 (1000 µL)	1000	6,25
6	Dilüsyon 5 (1000 µL)	1000	3,13
7	Dilüsyon 6 (1000 µL)	1000	1,56

3.5. Sunitinib Direncinin Oluşturulması

Direnç gelişimi istenen hücreler besiyeri ortamlarına artan dozda sunitinib eklenerek hücrelerin canlılık ve sunitinibe karşı direnç gelişimleri takip edilmiştir. Yaklaşık 7-8 aylık bir süreç sonunda hücrelerde sunitinibe karşı direnç geliştirilmiştir. İlk aşamada sunitinib ile hiç muamele edilmemiş yani sunitinib duyarlı hücreler, bir önceki adımda ACHN ve CAKI-2 için sırasıyla 26,27 µM ve 28,11 µM olarak belirlenen IC₅₀ doz sonuçlarına göre tedavi edilmeye başlanmıştır. Ancak direnç gelişimi için kademeli bir doz artışıyla uygulama yapılmıştır. İlaça duyarlı hücreler, ilaçla ilk kez muamele edildikleri noktada 72 saat boyunca ilaca maruz bırakılmışlardır. Bu ilk doz uygulaması 1 µM olarak tamamlandıktan sonra, ilaçlı medyum ortamı, 72 saat inkübasyon süresinin sonunda atılarak, büyüme ortamına ilaçsız taze medyum

eklenmiştir. Bu süre boyunca canlı kalan hücrelerin direnç gösteren hücreler olduğu bilindiği için, 10-15 gün boyunca proliferasyon olmaları beklenmiş ve 2-3 gün aralıklarla taze, ilaçsız besiyeri ile desteklenmiştir. İlk doz uygulaması, ortalama 15-20 günlük sürecin sonunda, alanda yayılarak konfluent olduğu görülen hücreler, altkültür işlemine alınarak ikiye pasajlanmıştır. Yeni büyüme ortamlarına aktarıldıktan sonra da gelişimleri ve proliferasyonları takip edilmiştir. Bu sırada hiç ilaç verilmeyen kontrol hücrelerinin büyüme ve yayılma hızları standart alınarak, dirençli hücrelerin pasajlanması gereken günlere karar verilmiştir; ancak direnç kazandırılmaya çalışan hücrelerin büyüme hızları daha yavaş gittiği için besiyeri ile büyümenin desteklenmesi devam ettirilmiştir. Bu büyüme ivmesindeki farklılık, sunitinib dirençli ve sunitinib duyarlı hücreler arasında pasaj farkı doğurabileceği için; inkübatörde sürekli olarak geniş pasaj aralığında yedekler ile çalışmak gerekliliği önemli bir husus olarak aktarılabilir. İkinci doz uygulamasına geçilirken 2 kat doz artışı uygulanarak, aynı süreç izlenmiştir. Her doz uygulaması ve taze medyumla gelişim döngüsü sonunda, diğer doza geçmeden önce, en az 2-3 pasaj ile direnç kazandırılan hücrelerin büyüme ivmeleri doğrulanmış ve yeni alındıkları ortamda 1 hafta boyunca taze medyum ile devam ettirilmiş, akabinde önceki dozun tekrar uygulanması düzeniyle devam edilmiştir. ACHN için, sırasıyla 1,25 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM ve son olarak 20 μM doza kadar süreç devam ettirilerek, 20 μM sunitinib dirençli ACHN elde edilmiştir. Aynı zamanda doz uygulamaları sırasında yedekli çalışıldığı için ileride kullanılmak üzere, her doz direnci noktasında ve işlenen prosedür için, dondurulan hücrenin geldiği son aşamaya kadar detaylı şekilde kodlanarak gerekli miktarda stoklanmıştır. Hücreler ilk olarak 25 cm^2 alana sahip flasklarda yetiştirilip doz uygulamaları burada denenmiştir. Ancak bu aşamalarda, hücre sayısı özellikle doz artışında yeni pasajlarda sabit tutulamadığı için alanın daha da daraltılarak başlatılmasına karar verilmiştir. Bu noktada önce 24 kuyucuklu plakalar kullanılmış olup, kuyu başına 0,5 ml besiyeri ve $0,05 \times 10^6$ hücre düşecek şekilde ekim yapılarak başlanmıştır. İlk doz uygulaması sonrasında yarıya düşen hücre sayısı, taze besiyeri uygulandıktan sonra takip eden 15-20 gün sonunda tekrar artış göstermiştir. Bu aşamada önce 24 kuyucuklu plakanın her bir kuyusu, 2 adet yeni kuyucuğa aktarılmıştır. Ardından %80-90 konfluent oldukları görüldüğünde, bu kez 6 kuyucuklu plakalara aktararak, daha geniş alana geçiş yapılmıştır. Hücre-besiyeri oranı, 6 kuyucuklu plaka için kuyu başına 2 ml/ $0,2 \times 10^6$ olacak şekilde ekim yapılmıştır. Bu süreçte doz artışı gerektiği adımlarda, hem 24, hem 6 kuyucuklu

plakalar, paralel olarak kontrollü şekilde ilaçlanmış olup, oran orantının sabit olduğundan emin olunmuştur. Tüm ilaç dozu artışları için, hedeflenen son doz uygulaması dahil bu işlem 24 ve 6 kuyucuklu plakalarda devam ettirilmiştir. Süreç sonunda, 6 kuyucuklu plakalardaki dirençli hücreler, tripsinizasyon ile kaldırılarak, 25 cm² alanlı flasklara aktarılmış olup, önce yüzeyde tutunmaları ve ardından konfluent olmaları beklendikten sonra, direnç kazanılan son doz uygulanmıştır. Hücre-besiyeri oranı, 25 cm² alanlı flasklar için, 5 ml/0,5 x 10⁶ olacak şekilde başlanmıştır. ACHN ve CAKI-2 için, direnç gelişimi adımlarında, ilaçla muamele edilmeyen kontrol grupları da aynı 6 ve 24 kuyucuklu plakaların içinde, dirençli hücrelere uygulanan pasaj müdahalesi kadar pasajlanarak, dirençli hücrelerle eşit oranda ilerlemeleri planlanarak ilerlenmiştir. Ancak ara raporlarda da bildirdiğimiz gibi, CAKI-2 hücrelerinin sunitinibe karşı direnç geliştirilmesi adımı başarılı gitmediği gittiği için, tez çalışmamızdan çıkarılmak zorunda kalmış olup, yalnızca ACHN hücreleri ile devam edilmiştir.

3.6. Crystal Violet / Hücre Koloni Analizi

Deney için 6 kuyucuklu plakalar kullanılmış olup, her kuyu için 2 ml/1x10³ hücre sayılarak ekimleri gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yüzeye tutunup gelişmeleri için 24 saat süre boyunca uygun karbondioksit (%5) ve sıcaklık ortamında (37°C) inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, medyum ortamı uzaklaştırılmıştır. Hücre proliferasyonuna etkisini gösterebilmek adına, her kuyu için, 0-20 µM arasındaki değişen dozlar uygulanarak etkisi çalışılmıştır. İlaç uygulanmamış ve ilaçla muamele edilmiş kuyular arasındaki fark, crystal violet uygulaması ile, nicel ve nitel olarak değerlendirilmiştir. Tüm ilaçlı ve ilaç uygulanmamış kuyular, 72 saat boyunca, inkübe edilmiştir. Deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. Boyama Solüsyonunun Hazırlanması ve Ekim Prosedürü

Kristal violet boyama çözeltisini hazırlamak için, 0,25 gram crystal violet tozu tartılarak, 20 ml, %95 etil alkol içinde çözdürülmüştür. Ardından 80 ml distile su eklenerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. İnkübasyon süresi olarak belirlediğimiz 72 saat sonrasında, hücre besiyeri ortamları uzaklaştırılmış ve kuyu başına 2 ml PBS ile 2 kez yıkama uygulanmıştır. Ardından hazırladığımız boyama çözeltisi, kuyu başına 1 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda, plakaların kapakları kapatılarak, steril bir şekilde 20 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tekrar PBS ile birkaç defa yıkama yapılarak, fazla boya uzaklaştırılmış, yalnızca

hücre kolonileri görünür halde kalmıştır. Fotoğraflar alındıktan sonra, hücre absorbanlarının okunması için diğer aşamaya geçilmiştir.

3.6.2. Hücre Parçalama Solüsyonunun Hazırlanması ve Prosedür

0.1 M sodyum sitrat 2.94 g tartılarak, 50 ml %50 ethanol içerisinde çözdürülmüştür. Ardından 50 ml distile su eklenerek toplamda 100 ml hacme tamamlanmıştır. Çözeltinin pH'ını 4.2 olarak dengelemek için, yavaş yavaş HCL eklenmiş ve pH metre ile ölçülmüştür. Hazırlanmış olduğumuz çözeltiden kuyu başına 700-1000 µl eklenerek, çalkalayıcı özelliği olan bir inkübatör üzerinde, 20-25°C'de 30 dk boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Sürenin sonunda spektrofotometrik ölçümle, değerler 570 nm'de analiz edilmiştir.

3.7. Süksinik Asit Dozunun Sunitinib-Dirençli Hücreler için Belirlenmesi

Yaklaşık 7-8 ay sonunda sunitinib direnci oluşturulmuş hücrelerde, süksinik asit tedavisinin etkin değeri olan IC₅₀'yi belirlemek için, artan süksinik asit dozları ile 48-72 saat olarak çalışılmıştır. Sunitinib duyarlı hücreler de aynı şekilde sunitinib-dirençli hücreler gibi değişen süksinik asit dozları ile muamele edilmiştir. Moleküler ağırlığı 118.09 g/mol süksinik asitten, 10 mg tartılıp, 8,4681 ml DMSO içerisinde çözülerek, 10 mM stok çözelti hazırlanmıştır. Ardından stoktan dilüsyon edilen süksinik asit, daha önceki çalışmalarımızdan da yola çıkarak sırasıyla 5-10-25-50-100-250-500 µM ve 1mM, 2mM, 5mM konsantrasyonlar hazırlanarak çalışılmıştır.

3.8. VEGF-A, HIF-1A ve VHL için ELISA Deneyleri

3.8.1. Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması

Çalışmamızda inceleyeceğimiz proteinlerden hücre dışında ifade edilebilen VEGF-A için, 7 ml besiyeri ortamlarından her bir gruba ait kontrol, ilaçlı ve kombinasyon örnekleri, 15 ml hacimli falkonlara aktarılıp santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı -80 °C dondurucuda daha sonra çalışmak üzere stoklanmıştır. Hücre içerisinde ifade edilen proteinlerden HIF-1A ve VHL proteinleri için ise, hücrelerin besiyeri ortamları uzaklaştırıldıktan sonra, iki kez soğuk PBS ile yıkanmışlar, ardından 1x10⁷ hücre başına 1 ml olmak üzere RIPA buffer eklenmiş olup, scrapper kullanılarak yüzey kazındıktan sonra, sıvı ortam-hücre homozenizasyonu steril tüplere aktarılmıştır. Tüpler, 20 dakika boyunca +4 °C ortam koşulları sağlanarak, buz üzerinde ajite edilmiştir. Bu süre sonunda yine +4 °C soğutucu özellikli santrifüj kullanılarak, 20

dakika boyunca 13,000xg hızında santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmı daha sonra çalışılmak üzere -80'de muhafaza edilmiştir.

3.8.2. ELISA yöntemi ile protein seviyelerinin tespiti

Çalışmalar için HIF-1A, VHL ve VEGF-A genlerine ait BT LAB (Çin) markalı olarak temin edilen kitler protokollerinde belirtilen özel şartlar takip edilmiştir. Temel ve ortak prosedür olarak deneye başlamadan önce, tüm reaktifler oda sıcaklığına getirilmiştir. En büyük konsantrasyona sahip standart, standart seyreltici ile sulandırarak önce stok standart oluşturulmuştur. Ardından prosedürde belirtilen seyreltme oranları kullanılarak diğer tüm standartlar hazırlanmıştır. Standart kuyucukları olarak belirlenen kuyucuklara, 50 µl standart eklenmiştir. Örneklerin her biri, belirlenen kuyulara 40 µl olacak şekilde eklenmiş, hemen ardından 10 µl insan reaktivitesine sahip HIF-1A antikoru ilave edilmiştir. Son olarak 50 µl streptavidin-HRP eklenmiştir. Kuyucuklar önerilen doğrultuda karıştırılmış, hemen ardından, sealer olarak adlandırdığımız koruyucu yapışkan ile kapatılarak 37°C'de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bu işlemin tamamlanmasının ardından daha önceden önerilen şekilde sulandırılarak hazırlanan yıkama solüsyonu kullanılarak 5 kez yıkama tamponuyla yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Son yıkama adımının ardından, plaka içerisinde kalan sıvı, filtre kağıt veya havlu kağıt üzerine emdirilmiştir. Bunu takiben, kuyucukların her birine sırasıyla 50 µl olmak üzere, önce substrat A ve ardından B solüsyonu eklenip, tekrar sealer kullanılıp kapatılmış olup, 37°C'de 10 dakika boyunca karanlık bir ortam koşulu sağlanarak inkübasyona bırakılmıştır. Hemen ardından, reaksiyonu durdurmak üzere, her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek, mavi rengin sarıya dönüşü gözlenmiştir. Son olarak, 10 dakika içinde 450 nm dalga boyunda, kuyucukların optik yoğunluğu (OD) miktarı elde edilmiştir.

3.8.3. ELISA ile VEGF Düzeylerinin Belirlenmesi

BT LAB markalı, E0050Hu katalog numaralı, 3-900ng/L örnek aralığı ve hassasiyet 1.52ng/L sandviç temeline dayanan kit kullanılmıştır. İnsan VEGF-A antikoru ile daha önceden kaplanmış olan kit üzerine çalışılacak örneklerde bulunan VEGF-A eklenerek, kuyucuklardaki antikorlara bağlanması beklenmiştir. Ardından biyotinlenmiş İnsan VEGF-A antikoru eklenerek, numunedeki VEGF-A'ya bağlanması beklenir. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve Biyotinlenmiş VEGF-A antikoruna bağlanır. Inkübasyon tamamlandıktan sonra bağlanma işlemi gerçekleşmemiş

Streptavidin-HRP, yıkama ile uzaklaştırılmıştır. Substrat solüsyonu eklenmesini takiben, renk değişimi izlenmiştir. Reaksiyonu sonlandırmak için durdurma solüsyonu eklenmiş ve hemen ardından absorbans değerleri 450 nm spektrofotometre cihazında tespit edilmiştir. Standart konsantrasyonları sırasıyla; 960ng/L, 480ng/L, 240ng/L, 120ng/L, 60ng/L ve 30ng/L olarak verilen kit için 15ng/L ve 7,5ng/L olmak üzere 2 adet standart daha eklenerek çalışılmıştır.

3.8.4. ELISA ile HIF-1A Düzeylerinin Belirlenmesi

BT LAB markalı E0422Hu katalog numaralı, 0.05-15ng/ml örnek belirleme aralığı, ve hassasiyeti 0.01ng/ml olan yine sandviç temelli kit kullanılmıştır. Standart konsantrasyon değerleri, 16ng/ml, 8ng/ml, 4ng/ml, 2ng/ml, 1ng/ml ve 0.5ng/ml olarak verilmiş kite göre grafik değerlendirilmiştir.

3.8.5. ELISA ile VHL Düzeylerinin Belirlenmesi

BT LAB markalı E6401Hu katalog numaralı, 15-3000ng/L örnek belirleme aralığı, ve hassasiyeti 7.03ng/L olan sandviç ELISA yöntemini temel alan kit kullanılmıştır. Grafik çizilirken, kit içerisinde 3200ng/L, 1600ng/L, 800ng/L, 400ng/L, 200ng/L, ve 100ng/L olarak sağlamış olan standart konsantrasyonlarına, 50ng/L ve 25ng/L iki adet standart daha eklenerek değerlendirilmiştir.

3.9. RNA İzolasyonu İçin Ön Hazırlık

Sunitinib dirençli ve sunitinib duyarlı hücreler, 25 cm² boyutundaki flasklarda geliştirilmiş ve bu aşama için pasaj sayısı ve ilaçla muamele süresi yönünden yapılan diğer deneylerle eş gruplar kullanılmıştır. Deneyin 48 saat öncesinde, ortam besiyeri değiştirilerek, düşük FBS (%1) içeren besiyeri kullanılmıştır.

3.9.1. TRIzol ile RNA İzolasyonu

3.9.1.1. Hücre Homojenizasyonu

Besiyeri ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, flaskların yüzeyine, kullandığımız TRIzol markasının önerdiği şekilde, 10 cm² alan başına 1 ml olacak şekilde, doğrudan TRIzol eklenmiştir. Aynı şekilde, markanın önerisi üzerine TRIzol eklenmeden önce PBS ile yıkama işlemi uygulanmamıştır. TRIzol eklendiğinde parçalanmaya başlayan hücreler, yavaş ve dikkatli bir şekilde flask içerisinde TRIzol ile pipetajla ve yüzey yıkanarak 1,5 ml hacimli steril tüpler içerisinde toplanmıştır.

3.9.1.2. Faz Ayırma Adımı

Önceki basamakta elde edilen homojenat, oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edilerek, nükleo-protein birlikteliğinin tamamen ayrılması beklenmiştir. Faz ayrımı için başlangıçta kullandığımız TRIzol miktarına göre, 1 ml TRIzol için 4-bromoanisole (BAN) 0,2 ml eklenmiştir. Tüpler 10 dakika boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında, 12,000xg dönüş hızında, +4° C sıcaklıkta, 15 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında, tüpler en üstte RNA içeren renksiz süpernatant, orta katmanda DNA interfaz ve en altta da proteinleri içeren toplam 3 faz olarak ayrılmıştır. RNA içeren süpernatant miktarı, başlangıçta eklenen TRIzol miktarının %60'ı kadar olduğu için, sonraki adımda üst sıvıyı ayrı tüpe aktarırken DNA içeren kısma çok yaklaşmamak, kontaminasyonu engellemek adına önemlidir.

3.9.1.3. RNA'nın Çöktürülmesi

RNA içeren faz dikkatlice toplanıp deneyin devamı için yeni tüpe alınmıştır. DNA ve protein içeren diğer tüp, daha sonra izole edilmek istendiğinde saklanmak üzere -20 °C dondurucuda muhafaza edilmiştir. RNA'nın pellet olarak dipte çöktürülmesi için izopropanol kullanılmıştır. Bu noktada izopropanolun buz üzerinde bekletilmiş olması, çöken RNA pelletinin görünürlüğü açısından önemlidir. Başlangıçta kullanılan miktara bağlı olarak, 1 ml TRIzol için 0,5 ml izopropanol eklenmiştir. Örnekler oda sıcaklığında 5-10 dakika boyunca inkübe edildikten sonra 12,000xg dönüş hızında, +4° C sıcaklıkta, 8 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjden çıkarılan tüplerin dip kısmında beyaz bir pellet şeklinde RNA görülmüştür.

3.9.1.4. RNA Yıkama İşlemi

Süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılır. Pellet 1ml %75 etanol ile yıkanır ve kısaca vorteks işlemine tabi tutulur. Sonraki adımda 7,500xg dönüş hızında, +4° C sıcaklıkta, 5 dakika boyunca santrifüj edilir. Santrifüj işlemi sonrasında pelletin hareket ettiği veya tüpün dibinde değil de yan taraflarında toplandığı görüldüğünde, tekrar 12,000xg hızda santrifüj işlemi uygulanarak RNA dipte sağlıklı şekilde toplanmıştır.

3.9.1.5. RNA'nın Çözünmesi

Etanol uzaklaştırılarak RNA pelleti yalnız bırakılmıştır. Ancak bu noktada, RNA'nın tamamen kurutulmaması önemlidir. Yaklaşık 20-100 µl etanol, göz kararı tüpün içinde bırakılarak, kapak açık şekilde kendi kendine buharlaşması için 3-5 dakika

beklenmiştir. Hemen ardından yaklaşık 40-50 µl dietil pirokarbonat (DEPC) su ile homojenize edilerek saflık ve konsantrasyonlarının ölçümü nanodrop cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.9.1.6. RNA Saflık ve Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Sulandırılan örnekler MaestroNano Micro-Volume Spectrophotometer cihazında ölçülmüştür. Örnekler 260, 280 ve 230 dalga boyunda verdikleri absorbanlara göre oranlanarak saflıkları, 40x sulandırma faktörü x A 260 formülü kullanılarak ise konsantrasyonları µg/ml cinsinden hesaplanmıştır.

3.9.2. Elde edilen RNA'lerden cDNA dönüşümlerinin gerçekleştirilmesi

RNA konsantrasyon ve saflıkları uygun görülen örneklerin, hepsi 100 ng'a eşitlenmek suretiyle RNAase içermeyen saf su ile sulandırma-dilüsyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyon eşitlikleri sağlanan RNA örnekleri cDNA çevrimi yapılmak üzere SCRIPT cDNA Sentez Kiti (PCR-511S, Jena Bioscience, Almanya) kullanılarak, ürün sağlayıcının belirttiği protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir. RNA örneklerinin cDNA dönüşümü için gerekli protokol Tablo 3-2'de ve ayrıca PZR şartları Tablo 3-3 içerisinde verilmiştir. cDNA dönüşümü tamamlanan örnekler, daha sonra kantitatif gerçek zamanlı PZR (qPCR) çalışılmak üzere -20 °C dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Tablo 3-2: RNA örneklerinden cDNA eldesi, reaksiyon içeriği

Kullanılan Bileşen	Kullanılan Miktar
RNAaz içermeyen saf su	11 µl
Random Primer	1 µl
5X Buffer	4 µl
dNTP karışımı	0,5 µl
RNAaz inhibitörü	0,5 µl
Revers Transkriptaz Enzimi	1 µl
Örnek başına RNA miktarı	2 µl

Tablo 3-3: mRNA için gerekli PZR koşulları

Sıcaklık Koşulu	İnkübasyon Süresi
50 °C	60 dakika
42 °C	10 dakika
70 °C	10 dakika

3.9.3. Real-Time PZR yöntemi ile gen ifadelerinin tayini

Reaksiyon karışımının hazırlanması aşamasında kullanılan malzeme ve miktarlara ait bilgiler Tablo 3-4'te verilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde hesaplanarak çalışılmıştır.

Tablo 3-4: qPZR reaksiyonu için protokol

Kullanılan Bileşen	Kullanılan Miktar
SYBR® Green	10 µl
İleri Yönlü Primer	0,6 µl
Geri Yönlü Primer	0,6 µl
RNAaz içermeyen saf su	6,8 µl
Örneklere ait cDNA miktarı	2 µl

Çalışmada gen anlatım düzeyleri saptanmak istenen hedef genlere ait ileri ve geri primer dizileri ile bu primerler için uygun bağlanma sıcaklıkları Tablo 3-5'te verilmiştir.

Tablo 3-5: Hedef primerlerin dizileri ve erime noktası dereceleri (T_m)

Hedef Gen	Primerlere ait diziler	Erime Sıcaklıkları
VEGF-A	F: TTGCCTTGCTGCTCTACCTCCA R: CTGGAAGATGTCCACCAGGG	52°C
VEGF-C	F: GCCAATCACACTTCCTGCCGAT R: AGGTCTTGTTGCTGCCTGACA	61°C
PDGF-A	F: CAGCGACTCCTGGAGATAGACT R: CGATGCTTCTCTTCTCCGAATG	61°C
HIF-1A	F: TCCAGCAGACTCAAATACAAGAAC R: GTATGTGGGTAGGAGATGGAGATG	60°C
TGF-β	F: CCTGTTTCGCGCTCTCGGCAGT R: GACAGGATCTGGCCGCGGAT	52°C
VHL	F : CGGGTGGTCTGGATCGCGG R : AGTTCACCGAGCGCAGCA	52,2°C
ANGPT1	F: GGAGAAGCTGCCAGGTGAG R: CAGTGGAGTTTTCTATAGTC	60°C
TIE2	F: GACACCATCCAAACATCATC R: CAATGGCAAATGCTGGGTCCG	52°C
GAPDH	F:ATCTTCCAGGAGCGAGATC R:CAGGAGGCATTGCTGATGA	52-61 °C

Her gene ait ekspresyonun saptanması için spesifik primerler kullanılarak hazırlanan reaksiyon karışımları toplamda 18 μ l hazırlanarak 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş olup, her örnek için ayrı kuyucuklara dağıtılmak üzere 2 μ l dağıtılmıştır. Plakalar sealer ile kapatıldıktan sonra PZR işlemi için Bio-Rad (Kaliforniya, Amerika), CFX96 cihazında çoğaltma işlemi başlatılmıştır. Bu adımda PZR için gerekli sıcaklık şartları ve döngülere ait bilgiler Tablo 3-6 içerisinde verilmiştir.

Tablo 3-6: Gerçek zamanlı PZR koşulları

Reaksiyona ait adımlar	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95	2 dakika	-
Denatürasyon	95	15 saniye	40
Bağlanma	Tablo 3-5'de verilen dereceler kullanılmıştır	30 saniye	
Soğuma	40	10 saniye	-

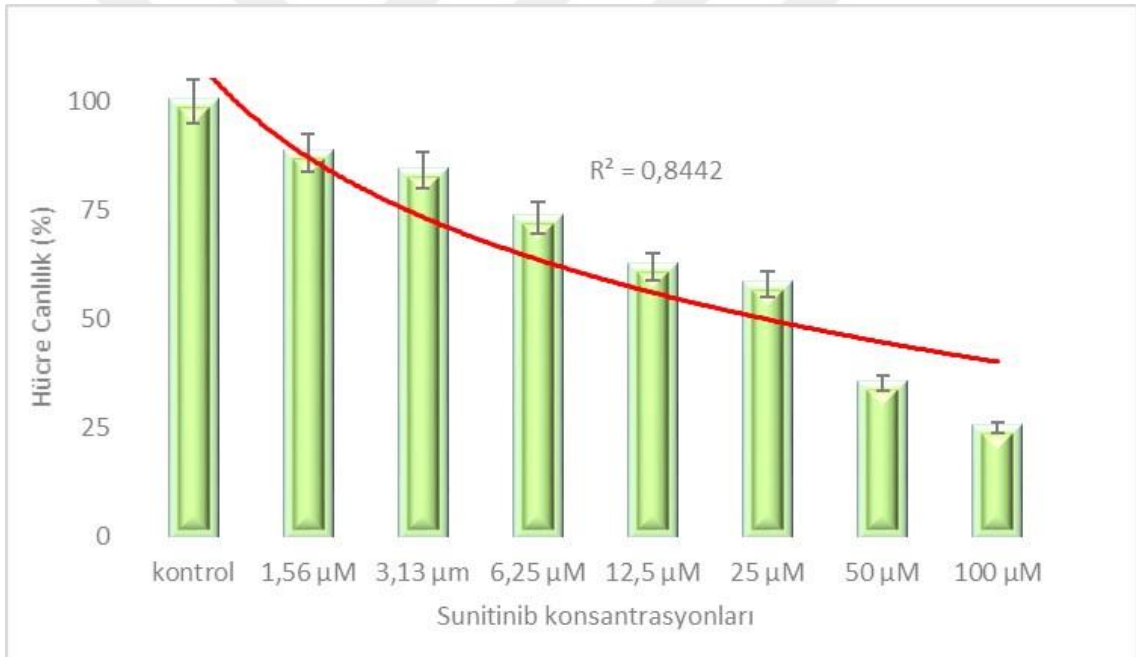
Gerçekleşen PZR çalışmasını takiben, tüm hedef genleri ve GAPDH kontrol genlerinin CT (Threshold cycle) değerleri kullanılarak, ΔCT ve $\Delta\Delta CT$ farkları belirlenmiş olup, gen ekspresyonu kat değişimleri, $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analiz

Çalışma verilerimiz SPSS 18 programı kullanılarak analiz edilmiş olup, gen ekspresyonlarının gösterimi ve korelasyonlara ait çizimler için GraphPad Prism 8.0.2 programı kullanılmıştır. Tedavi ve kontrol grupları arasındaki ilişkiler, Mann Whitney-U testi kullanılarak $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi olmak üzere değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamızın temelini oluşturan direnç gelişiminin gerçekleştirilebilmesi için, öncelikle sunitinib etkin dozu belirlenmiş olup, IC_{50} değeri, ACHN hücreleri için Şekil 4-1’de gösterildiği gibi 26,27 μM olarak tayin edilmiştir. Ancak direnç gelişiminin, 10 μM sunitinib dozuna karşı geliştirilmesine uygunluğu, yapılan kristal viyole boyama deneyi ile de ayrıca doğrulanmıştır. ACHN hücrelerinde 10 μM sunitinib dozuna karşı direnç kazandırılan hücrelerde daha sonraki sunitinib ile tedavi uygulaması olarak, metin içerisindeki tüm tablo ve grafiklerde belirtilen “sunitinib tedavisi” ifadesi 10 μM sunitinib dozunu temsil etmektedir.

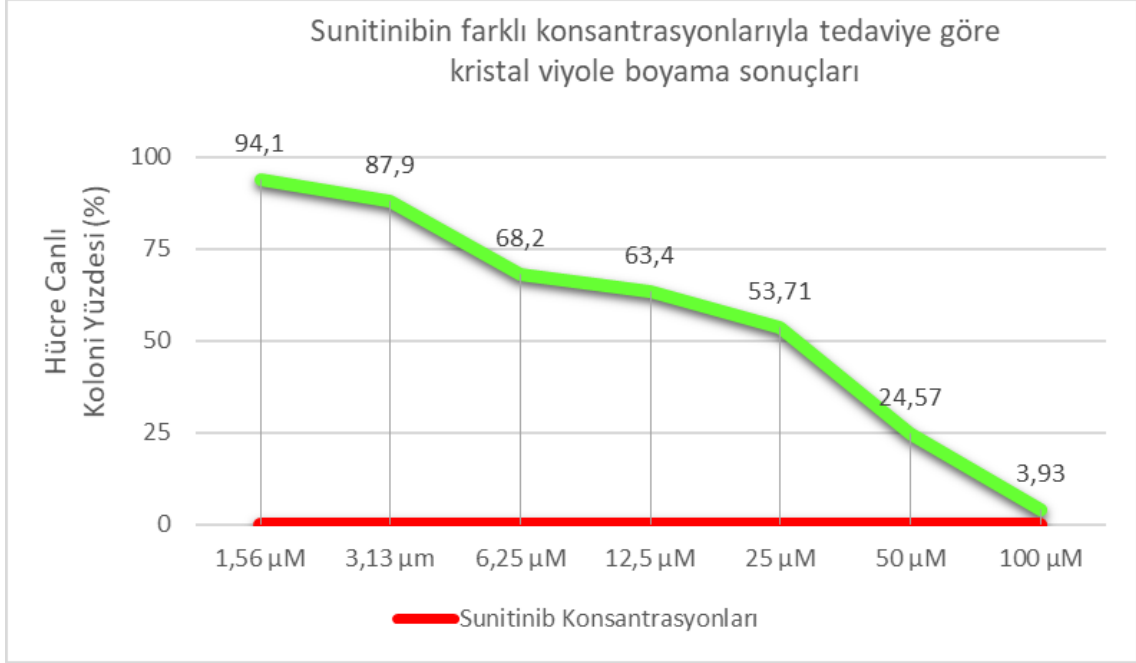


Şekil 4-1: ACHN hücrelerinde sunitinib IC_{50} değerinin belirlenmesi

Kristal viyole boyama sonuçları

Temel olarak, hücre kolonilerinin canlı hücreler üzerinden boyanma yoluyla değerlendirildiği bu yöntemle Şekil 4-2 üzerindeki sonuçlarımıza göre, 25 μM dozları ile uygulamada, %53,71 canlılık yani %46,29 oranında ölüm görülmüştür. Her iki yöntemle de etkin doz olarak, 25 μM ’nin uygun olduğu değerlendirilerek, diğer yandan 10 μM doz etkinliğinin de %40 oranında proliferasyon üzerinde baskılama yönüyle

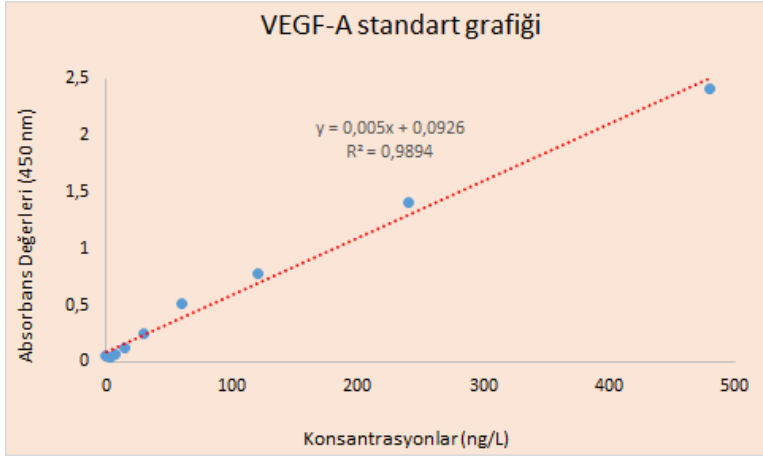
başarı göstermesi, direnç geliştirilecek doz olarak 10 μM 'nin yukarısına çıkılmasını gerektirmeden, bu doz ile hücreler üzerindeki devamlı uygulama kararı almamızda temel oluşturmuştur.



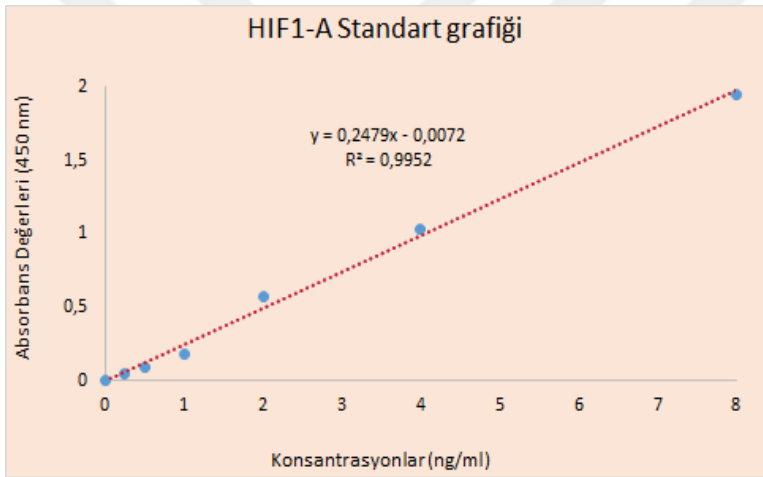
Şekil 4-2: Kristal viyole boyama sonuçları

4.1. ELISA Sonuçları

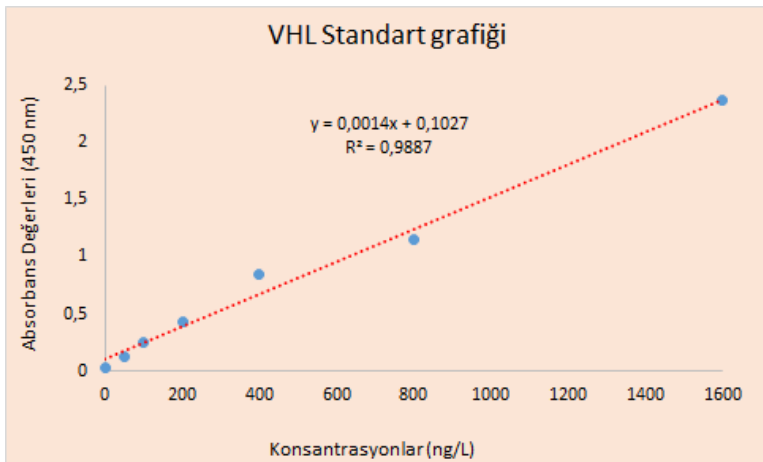
VEGF-A, HIF-1A ve VHL protein düzeylerinin sunitinib duyarlı ve sunitinib dirençli ACHN hücrelerinde, tüm tedavi uygulamalarına göre farklılıklarının belirlenmesi için, öncelikle her bir kit için standartların konsantrasyonlarına ait grafikler elde edilmiş olup, ardından eğrilerin dağılımına göre konsantrasyon ve absorbansların hesaplanacağı formül elde edilmiştir. Örneklerin absorbansları formülde yerine konularak her bir örneğin denk geldiği protein konsantrasyonları belirlendikten sonra, bu protein düzeyleri ilgili grafikler üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 4-3: VEGF-A ELISA standartlarına ait eğri grafiği



Şekil 4-4: HIF-1A ELISA standartlarına ait eğri grafiği



Şekil 4-5: VHL ELISA standartlarına ait eğri grafiği

Tablo 4-1: Sunitinibe duyarlı hücrelerdeki protein düzeylerinin, tedavi gruplarına göre karşılaştırılması

Hedef Protein	Tedavi Grupları					
	Kontrol (a)	+ Sunitinib (b)	Sunitinib + 25 µM Süksinik asit (c)	Sunitinib + 50 µM Süksinik asit (d)	25 µM Süksinik asit (e)	50 µM Süksinik asit (f)
VEGF-A	100 (97-103)	109,6 (89-129)	124,4 ^{a *} (121-127)	106,8 (86-126)	106,9 ^{c *} (96-116)	91,8 ^{c #, e Δ} (87-95)
HIF-1A	98,75 (97-100)	111,2 ^{a *} (100-121)	117,5 ^{a *} (112-122)	177,4 ^{a *, (b, c) #} (65-189)	169,5 ^{(a, b, c) *} (149-189)	227,3 ^{a *, (b, c, d, e) #} (190-259)
VHL	100,5 (96-106)	68,4 ^{a *} (63-73)	53,7 ^{a *, b Δ} (43-63)	105,6 ^{(b, c) #} (95-115)	91,8 ^{(a, b, c) *, d Δ} (87-95)	63,3 ^{a *, (d, e) #} (60,65)

Proteinlerin satırındaki her sayısal değer ait olduğu sütundaki tedavi uygulaması sonrası belirlenen protein düzeyi yüzde ortalamasını temsil etmektedir. Ortalama değerlerin altındaki parantez içerisindeki veriler, minimum ve maksimum aralıktır. Ortalama değer üzerinde yer alan harf kodları, aynı proteinin duyarlı grup içinde karşılaştırıldığı tedavi grubu (a,b,c,d,e) ile kıyaslanması sonucuna göre anlamlı farklılık olduğunu belirtmektedir. Yalnızca anlamlı değerler için harf atanmıştır.

Örneğin; 53,7^{a *, b Δ} = VHL proteini için, sunitinib+25 µM süksinik asit(c) grubu ile tedavi sonucundaki protein ortalamasının, sırasıyla kontrol(a) ve sunitinib(b) gruplarına kıyaslandığında anlamlı bir farklılık olduğunu ifade eder.

Bu tablodaki harflerin yanındaki simgelerden; * ile p=0,020, # ile p=0,021, Δ ile p=0,043 için anlamlılık düzeyleri temsil edilmiştir. Deneyler 4'er kez tekrar edilmiştir (n = 4).

Protein yüzdesi^a, bulunduğu sütundaki tedavinin kontrole;

Protein yüzdesi^b, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib uygulanmış gruba;

Protein yüzdesi^c, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib+25 µM süksinik asit uygulanmış gruba;

Protein yüzdesi^d, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib+50 µM süksinik asit uygulanmış gruba;

Protein yüzdesi^e, bulunduğu sütundaki tedavinin, 25 µM süksinik asit uygulanmış gruba göre protein düzeyleri yönüyle kıyaslandığında anlamlı farklılık olduğunu belirtir.

VEGF-A protein düzeylerinin sunitinibe duyarlı hücrelerde, kontrol ve yalnız sunitinib ile tedaviye göre süksinik asitin tek başına 25 µM dozu ve sunitinib ile kombinasyonu tedavi sonrasında sırasıyla anlamlı düzeylerde arttığı görülmüştür (p=0,020). Sunitinibin 50 µM dozundaki kombine ve tek başına tedaviler sonucunda kontrol ve sunitinib ile tedavi edilmiş hücre gruplarındakine göre anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Sunitinibe dirençli ve sunitinibe duyarlı hücrelerdeki protein düzeyleri, tedavi koşullarına bağlı olarak karşılaştırıldığında, VEGF-A düzeylerinin sunitinibin 25 µM ve 50 µM süksinik asit birlikteliğindeki tedavileri sonrasında dirençli hücrelerde, sunitinibe duyarlı kontrol hücrelerine göre anlamlı olarak 1,3 ve 1,4 kat arttığı tespit edilmiştir (p=0,020). Tek başına 25 µM ve 50 µM süksinik asit tedavilerinde ise duyarlı

gruptaki eş tedavilere oranla 1,2 ($p=0,043$) ve 1,7 kat ($p=0,021$) anlamlı artışlar tespit edilmiştir.

Tablo 4-2: Sunitinibe dirençli hücrelerdeki protein düzeylerinin duyarlı grup ile karşılaştırılması

Hedef Protein	Tedavi Grupları					
	Kontrol (a)	+ Sunitinib (b)	Sunitinib + 25 μ M Süksinik asit (c)	Sunitinib + 50 μ M Süksinik asit (d)	25 μ M Süksinik asit (e)	50 μ M Süksinik asit (f)
Duyarlı/ VEGF-A	100 (97-103)	109,6 (89-129)	124,4 (121-127)	106,8 (86-126)	106,9 (96-116)	91,8 (87-95)
Dirençli/ VEGF-A	100,3 (85-115)	93,6 (83-103)	142,8 ^{a *} (122-162)	132,8 ^{a *, d □} (108-156)	130,3 ^{a *, e □} (115-145)	159,8 ^{a *, f #} (139-179)
Duyarlı/ HIF-1A	98,75 (97-100)	111,2 (100-121)	117,5 (112-122)	177,4 (65-189)	169,5 (149-189)	227,3 (190-259)
Dirençli/ HIF-1A	138 ^{a *} (130-150)	140,4 ^{a *, b □} (120-160)	119,1 ^{a *} (109-129)	129,0 ^{a *, d #} (108-148)	125,0 ^{e □} (95-155)	206,4 ^{a *} (196-226)
Duyarlı/ VHL	100,5 (96-106)	68,4 (63-73)	53,7 (43-63)	105,6 (95-115)	91,8 (87-95)	63,3 (60,65)
Dirençli/ VHL	94,4 (87-100)	118,2 ^{a *, b #} (114-122)	102,9 ^{c #} (101-104)	102,4 (92-112)	131,5 ^{a *, e #} (124-138)	163,3 ^{a Δ, f ○} (128-194)

Proteinlerin satırındaki her sayısal değer ait olduğu sütundaki tedavi uygulaması sonrası belirlenen protein düzeyi yüzde ortalamasını temsil etmektedir. Ortalama değerlerin altında, parantez içerisindeki veriler, minimum ve maksimum aralıktır. Ortalama değer üzerinde yer alan harf kodları, aynı proteinin duyarlı grup içinde karşılaştırıldığı tedavi grubu (a,b,c,d,e) ile kıyaslanması sonucuna göre anlamlı farklılık olduğunu belirtmektedir. Yalnızca anlamlı değerler için harf atanmıştır.

Bu tablodaki harflerin yanındaki simgelerden; * ile $p=0,020$, # ile $p=0,021$, Δ ile $p=0,032$, ○ ile $p=0,034$ ve □ ile $p=0,043$ için anlamlılık düzeyleri temsil edilmiştir.

Deneyler 4'er kez tekrar edilmiştir ($n = 4$).

Protein yüzdesi^a, bulunduğu sütundaki tedavinin duyarlı kontrole;
Protein yüzdesi^b, bulunduğu sütundaki tedavinin, duyarlı sunitinib uygulanmış gruba;
Protein yüzdesi^c, bulunduğu sütundaki tedavinin, duyarlı sunitinib+25 μ M süksinik asit uygulanmış gruba;
Protein yüzdesi^d, bulunduğu sütundaki tedavinin, duyarlı sunitinib+50 μ M süksinik asit uygulanmış gruba;
Protein yüzdesi^e, bulunduğu sütundaki tedavinin, duyarlı 25 μ M süksinik asit uygulanmış gruba göre protein düzeyleri yönüyle kıyaslandığında anlamlı farklılık olduğunu belirtir.

Dirençli hücre grupları içerisindeki, farklı tedavi uygulamalarındaki grup içi karşılaştırmalarda VEGF-A protein düzeylerinin, süksinik asitin her iki dozunun tek başına ve sunitinib kombinasyonu şeklinde uygulanmasına bağlı olarak kontrol ve sunitinib ile tedavi edilmiş gruplara oranla arttığı elde edilmiştir. HIF-1A düzeyleri için de, sunitinib ile tedavi sonrasında artan protein düzeyleri, 25 μ M süksinik asitin tek başına ve sunitinib ile kombine tedavileri sonrasında, yalnız sunitinib ile tedaviye göre anlamlı değişim göstermemiştir. Süksinik asitin 50 μ M doz kullanımının tek başına ve

sunitinib kombinasyonu için protein düzeylerindeki artışı, yalnız sunitinib ile tedaviye göre sırasıyla 1,5 ve 2 kat artırdığı belirlenmiştir ($p=0,021$).

Tablo 4-3: Dirençli hücrelerdeki protein düzeylerinin yalnızca dirençli grup içinde karşılaştırılması

Hedef Protein	Tedavi Grupları					
	Kontrol (a)	+ Sunitinib (b)	Sunitinib + 25 μ M Süksinik asit (c)	Sunitinib + 50 μ M Süksinik asit (d)	25 μ M Süksinik asit (e)	50 μ M Süksinik asit (f)
VEGF-A	100,3 (85-115)	93,6 (83-103)	142,8 ^{(a, b) *} (122-162)	132,8 ^{a □, b *} (108-156)	130,3 ^{a Δ, b *} (115-145)	159,8 ^{(a, b) *, (d, e) □} (139-179)
HIF-1A	138 (130-150)	140,4 (120-160)	119,1 ^{a *, b □} (109-129)	129,0 (108-148)	125,0 (95-155)	206,4 ^{(a, b, c, d, e) *} (196-226)
VHL	94,4 (87-100)	118,2 ^{a *} (114-122)	102,9 ^{(a, b) *} (101-104)	102,4 ^{b *} (92-112)	131,5 ^{(a, b, c, d) *} (124-138)	163,3 ^{(a, b, c, d) #} (128-194)

Proteinlerin satırındaki her sayısal değer ait olduğu sütundaki tedavi uygulaması sonrası belirlenen protein düzeyi yüzde ortalamasını temsil etmektedir. Ortalama değerlerin altında, parantez içerisindeki veriler, minimum ve maksimum aralıktır. Ortalama değer üzerinde yer alan harf kodları, aynı proteinin dirençli grup içinde karşılaştırıldığı tedavi grubu (a,b,c,d,e) ile kıyaslanması sonucuna göre anlamlı farklılık olduğunu belirtmektedir. Yalnızca anlamlı değerler için harf atanmıştır.

Bu tablodaki harflerin yanındaki simgelerden; * ile $p=0,021$, Δ ile $p=0,029$, □ ile $p=0,034$, □ ile $p=0,043$ için anlamlılık düzeyleri temsil edilmiştir.

Deneyler 4'er kez tekrar edilmiştir ($n = 4$).

Protein yüzdesi^a, bulunduğu sütundaki tedavinin kontrole;

Protein yüzdesi^b, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib uygulanmış gruba;

Protein yüzdesi^c, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib+25 μ M süksinik asit uygulanmış gruba;

Protein yüzdesi^d, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib+50 μ M süksinik asit uygulanmış gruba;

Protein yüzdesi^e, bulunduğu sütundaki tedavinin, 25 μ M süksinik asit uygulanmış gruba göre protein düzeyleri yönüyle kıyaslandığında anlamlı farklılık olduğunu belirtir.

Sunitinibe dirençli ve duyarlı hücre gruplarının, kontrolleri ve yalnız sunitinib ile tedavi edilmiş grupları arasında kıyaslandığında, HIF-1A protein düzeylerinin, dirençli hücrelerde anlamlı olarak sırasıyla 1,4 ve 1,2 kat arttığı değerlendirilmiştir ($p=0,020$). 50 μ M süksinik asitin sunitinib birlikteliğindeki tedavi koşulu açısından dirençli ve duyarlı hücreler sırasıyla karşılaştırıldığında, dirençli hücrelerde duyarlı hücredeki tedavi sonuçlarına göre, protein düzeyleri 1,3 kat anlamlı azalma ile tespit edilmiştir ($p=0,021$). Tek başına 25 μ M süksinik asit tedavisinde duyarlı gruptaki eş tedavilere oranla 1,3 kat anlamlı bir düşüş elde edilmiştir ($p=0,043$). HIF-1A protein düzeylerinin, 25 μ M süksinik asit ve sunitinib kombinasyon tedavisi sonrasında, sırasıyla kontrole göre ($p=0,021$) ve yalnız sunitinib ile tedavi edilmiş gruba oranla ($p=0,043$) anlamlı azalma eğiliminde olduğu elde edilmiştir. Özellikle 50 μ M süksinik asitin tek başına tedavisi diğer tüm tedavi gruplarına göre tek tek incelendiğinde, HIF-

1A protein düzeylerinde anlamlı artışlara neden olmuştur. VHL protein düzeyleri, sunitinibin tek başına etkisi ile anlamlı düzeyde ve 1,5 kat azalırken; süksinik asitin tek başına 25 µM doz uygulamasında, yalnız sunitinib ile olan tedaviye göre anlamlı düzeyde 1,3 kat artmıştır ($p=0,020$). Ancak sunitinib ile kombine edildiğinde, 25 µM süksinik asit dozu birlikteliğinde VHL seviyelerinin, 50 µM süksinik asit dozu ile kombine edilen sunitinibe göre daha düşük olduğu belirlenmiştir. Dirençli hücrelerde duyarlı gruba göre, sunitinib ile tedavi sonrasında, VHL seviyelerinin anlamlı düzeyde 1,7 kat; aynı şekilde sunitinibin 25 µM süksinik asit ile kombinasyonunda, duyarlı hücredeki paralel tedavi grubuna göre 1,9 kat anlamlı artışlar not edilmiştir ($p=0,021$). Tek başına 25 µM ve 50 µM süksinik asit tedavileri, dirençli ve duyarlı hücreler arasında VHL protein düzeyleri yönünden paralel tedavi grupları arasında kıyaslandığında, her ikisinin de dirençli gruplarda sırasıyla 1,4 kat ($p=0,021$) ve 2,5 kat ($p=0,034$) artışa neden olduğu görülmüştür. Sunitinib tedavisi ile artan VHL protein düzeyleri, 25 µM süksinik asit ve sunitinib kombinasyonunda, yalnız sunitinib uygulamasına göre düşük fakat kontrole göre yüksek bir seyir izlemiştir. Ancak tek başına 25 µM süksinik uygulamasının; kontrol, yalnız sunitinib ve sunitinib+25 µM süksinik kombinasyon tedavi gruplarıdaki sonuçlara oranla anlamlı artışı tespit edilmiştir. Süksinik asitin 50 µM dozunda ise, diğer tüm tedavi gruplarına oranla en yüksek ve anlamlı VHL düzeyleri tespit edilmiştir.

4.2. Real-Time PCR Sonuçlarına göre gen ekspresyon değişim sonuçları

4.2.1. Sunitinibe duyarlı gruplar arasındaki karşılaştırma

Sunitinib ve süksinik asitin tek başına ve birlikte olan etkinlikleri, farklı tedavi grupları oluşturularak, sunitinibe duyarlı hücreler üzerindeki gen ekspresyonlarının bu tedavilere karşı verdikleri yanıtlar ile incelenmiştir (Tablo 4-4). VEGF-A gen ekspresyon düzeylerinin duyarlı hücrelerdeki 25 µM süksinik asitin tek başına ve sunitinib ile kombinasyonunda kontrole göre sırasıyla 1,6 kat ve 2,8 kat azaldığı elde edilmiştir ($p=0,020$). Süksinik asitin 50 µM dozundaki uygulamaların, VEGF-A düzeylerini artırdığı elde edilmiştir. Sunitinib etkinliğinde önemli ölçüde azalan VEGF-C gen ekspresyon düzeyleri, yalnızca süksinik asitin 25 µM doz uygulamasında kontrole göre 5 kat anlamlı olarak azalmış ($p=0,020$), sunitinibe oranla benzer düzeylerde seyretmiştir. 50 µM süksinik asitin tek başına ve sunitinib ile kombine tedavileri, duyarlı kontrol seviyelerinde elde edilen VEGF-C ekspresyonlarına yakın

düzeyler ile sonuçlanmıştır. Sunitinib etkinliğinde kontrole göre oldukça düşük tespit edilen PDGF-A gen ekspresyon düzeyleri, yalnızca süksinik asitin 25 ve 50 μ M dozlarının tek başına uygulamalarında azalma eğilimi gösterirken, kombine gruplarla tedavi sonrası PDGF-A düzeyleri yalnız sunitinib tedavisine oranla artış göstermiştir. HIF-1A gen ekspresyon düzeyleri, tek başına 50 μ M süksinik etkinliğinde hem kontrol hem de sunitinib etkinliğine oranla artmış olarak yansırken, sunitinib ile kombine edilen 50 μ M süksinik asit etkinliği, kontrole oranla HIF-1A düzeylerinde 11 kat azalma ile sonuçlanmıştır ($p=0,020$). TGF- β gen ekspresyon düzeyleri kontrole kıyaslandığında, sunitinib etkinliğinde anlamlı olarak azalmış bulunurken, süksinik asitin tüm dahil olduğu tedavi grupları incelendiğinde, yalnızca 25 μ M süksinik asit etkinliğindeki tedavilerde, kontrole göre azalan TGF-B gen ekspresyonları tespit edilmiştir. Sunitinib ile tedaviye göre süksinik asitin 50 μ M dozu ve sunitinib kombinasyonunda 22 kat ve yalnız süksinik asit uygulamasında 12 kat artışlar elde edilmiştir ($p=0,020$). VHL gen ekspresyon düzeyleri sunitinib etkinliğinde, kontrole yakın düzeylerde seyrederken; 25 μ M süksinik asit ile tedavi edilen gruplarda azalmış, 50 μ M süksinik asit ve sunitinib kombinasyonunda tedavi edilen gruplarda ise kontrole göre 1,8 kat artış elde edilmiştir ($p=0,020$). Sunitinib tedavisi sonrası kontrole göre azalan ANGPT1 gen ekspresyon düzeyleri, sunitinib ile kombine süksinik asitin 50 μ M uygulaması sonucunda, sunitinibe göre 3 kat anlamlı artış göstermiştir ($p=0,021$). Süksinik asitin 25 μ M dozunun sunitinib ile kombinasyonu sonucunda, kontrole göre 3,5 kat anlamlı olarak azaldığı ($p=0,021$), sunitinibe göre ise 2,3 kat ancak anlamlı bir azalma olmadığı tespit edilmiştir. TIE2 gen ekspresyon düzeylerinin ise sunitinib tedavisi sonrasında kontrole göre 1,7 kata kadar artan ekspresyon düzeyleri, sunitinib tedavisine oranla, sunitinib ve 25 μ M süksinik asit kombinasyonunda 3,3 kat; tek başına süksinik asitin etkinliğinde ise 2,8 kat anlamlı azalmalar ile sonuçlanmıştır ($p=0,020$). Genel olarak, sunitinibin tedavideki tek başına etkinliği, kontrol gruplarına göre VEGF-C, PDGF-A, TGF- β gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı azalmalara neden olurken; TIE2 düzeyleri için anlamlı artışa neden olmuştur. Sunitinib ve 25 μ M süksinik asitin kombine tedavisi VEGF-A, TGF- β ve TIE2 gen ekspresyon düzeylerinde kontrole göre anlamlı azalmalarla sonuçlanmıştır. Süksinik asitin 50 μ M dozu ile sunitinib kombinasyonu kontrol ve sunitinib gruplarına kıyaslandığında, HIF-1A gen ekspresyon düzeylerinde azalma, VHL düzeylerinde ise artışla sonuçlanmıştır. Yine sunitinibin tek başına tedavi etkinliğine kıyaslandığında, sunitinib ile kombine edilen 50 μ M süksinik asit, VEGF-A,

TGF- β , ANGPT1 ve TIE2 gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı artışlara neden olmuştur. Tek başına 25 μ M süksinik asit uygulamasının, kontrol grubuna göre VEGF-A, VEGF-C, PDGF-A, TGF- β , ANGPT1 ve TIE2 gen ekspresyonu seviyelerinde anlamlı azalmalara neden olduğu değerlendirilmiştir. Özetle tek başına 50 μ M süksinik asit uygulamasının ise genel olarak gen ekspresyon seviyelerindeki artışı tetiklediği elde edilmiştir.

4.2.2. Sunitinibe dirençli grupların, duyarlı gruplara göre kıyaslanması

Sunitinibe karşı direnç geliştirilen gruplarda; sunitinib, süksinik asitin tek başına ve sunitinib ile birlikte direnç sürecinden sonraki etkinlikleri, farklı tedavi grupları oluşturularak, sunitinibe duyarlı hücreler üzerindeki gen ekspresyonlarına kıyaslanarak incelenmiştir (Tablo 4-5). Dirençli gruptaki VEGF-A gen ekspresyon düzeylerinin, duyarlı kontrol ve sunitinib gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. VEGF-C gen ekspresyon düzeyleri, 50 μ M süksinik asit ile sunitinib kombinasyonunda tedavi edilen dirençli grupta, duyarlı hücrelere oranla 8 kat artmış bulunmuştur ($p=0,021$). PDGF-A gen ekspresyon düzeylerinin dirençli grupta sunitinib birlikteliğindeki 50 μ M süksinik asit ile duyarlı gruptaki aynı tedaviye göre 6,7 kat arttığı tespit edilmiştir ($p=0,021$). Süksinik asitin 25 μ M dozu sunitinib kombinasyon tedavisinde duyarlı eşleneğine göre anlamlı bir değişime neden olmazken; tek başına 25 μ M süksinik asit uygulaması duyarlı gruba kıyaslandığında 2,9 kat artışa neden olmuştur ($p=0,021$). HIF-1A gen ekspresyon düzeyleri, sunitinib ile tedavi edilen dirençli grupta, duyarlı gruba göre 3,5 kat artarken ($p=0,021$); sunitinibin 50 μ M süksinik asit ile kombinasyonu sonrasında, duyarlı gruptakine oranla 10 kat arttığı elde edilmiştir ($p=0,021$). Dirençli grupta, sunitinib ile tedavide, duyarlı gruba göre 7 kat artış tespit edilirken, 25 μ M süksinik ile kombine edildiğinde, TGF- β düzeylerinin, tekrar duyarlı gruptaki 25 μ M süksinik asit tedavisi sonrasındaki seviyelere gerilediği görülmüş olup aynı zamanda duyarlı kontrol grubuna kıyaslandığında 3,3 kat azaldığı elde edilmiştir ($p=0,021$). VHL gen ekspresyon düzeyleri, dirençli kontrol grubunda, duyarlı kontrole göre 7, sunitinib tedavi grupları arasında ise 1,8 kat azalmıştır ($p=0,021$). Sunitinibin 25 μ M süksinik asit ile kombinasyonu sonrasında yalnız sunitinib ile tedavideki düzeyler anlamlı bir değişim göstermemiştir. Süksinik asitin 50 μ M dozu için, tek başına ve sunitinib kombinasyonlarının duyarlı gruptaki tedavi eşleniklerine oranla VHL seviyelerinin kombinasyon için 9 kat, tek başına süksinik asit karşılaştırmalarında ise 1,8 kat

azalmaya neden olduğu elde edilmiştir ($p=0,021$). Sunitinib ile tedavi sonrasında, ANGPT1 düzeyleri dirençli grupta, duyarlıya oranla 3 kat artarken ($p=0,043$); sunitinib ile kombine edilen 50 μM süksinik asit tedavisi sonrasında 8 kata kadar arttığı elde edilmiştir ($p=0,021$). Tek başına 25 μM süksinik asit uygulamaları üzerinden değerlendirildiğinde, dirençli grupta, duyarlı gruba göre ANGPT1 gen ekspresyon düzeylerinde 2 kat artış elde edilmiştir ($p=0,043$). TIE2 gen ekspresyon düzeyleri dirençli grupta, duyarlıya göre genel olarak bir azalma eğiliminde iken; kontrol grupları kıyaslandığında dirençli grupta 6 kat azalma, sunitinib tedavisi sonrası ise dirençli grupta 2 kat azalma tespit edilmiştir ($p=0,021$). Özetle dirençli gruptaki sunitinib tedavisi sonrası VHL, VEGF-A ve TIE2 hariç diğer genlerde, duyarlı gruba göre artan gen ekspresyon seviyeleri elde edilmiştir.

4.2.3. Sunitinibe dirençli gruplar arasındaki karşılaştırma

Sunitinibe direnç geliştirilen gruplarda; sunitinib, süksinik asitin tek başına ve sunitinib ile birlikte direnç sonrasındaki, farklı tedavi gruplarının, sunitinibe dirençli hücreler üzerindeki gen ekspresyonlarına etkisi üzerinden incelenmiştir (Tablo 4-6). Sunitinib grubu ile tedavi sonrası, dirençli kontrole oranla 3 kat ($p=0,021$) artan VEGF-A gen ekspresyon seviyeleri, diğer gruplarda da anlamlı artış halinde seyretmiş olup, yalnızca tek başına süksinik asitin 25 μM dozunda azaldığı ($p=0,021$) ve yalnızca sunitinib ile tedaviden elde edilen düzeyin altına indiği tespit edilmiştir. VEGF-C gen ekspresyon düzeyleri için süksinik asitin tek başına veya sunitinib ile kombine edildiği gruplarda, sunitinibin tek başına etkinliğine oranla anlamlı bir sonuç alınamadığı, süksinik asitin 50 μM dozunda, yalnız sunitinib tedavisine göre ekspresyonların 8 kat artışla sonuçlandığı elde edilmiştir ($p=0,021$). PDGF-A gen ekspresyon düzeylerinde sunitinib ile tedavide, kontrol grubuna göre anlamlı bir fark görülmemiş olup, süksinik asitin 50 μM doz kombinasyonu ve tek başına uygulamalarının, benzer şekilde gen ekspresyonlarını artışa yönlendirdiği görülmüştür. Sunitinib etkinliğinde kontrole göre 1,8 kat artış bulunan HIF-1A gen ekspresyon düzeyleri, sunitinib ve 25 μM süksinik asit kombine edilerek uygulandığında 2 kata yakın azalmıştır ($p=0,021$). Ancak özellikle süksinik asitin 50 μM dozunun tek başına ve sunitinib ile kombinasyonu sonrası tekrar anlamlı artışlarla sonuçlandığı elde edilmiştir. TGF- β gen ekspresyon düzeyleri, yalnızca süksinik asitin tek başına 25 μM doz uygulamasında, sunitinibe oranla 2,5 kat azalmış olup ($p=0,043$), 50 μM süksinik dozunun sunitinib ile kombine veya tek

başına uygulamalarında artışla sonuçlandığı tespit edilmiştir. Sunitinib etkinliğinde, kontrole göre artmış bulunan VHL gen ekspresyon düzeyleri, 25 μ M süksinik asit ve sunitinib kombinasyonunda benzer düzeylerde sonuçlanmış olup, 50 μ M süksinik asitin, tek başına ve özellikle sunitinib ile kombinasyonunda, anlamlı azalmalara neden olduğu elde edilmiştir. ANGPT1 için sunitinib ile tedavi sonrası artmış bulunan gen ekspresyon düzeyleri, yalnız 25 μ M süksinik asit etkinliğinde, sunitinibe oranla 3,2 kat azalmıştır ($p=0,021$). Süksinik asitin 50 μ M dozu ve sunitinib kombine edildiğinde, sunitinib ile tedaviye oranla 8 kata kadar arttığı tespit edilmiştir. Tek başına süksinik asitin 50 μ M doz uygulaması sonrasında da, yalnız sunitinib ile tedaviye kıyasla 1,5 kat daha yüksek ANGPT1 gen ekspresyon düzeyleri tespit edilmiştir. TIE2 gen ekspresyon düzeyleri, sunitinib ile tedavi sonrası kontrole göre 5 kat artarken ($p=0,021$), süksinik asitin 25 μ M dozunun sunitinib ile kombinasyonu 1,5 kat, tek başına etkinliğinde ise, sunitinibe oranla 2,8 kat azaldığı elde edilmiştir. Süksinik asitin 50 μ M dozunun sunitinib ile kombinasyonu 3,7 kat, tek başına uygulaması ise, sunitinibe oranla 2,2 kat azalma ile sonuçlanmış ancak anlamlı bulunmamıştır, bu dozların kontrole oranla sırasıyla 19 kat ve 8 kat anlamlı artışlarla sonuçlandığı elde edilmiştir ($p=0,021$). Genel değerlendirme olarak, süksinik asitin 50 μ M dozunun, tek başına ve sunitinib ile kombinasyonu sonrasında, VHL dışındaki genlerde, dirençli gruptaki kontrol, sunitinib ve 25 μ M süksinik asit kombinasyonundaki sunitinib ile tedavi edilen gruplara oranla anlamlı ekspresyon artışlarıyla karşımıza çıktığı elde edilmiştir. Süksinik asitin 25 μ M doz uygulamasında, sunitinib ile kombine edildiğinde dirençli ve sunitinib ile tedavi edilen gruplara oranla; HIF-1A, TIE2 gen ekspresyon seviyelerinde anlamlı azalmalar elde edilmiştir. Tek başına 25 μ M süksinik asit ile tedavide ise yalnız sunitinib tedavisine oranla; VEGF-A, TGF- β , ANGPT1, VHL ve TIE2 gen ekspresyon düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

Tablo 4-4: Sunitinibe duyarlı gruplarda, tedavi gruplarına göre elde edilen gen ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması

Hedef Gen	Tedavi Grupları					
	Kontrol (a)	+ Sunitinib (b)	Sunitinib + 25 µM Süksinik asit (c)	Sunitinib + 50 µM Süksinik asit (d)	25 µM Süksinik asit (e)	50 µM Süksinik asit (f)
VEGF-A	1,56 (1,50-1,63)	1,35 (0,80-1,91)	0,94 ^{a *} (0,65-1,22)	3,61 ^{(a, b, c) *} (3,16-4,06)	0,55 ^{(a, b) *, c #} (0,38-0,77)	1,47 ^{(d, e) *} (0,91-2,02)
VEGF-C	1,38 (1,25-1,51)	0,47 ^{a *} (0,12-0,87)	1,92 ^{b *} (1,17-2,64)	1,31 ^{b *} (0,99-1,61)	0,65 ^{(a, c) *} (0,00-1,13)	1,38 ^{(b, e) *} (0,95-1,81)
PDGF-A	2,68 (2,62-2,74)	0,15 ^{a *} (0,03-0,27)	1,34 ^{(a, b) *} (0,42-2,23)	1,79 ^{b *} (0,42-3,19)	0,52 ^{(a, b) *} (0,41-0,67)	0,15 ^{(a, d, e) *} (0,12-0,21)
HIF-1A	1,43 (0,47-2,41)	0,55 (0,13-1,01)	2,13 (0,49-3,78)	0,11 ^{(a, b, c) *} (0,02-0,22)	1,55 ^{b *} (1,08-2,11)	2,63 ^{(a, e) #, (b, d) *} (1,96-3,57)
TGF-β	0,98 (0,89-1,05)	0,21 ^{a *} (0,06-0,35)	0,90 ^{b *} (0,62-1,20)	4,50 ^{(a, b, c) *} (2,94-6,10)	0,54 ^{(a, b) *, c #} (0,41-0,73)	2,54 ^{(b, e) *, d #} (1,02-4,17)
VHL	2,03 (2,02-2,05)	2,04 (1,46-2,64)	0,87 ^{(a, b) *} (0,63-1,18)	3,73 ^{(a, b, c) *} (3,07-4,39)	0,73 ^{(a, b) *} (0,58-0,95)	1,72 ^{(a, d, e) Λ} (1,49-1,96)
ANGPT1	1,41 (0,57-1,80)	0,92 (0,02-1,81)	1,08 (0,90-1,30)	2,74 ^{(b, c) #} (1,12-4,90)	0,40 ^{a #, c *} (0,02-0,81)	3,20 ^{(a, b, e) *} (2,28-4,13)
TIE2	1,25 (1,00-1,43)	2,13 ^{a *} (1,54-2,74)	0,63 ^{(a, b) *} (0,53-0,76)	3,88 ^{(a, b, c) *} (3,34-4,43)	0,75 ^{a #, b *} (0,37-1,14)	2,10 ^{(a, d, e) *} (1,57-2,62)

Gen satırlarına denk gelen her sayısal değer ait olduğu sütundaki tedavi uygulaması sonrası belirlenen gen ekspresyon kat değişim ortalamasını ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) temsil etmektedir. Ortalama değerlerin altında, parantez içerisindeki veriler, minimum ve maksimum aralıktır. Ortalama değer üzerinde yer alan harf kodları, aynı genin duyarlı grup içinde karşılaştırıldığı diğer tedavi grubu (a,b,c,d,e) ile kıyaslanması sonucuna göre anlamlı farklılık olduğunu belirtmektedir. Yalnızca anlamlı değerler için harf atanmıştır.

Örneğin; 0,63^{a *, b *} = TIE2 geni için, sunitinib+25 µM süksinik asit(c) grubu ile tedavi sonucundaki gen ekspresyon kat değişim ortalaması 0,63 olarak belirtilmekte olup, sırasıyla TIE2 kontrol(a) ve TIE2 sunitinib(b) tedavi gruplarındaki gen ekspresyonlarına kıyaslandığında anlamlı bir farklılık olduğunu ifade eder.

Bu tablodaki harflerin yanındaki simgelerden; * ile p=0,020, # ile p=0,021, Λ ile p=0,043 için anlamlılık düzeyleri temsil edilmiştir.

Deneyler 4'er kez tekrar edilmiştir (n = 4).

kat değişimi^a, bulunduğu sütundaki tedavinin kontrole;

kat değişimi^b, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib uygulanmış gruba;

kat değişimi^c, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib+25 µM süksinik asit uygulanmış gruba;

kat değişimi^d, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib+50 µM süksinik asit uygulanmış gruba;

kat değişimi^e, bulunduğu sütundaki tedavinin, 25 µM süksinik asit uygulanmış gruba göre gen ekspresyon düzeyleri yönüyle kıyaslandığında anlamlı farklılık olduğunu belirtir.

Tablo 4-5: Sunitinibe dirençli gruplarda, tedavi gruplarına göre elde edilen gen ekspresyon değerlerinin duyarlı grup ile karşılaştırılması

Hücre grubu ve İncelenen Gen	Tedavi Grupları					
	Kontrol (a)	+ Sunitinib (b)	Sunitinib + 25 µM Süksinik asit (c)	Sunitinib + 50 µM Süksinik asit (d)	25 µM Süksinik asit (e)	50 µM Süksinik asit (f)
Duyarlı/VEGF-A	1,56	1,35	0,94	3,61	0,55	1,47
Dirençli/VEGF-A	0,27 ^{a *} (0,15-0,40)	0,86 ^{a *} (0,70-1,02)	1,10 (0,40-1,82)	1,29 ^{d *} (1,01-1,58)	0,56 ^{a *} (0,40-0,73)	1,43 (1,26-1,61)
Duyarlı/VEGF-C	1,38	0,47	1,92	1,31	0,65	1,38
Dirençli/VEGF-C	0,74 ^{a *} (0,70-0,78)	1,29 ^{b *} (1,00-1,59)	1,16 (1,00-1,32)	10,5 ^{(a, d) *} (2,11-19,0)	1,26 (0,95-2,07)	1,64 (0,83-2,46)
Duyarlı/PDGF-A	2,68	0,15	1,34	1,79	0,52	0,15
Dirençli/PDGF-A	1,10 ^{a *} (0,84-1,31)	1,07 ^{a *,b *} (0,35-1,80)	1,32 ^{a *} (0,57-2,09)	12,1 ^{(a, d) *} (9,90-14,3)	1,53 ^{(a, e) *} (1,07-2,00)	3,28 ^{(a, f) *} (3,05-3,46)
Duyarlı/HIF-1A	1,43	0,55	2,13	0,11	1,55	2,63
Dirençli/HIF-1A	1,07 (0,80-1,28)	1,96 ^{b *} (1,53-2,41)	1,03 (0,74-1,32)	11,3 ^{(a, d) *} (10,65-13,8)	1,68 (0,49-2,88)	2,10 (0,59-3,61)
Duyarlı/TGF-β	0,98	0,21	0,90	4,50	0,54	2,54
Dirençli/TGF-β	0,30 ^{a *} (0,25-0,38)	1,55 ^{(a, b) *} (1,23-1,88)	0,90 (0,26-1,56)	5,36 ^{a *} (4,14-6,58)	0,60 ^{a *} (0,50-0,70)	1,44 ^{a *} (1,40-1,50)
Duyarlı/VHL	2,03	2,04	0,87	3,73	0,73	1,72
Dirençli/VHL	0,29 ^{a *} (0,240,34)	1,11 ^{(a, b) *} (1,04-1,20)	1,02 ^{a *} (0,81-1,24)	0,40 ^{(a, d) *} (0,32-0,49)	0,60 ^{a *} (0,41-0,80)	0,93 ^{(a, f) *} (0,57-1,29)
Duyarlı/ANGPT1	1,41	0,92	1,08	2,74	0,40	3,20
Dirençli/ANGPT1	1,36 (0,26-2,48)	2,73 ^{a *,b #} (1,79-3,73)	1,52 (0,52-2,52)	21,8 ^{(a, d) *} (18,33-25,4)	0,83 ^{e #} (0,78-0,90)	3,93 (1,11-6,76)
Duyarlı/TIE2	1,25	2,13	0,63	3,88	0,75	2,10
Dirençli/TIE2	0,20 ^{a *} (0,03-0,16)	1,03 ^{b *} (0,92-1,14)	0,71 ^{a *} (0,48-0,95)	3,81 (3,40-3,95)	0,36 ^{a *} (0,27-0,45)	1,62 (0,80-2,45)

Gen satırlarına denk gelen her sayısal değer ait olduğu sütundaki tedavi uygulaması sonrası belirlenen gen ekspresyon kat değişim ortalamasını ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) temsil etmektedir. Ortalama değerlerin altında, parantez içerisindeki veriler, minimum ve maksimum aralıktır. Dirençli gen satırlarında, ortalama değer üzerinde yer alan harf kodları, aynı genin duyarlı grup içinde karşılaştırıldığı tedavi grubu (a,b,c,d,e,f) ile kıyaslanması sonucuna göre anlamlı farklılık olduğunu belirtmektedir. Yalnızca anlamlı değerler için harf atanmıştır. Bu tablodaki harflerin yanındaki simgelerden; * ile p=0,021, # ile p=0,043 anlamlılık düzeyleri temsil edilmiştir. Deneyler 4'er kez tekrar edilmiştir (n = 4).

kat değişimi^a, bulunduğu sütundaki tedavinin kontrole;

kat değişimi^b, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib uygulanmış gruba;

kat değişimi^c, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib+25 µM süksinik asit uygulanmış gruba;

kat değişimi^d, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib+50 µM süksinik asit uygulanmış gruba;

kat değişimi^e, bulunduğu sütundaki tedavinin, 25 µM süksinik asit uygulanmış gruba;

kat değişimi^f, bulunduğu tedavi ve gen grubunun, duyarlı 50 µM süksinik asite göre gen ekspresyon düzeyleri yönüyle kıyaslandığında anlamlı farklılık olduğunu belirtir.

Tablo 4-6: Sunitinibe dirençli gruplarda, tedavi gruplarına göre elde edilen gen ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması

Hedef Gen	Tedavi Grupları					
	Kontrol (a)	+ Sunitinib (b)	Sunitinib + 25 µM Süksinik asit (c)	Sunitinib + 50 µM Süksinik asit (d)	25 µM Süksinik asit (e)	50 µM Süksinik asit (f)
VEGF-A	0,27 (0,15-0,40)	0,86 ^{a *} (0,70-1,02)	1,10 ^{a *} (0,40-1,82)	1,29 ^{a *, b *} (1,01-1,58)	0,56 ^{(a, b, d) *} (0,40-0,73)	1,43 ^{(a, b, e) *} (1,26-1,61)
VEGF-C	0,74 (0,70-0,78)	1,29 ^{a *} (1,00-1,59)	1,16 ^{a *} (1,00-1,32)	10,5 ^{(a, b, c) *} (2,11-19,0)	1,26 ^{(a, d) *} (0,95-2,07)	1,64 ^{(a, d) *} (0,83-2,46)
PDGF-A	1,10 (0,84-1,31)	1,07 (0,35-1,80)	1,32 (0,57-2,09)	12,1 ^{(a, b, c) *} (9,90-14,3)	1,53 ^{d *} (1,07-2,00)	3,28 ^{(a, b, c, d, e) *} (3,05-3,46)
HIF-1A	1,07 (0,80-1,28)	1,96 ^{a *} (1,53-2,41)	1,03 ^{b *} (0,74-1,32)	11,3 ^{(a, b, c) *} (10,6-13,8)	1,68 ^{d *} (0,49-2,88)	2,10 ^{d *} (0,59-3,61)
TGF-β	0,30 (0,25-0,38)	1,55 ^{a *} (1,23-1,88)	0,90 (0,26-1,56)	5,36 ^{(a, b, c) *} (4,14-6,58)	0,60 ^{(a, b) *} (0,50-0,70)	1,44 ^{(a, d, e) *} (1,40-1,50)
VHL	0,29 (0,240,34)	1,11 ^{a *} (1,04-1,20)	1,02 ^{a *} (0,81-1,24)	0,40 ^{(a, b, c) *} (0,32-0,49)	0,60 ^{(a, b, c, d) *} (0,41-0,80)	0,93 ^{(a, d) *} (0,57-1,29)
ANGPT1	1,36 (0,26-2,48)	2,73 (1,79-3,73)	1,52 (0,52-2,52)	21,8 ^{(a, b, c) *} (18,3-25,4)	0,83 ^{(b, d) *} (0,78-0,90)	3,93 ^{(d, e) *} (1,11-6,76)
TIE2	0,20 (0,03-0,16)	1,03 ^{a *} (0,92-1,14)	0,71 ^{(a, b) *} (0,48-0,95)	3,81 ^{a *} (3,40-3,95)	0,36 ^{(a, b, c, d) *} (0,27-0,45)	1,62 ^{(a, e) *} (0,80-2,45)

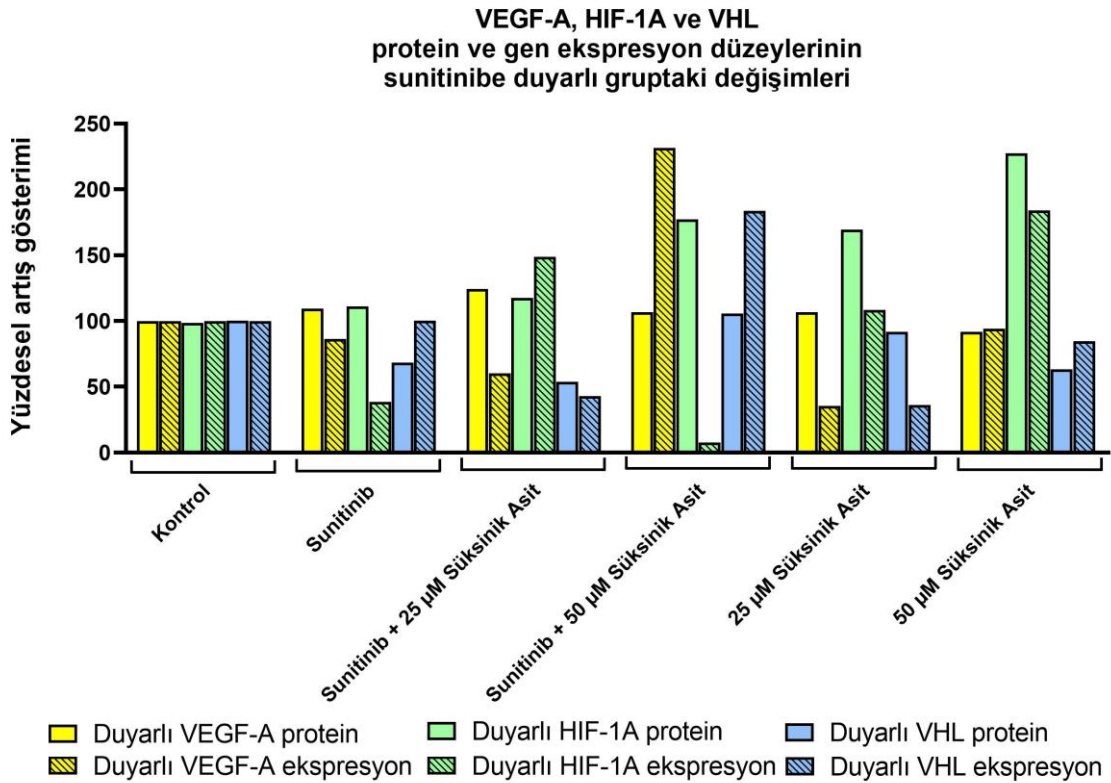
Gen satırlarına denk gelen her sayısal değer ait olduğu sütundaki tedavi uygulaması sonrası belirlenen gen ekspresyon kat değişim ortalamasını ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) temsil etmektedir. Ortalama değerlerin altında, parantez içerisindeki veriler, minimum ve maksimum aralıktır. Dirençli gen satırlarında, ortalama değer üzerinde yer alan harf kodları, aynı genin duyarlı grup içinde karşılaştırıldığı tedavi grubu (a,b,c,d,e,f) ile kıyaslanması sonucuna göre anlamlı farklılık olduğunu belirtmektedir. Yalnızca anlamlı değerler için harf atanmıştır. Bu tablodaki harflerin yanındaki simgelerden; * ile p=0,021, # ile p=0,043 için anlamlılık düzeyleri temsil edilmiştir. Deneyler 4'er kez tekrar edilmiştir (n = 4).

kat değişimi^a, bulunduğu sütundaki tedavinin kontrole;
kat değişimi^b, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib uygulanmış gruba;
kat değişimi^c, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib+25 µM süksinik asit uygulanmış gruba;
kat değişimi^d, bulunduğu sütundaki tedavinin, sunitinib+50 µM süksinik asit uygulanmış gruba;
kat değişimi^e, bulunduğu sütundaki tedavinin, 25 µM süksinik asit uygulanmış gruba göre gen ekspresyon düzeyleri yönüyle kıyaslandığında anlamlı farklılık olduğunu belirtir.

4.3. Birlikte değerlendirilen hedefler

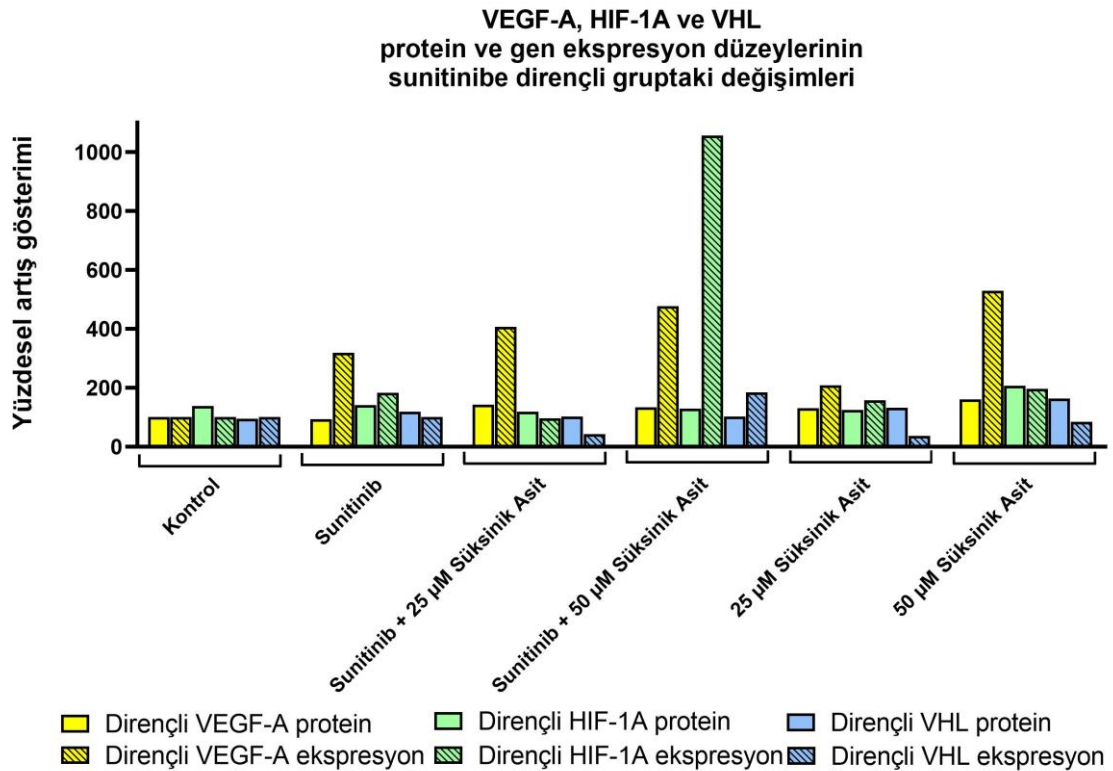
4.3.1. VEGF-A, HIF-1A ve VHL protein ve gen ekspresyonları

Duyarlı gruplarda sunitinibin 25 μ M süksinik asit ile kombinasyonunda, gen ekspresyon düzeylerinin VEGF-A ve VHL için azalmalarla yansıdığı ancak HIF-1A için, artışa yönlendiği görülmüştür. Protein düzeyleri ise bu dozlardaki kombine terapi sonrası, VEGF-A ve HIF-1A için artış; VHL için azalma yönünde olmuştur. Sunitinib ile 50 μ M süksinik asit kombine edildiğinde ise VEGF-A ve VHL seviyeleri artarken, HIF-1A düzeyleri azalmıştır. Protein düzeyleri bu tedavi grubu için, HIF-1A için artış yönünde olurken, VHL ve VEGF-A için tekrar kontrol grubuna yaklaşmıştır. Tek başına süksinik asitin 25 μ M uygulamasında, VEGF-A ve VHL gen ekspresyon düzeyleri azalırken, protein düzeyleri VHL için azalmıştır. Gen ekspresyonları, HIF-1A için 50 μ M süksinik asit sonrasında artarken; VEGF-A ve VHL düzeyleri kontrole yakın seviyelerde seyretmiştir. Protein düzeyleri ise VHL için düşüş, HIF-1A için artış yönünde sonuçlanmıştır (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: VEGF-A, HIF-1A, VHL protein ve genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin sunitinibe duyarlı gruplarda birlikte gösterilmesi

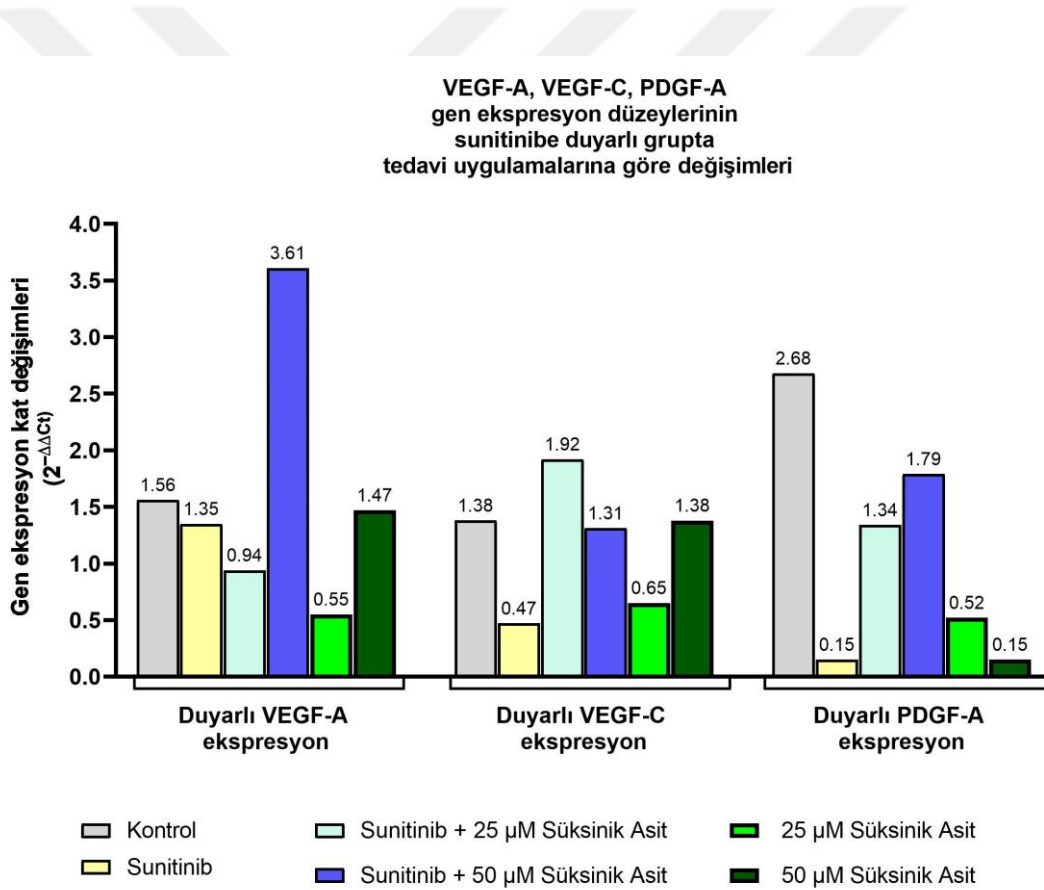
Sunitinibe dirençli gruplarda tedaviye göre kıyaslandığında, sunitinibin 25 μ M süksinik asit ile kombinasyonunda, gen ekspresyon düzeylerinin HIF-1A için anlamlı azalma ile sonuçlandığı; protein düzeylerinin VEGF-A için artış; VHL ve HIF-1A için azalma yönünde olduğu elde edilmiştir. Sunitinib ile 50 μ M süksinik asit kombinasyonu yalnız sunitinibe göre, VEGF-A ve HIF-1A gen ekspresyonlarını artırırken, VHL düzeylerini düşürmüştür. Protein düzeyleri, HIF-1A için artış yönünde olurken, VHL ve VEGF-A için tekrar kontrol grubuna yaklaşmıştır. Tek başına süksinik asitin 25 μ M uygulamasında, VEGF-A ve VHL gen ekspresyon düzeyleri anlamlı şekilde azalırken, protein düzeyleri de VHL için azalmış ancak VEGF-A için artış yönünde sonuçlanmıştır. Gen ekspresyonları, VEGF-A ve HIF-1A için tek başına 50 μ M süksinik asit sonrasında artarken; VHL düzeyleri yalnız sunitinibe yakın seviyelerde seyretmiştir. Protein düzeyleri VEGF-A, HIF-1A ve VHL için hem kontrol hem yalnız sunitinib tedavileri ile kıyaslandığında artış göstermiştir (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: VEGF-A, HIF-1A, VHL protein ve genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin sunitinibe dirençli gruplarda birlikte gösterilmesi

4.3.2. VEGF-A, VEGF-C ve PDGF-A gen ekspresyonları

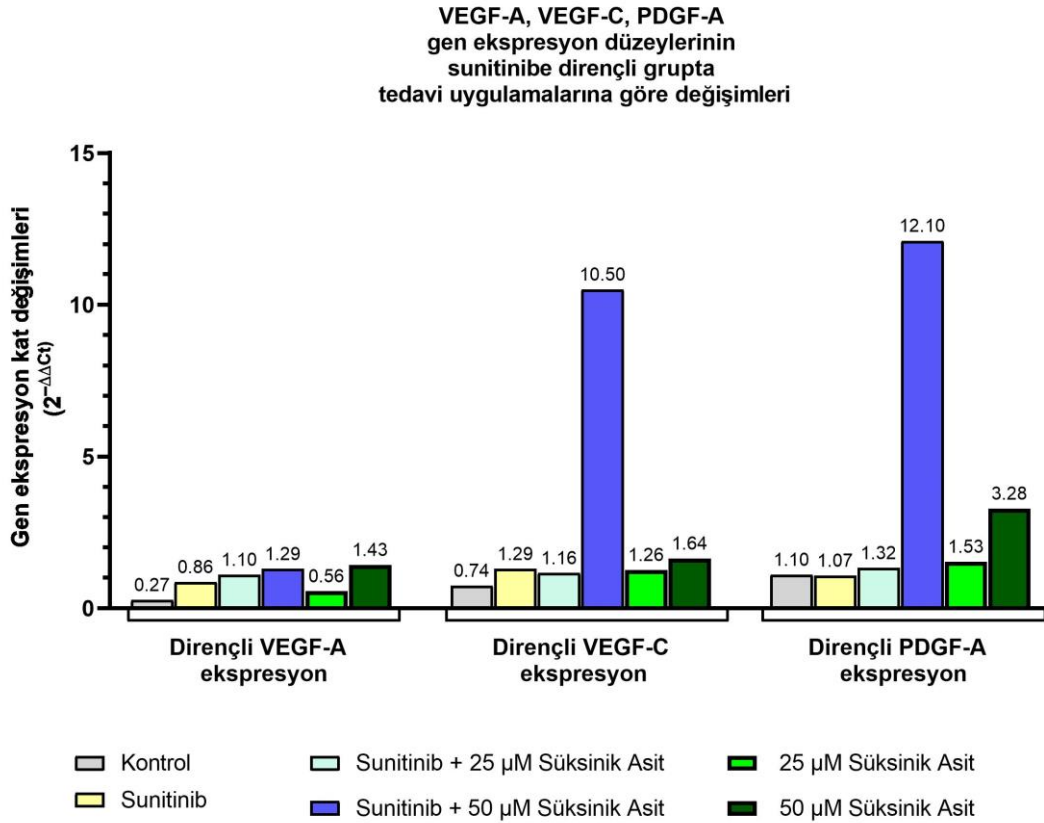
Sunitinibe duyarlı gruplarda, sunitinibin tek başına etkinliği sonrasında VEGF-C ve PDGF-A gen düzeyleri azalmıştır. Süksinik asitin 25 µM dozu ile sunitinib kombinasyonu, VEGF-A düzeylerini baskımlarken, VEGF-C ve PDGF-A için sunitinib sonuçlarına göre artış görülmüştür. Süksinik asitin 50 µM dozu ile kombine edildiğinde, özellikle VEGF-A düzeyleri artmıştır. Tek başına 25 µM süksinik asit, tüm genlerin seviyelerini kontrol grubuna oranla azaltırken, VEGF-A ve VEGF-C için, aynı zamanda yalnız sunitinib ile tedaviden elde edilen düzeylerin de altına indirmiştir. Süksinik asitin tek başına 50 µM uygulaması ile yalnızca PDGF-A ekspresyonlarında azalma tespit edilmiştir (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: VEGF-A, VEGF-C ve PDGF-A genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin, sunitinibe duyarlı hücre gruplarında birlikte gösterilmesi

Sunitinibe dirençli gruplardaki tedavide sunitinibin tek başına etkinliği, VEGF-A ve VEGF-C gen ekspresyon düzeylerini kontrole göre artırmıştır. Süksinik asitin 25 µM doz birlikteliğinde, anlamlı değişimler olmasa da kontrole göre düşüş sağlanmadığı

tespit edilmiştir. Sunitinib ve 50 μ M süksinik asit dozu birlikte uygulandığında ise, VEGF-C ve PDGF-A seviyelerinde ciddi artışa neden olmuştur. Süksinik asitin tek başına 25 μ M dozu, özellikle VEGF-A düzeylerini düşürmede etkin bulunmuşken; 50 μ M süksinik asit dozunun, tüm genlerde ve özellikle PDGF-A düzeylerinde artışa neden olduğu bulunmuştur (Şekil 4-9).

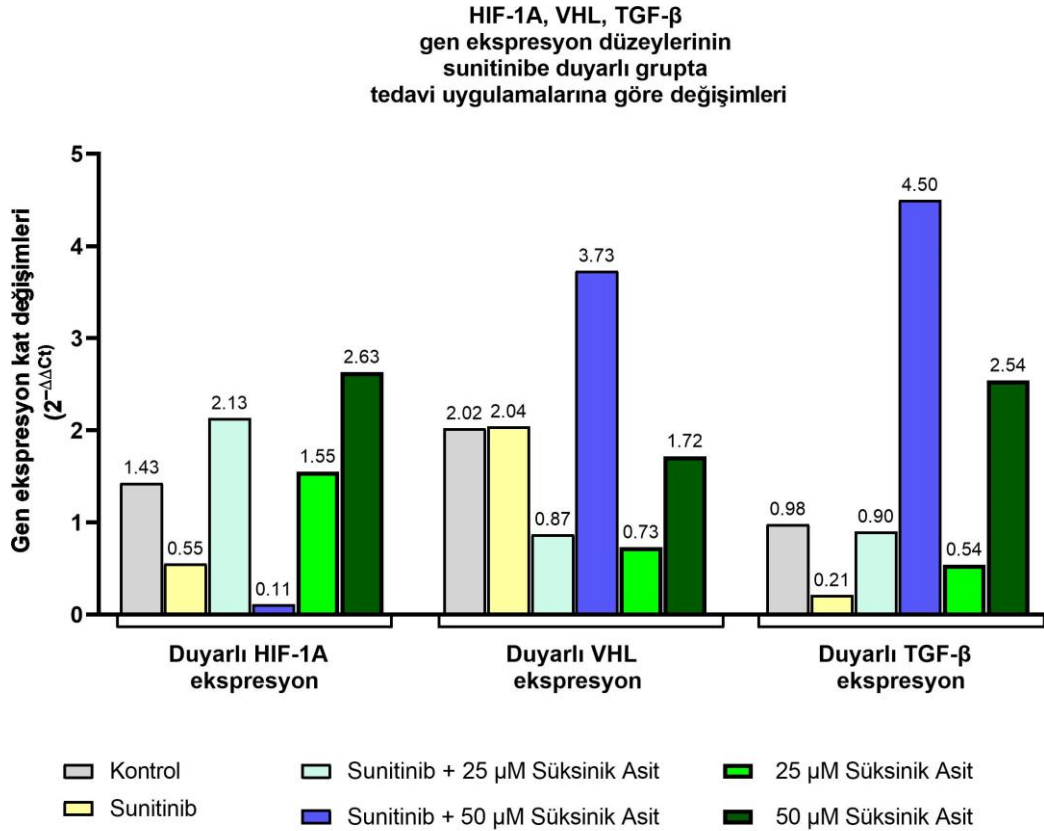


Şekil 4-9: VEGF-A, VEGF-C, PDGF-A genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin, sunitinibe dirençli hücre gruplarında birlikte gösterilmesi

4.3.3. HIF-1A, VHL ve TGF- β gen ekspresyonları

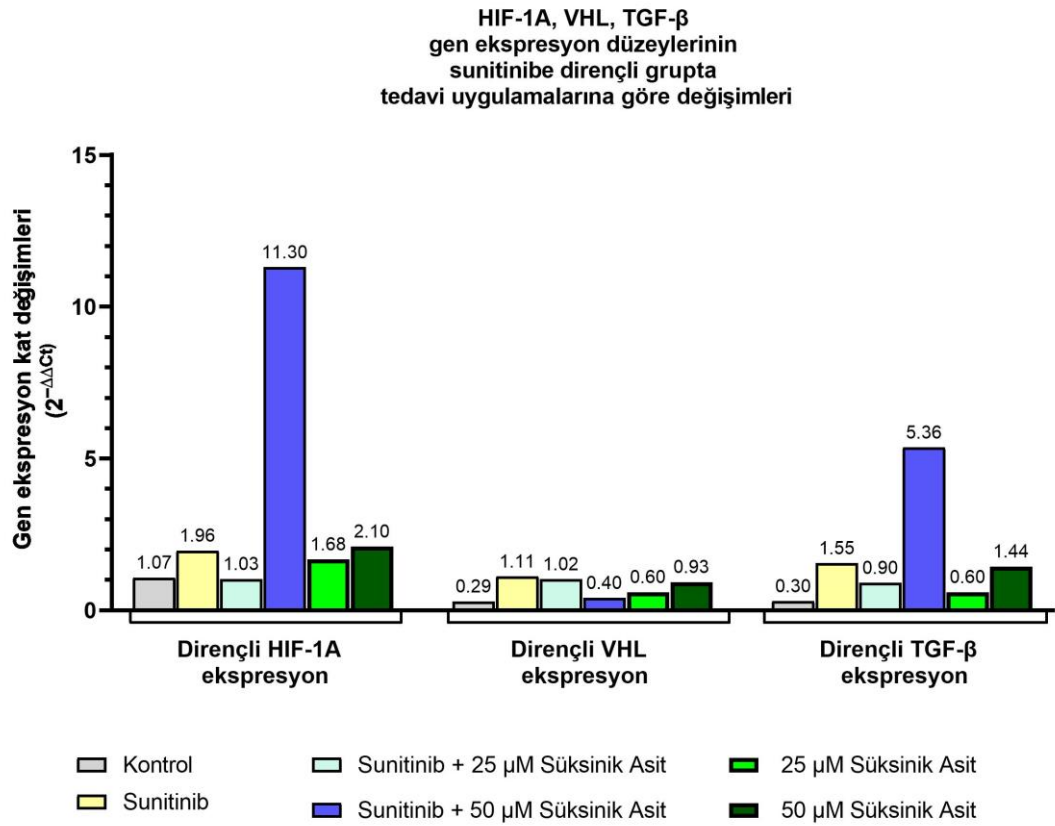
Sunitinibin tek başına etkinliği sonrasında, sunitinibe duyarlı gruplarda TGF- β ve HIF-1A gen ekspresyon düzeyleri azalmışken, süksinik asitin 25 μ M dozu ile sunitinib kombinasyon etkinliği, sunitinibe kıyaslandığında TGF- β ve HIF-1A düzeylerini artırırken, VHL için tek başına sunitinibe göre artışa neden olmuştur. Sunitinib ve süksinik asitin 50 μ M dozu kombine edildiğinde ise, VHL ve TGF- β düzeyleri artmıştır. Tek başına 25 μ M süksinik asit, kontrol grubuna kıyaslandığında VHL ve TGF- β için

düşüşe neden olmuştur. Süksinik asitin tek başına 50 μ M uygulaması ise TGF- β seviyelerinin yükselmesine neden olmuştur (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: HIF-1A, VHL ve TGF- β genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin, sunitinibe duyarlı hücre gruplarında birlikte gösterilmesi

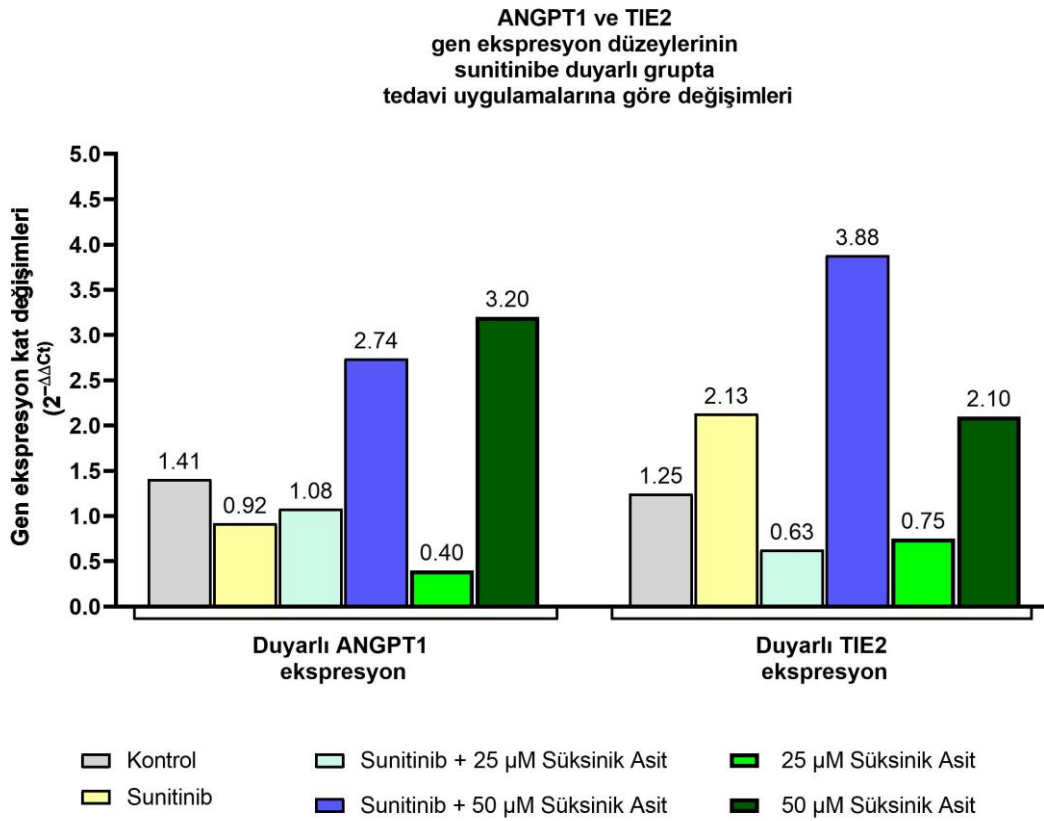
Sunitinibin tek başına tedavi etkinliği sonrasında sunitinibe dirençli gruplarda HIF-1A, VHL ve TGF- β gen ekspresyon düzeyleri kontrole göre artmıştır. Sunitinib ve süksinik asitin 25 μ M doz birlikteliğinde, HIF-1A ve TGF- β düzeylerinde düşüş tespit edilirken; VHL düzeylerinde fark görülmemiştir. Sunitinib bu defa 50 μ M süksinik asit ile birlikte uygulandığında ise, HIF-1A ve TGF- β düzeylerinde önemli artışlara neden olurken; VHL düzeylerini ise tekrar düşüşe yönlendirdiği görülmüştür. Süksinik asitin tek başına 25 μ M doz etkinliği daha kontrollü düzeylerle sonuçlanırken; tek başına 50 μ M süksinik asit dozunun, HIF-1A ve TGF- β düzeylerinde artışa neden olduğu, VHL için ise tam tersi etki göstermeye devam ettiği görülmüştür (Şekil 4-11).



Şekil 4-11: HIF-1A, VHL ve TGF- β genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin, sunitinibe dirençli hücre gruplarında birlikte gösterilmesi

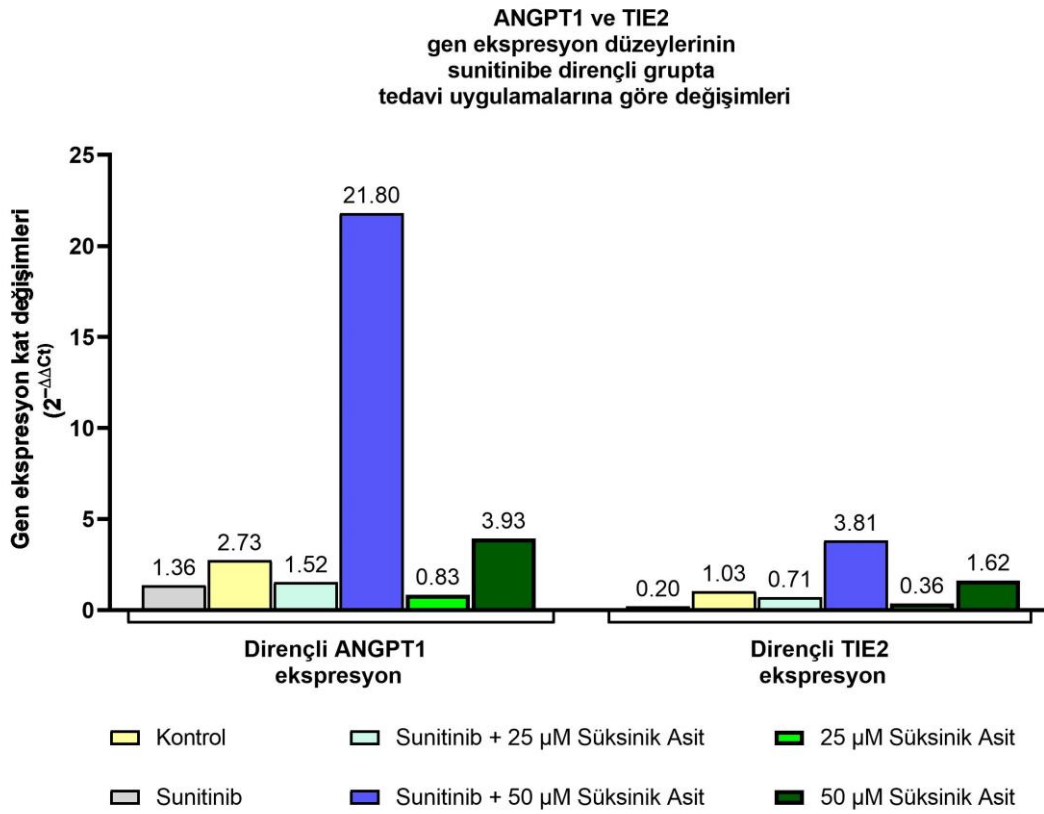
4.3.4. ANGPT1 ve TIE2 gen ekspresyonları

ANGPT1 ve TIE2 gen ekspresyon düzeylerinin, sunitinibin tek başına etkinliği sonrasında, kontrole oranla arttığı, süksinik asitin 25 μ M dozu ile sunitinib kombinasyon etkinliğinden sonra TIE2 için azaldığı görülmüştür. Sunitinib ile süksinik asitin 50 μ M dozu kombine edildiğinde, her iki gen ekspresyonu da artışa geçmiştir. Benzer şekilde bu etki, süksinik asitin tek başına 50 μ M uygulaması ile de her iki gen için artış yönünde sonuçlanmıştır. Tek başına uygulanan süksinik asitin 25 μ M dozunda ise, ANGPT1 ve TIE2 gen ekspresyon düzeylerinin, kontrol ve yalnız sunitinib ile tedavi edilen gruplardaki ekspresyon seviyelerinin altında kaldığı görülmüştür (Şekil 4-12).



Şekil 4-12: ANGPT1 ve TIE2 genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin, sunitinibe duyarlı hücre gruplarında birlikte gösterilmesi

Sunitinibe dirençli gruplarda, sırasıyla sunitinib ve süksinik asitin tedavideki etkinlikleri ANGPT1 ve TIE2 seviyeleri üzerinden incelendiğinde, her iki gen ekspresyonunun da sunitinib ile tedavi sonrasında kontrol gruplarına göre arttığı tespit edilmiştir. Sunitinib ve süksinik asitin 25 μ M dozu kombine edilerek uygulandığında, sunitinib ile tedaviye oranla her iki gen düzeyinde de azalma ile sonuçlanmıştır. Bu durum, sunitinib 50 μ M süksinik asit ile kombine edildiğinde tersine dönerek; ANGPT1 ve TIE2 düzeylerinde önemli artışlarla sonuçlanmıştır. Kombinasyon tedavisindeki etkilere benzer şekilde süksinik asitin tek başına 25 μ M dozu gen düzeylerinde azalma ile sonuçlanırken; 50 μ M süksinik asit dozunun, ANGPT1 ve TIE2 ekspresyonlarında artış ile sonuçlandığı değerlendirilmiştir (Şekil 4-13).



Şekil 4-13: ANGPT1 ve TIE2 genlerindeki tedaviye bağlı ekspresyon değişimlerinin, sunitinibe dirençli hücre gruplarında birlikte gösterilmesi

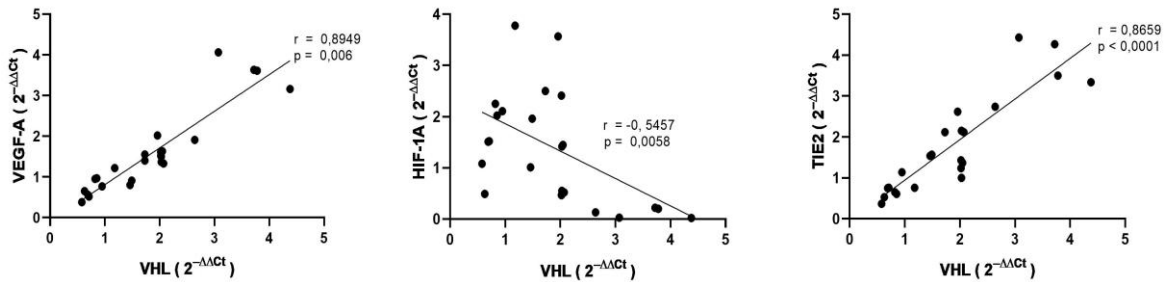
4.3.5. Korelasyonların Değerlendirilmesi

Tedavi uygulamalarının, gen ekspresyonları ve çalışmamızda değerlendirdiğimiz proteinlere verdiği yönlerin daha detaylı değerlendirilebilmesi adına, sunitinibe duyarlı ve sunitinibe direnç kazandırılmış hücre grupları üzerindeki değişimler ayrı ayrı incelenmiştir. Her grup için incelenen tüm gen ve proteinlerin korelasyonları, duyarlı gruptaki karşılaştırmalar için, Tablo 4-7 ve dirençli gruptaki karşılaştırmalar için Tablo 4-8 içerisinde gösterilmiştir. Ayrıca yalnızca sunitinibe duyarlı grupta gözlenen anlamlı korelasyonlara Şekil 4-14, hem sunitinib hem duyarlı gruptaki ortak anlamlı korelasyonlara Şekil 4-15, ve yalnızca sunitinibe dirençli gruptaki anlamlı korelasyonlara Şekil 4-16 içerisinde görsel olarak yer verilmiştir.

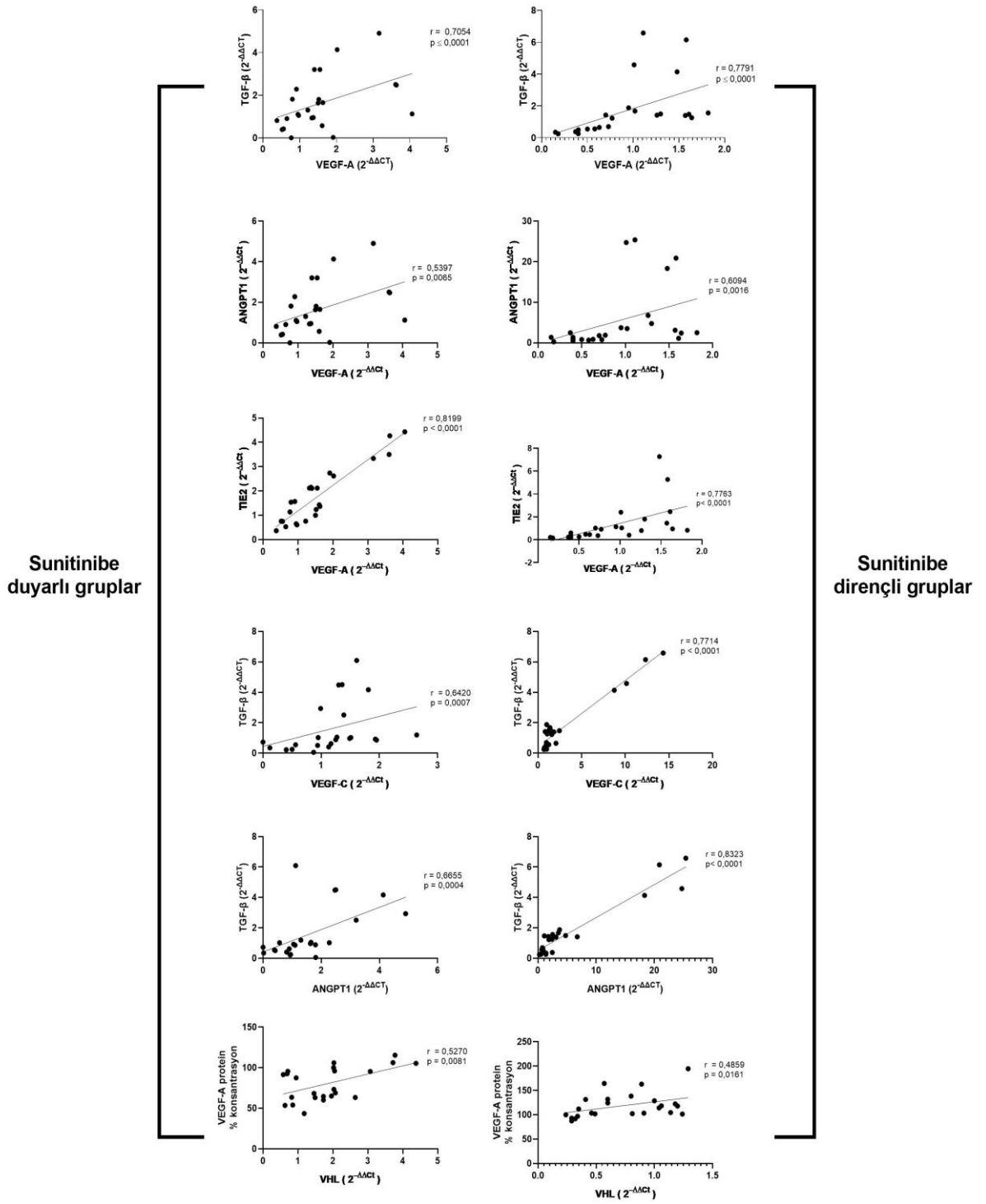
Tablo 4-8: Sunitinibe dirençli hücrelerde incelenen gen ve proteinlerin ilişkilerinin Spearman korelasyon testi sonuçlarına göre gösterilmesi

Spearman korelasyon	VEGF-A geni	VEGF-C geni	PDGF-A geni	HIF-1A geni	TGF- β geni	VHL geni	ANGPT1 geni	TIE2 geni	HIF-1A proteini	VHL proteini	VEGF-A proteini
VEGF-A geni	1,000	0,664 ***	0,640 **	0,395	0,779 ***	0,540 **	0,609 **	0,776 ***	0,156	0,598 **	0,318
VEGF-C geni	0,664 ***	1,000	0,573 **	0,758 ***	0,771 ***	0,308	0,548 **	0,739 ***	-0,137	0,332	0,214
PDGF-A geni	0,640 **	0,573 **	1,000	0,457 *	0,695 ***	-0,077	0,709 ***	0,586 **	0,174	0,575 **	0,157
HIF-1A geni	0,395	0,758 ***	0,457 *	1,000	0,601 **	0,080	0,449 *	0,530 **	-0,163	0,025	0,070
TGF- β geni	0,779 ***	0,771 ***	0,695 ***	0,601 **	1,000	0,323	0,832 ***	0,781 ***	-0,007	0,222	0,187
VHL geni	0,540 **	0,308	-0,077	0,080	0,323	1,000	0,024	0,490 *	-0,050	0,222	0,486 *
ANGPT1 geni	0,609 **	0,548 **	0,709 ***	0,449 *	0,832 ***	0,024	1,000	0,601 **	0,147	0,126	-0,039
TIE2 geni	0,776 ***	0,739 ***	0,586 **	0,530 **	0,781 ***	0,490 *	0,601 **	1,000	0,135	0,352	0,284
HIF-1A proteini	0,156	-0,137	0,174	-0,163	-0,007	-0,050	0,147	0,135	1,000	0,185	0,205
VHL proteini	0,598 **	0,332	0,575 **	0,025	0,222	0,222	0,126	0,352	0,185	1,000	0,287
VEGF-A proteini	0,318	0,214	0,157	0,070	0,187	0,486 *	-0,039	0,284	0,205	0,287	1,000

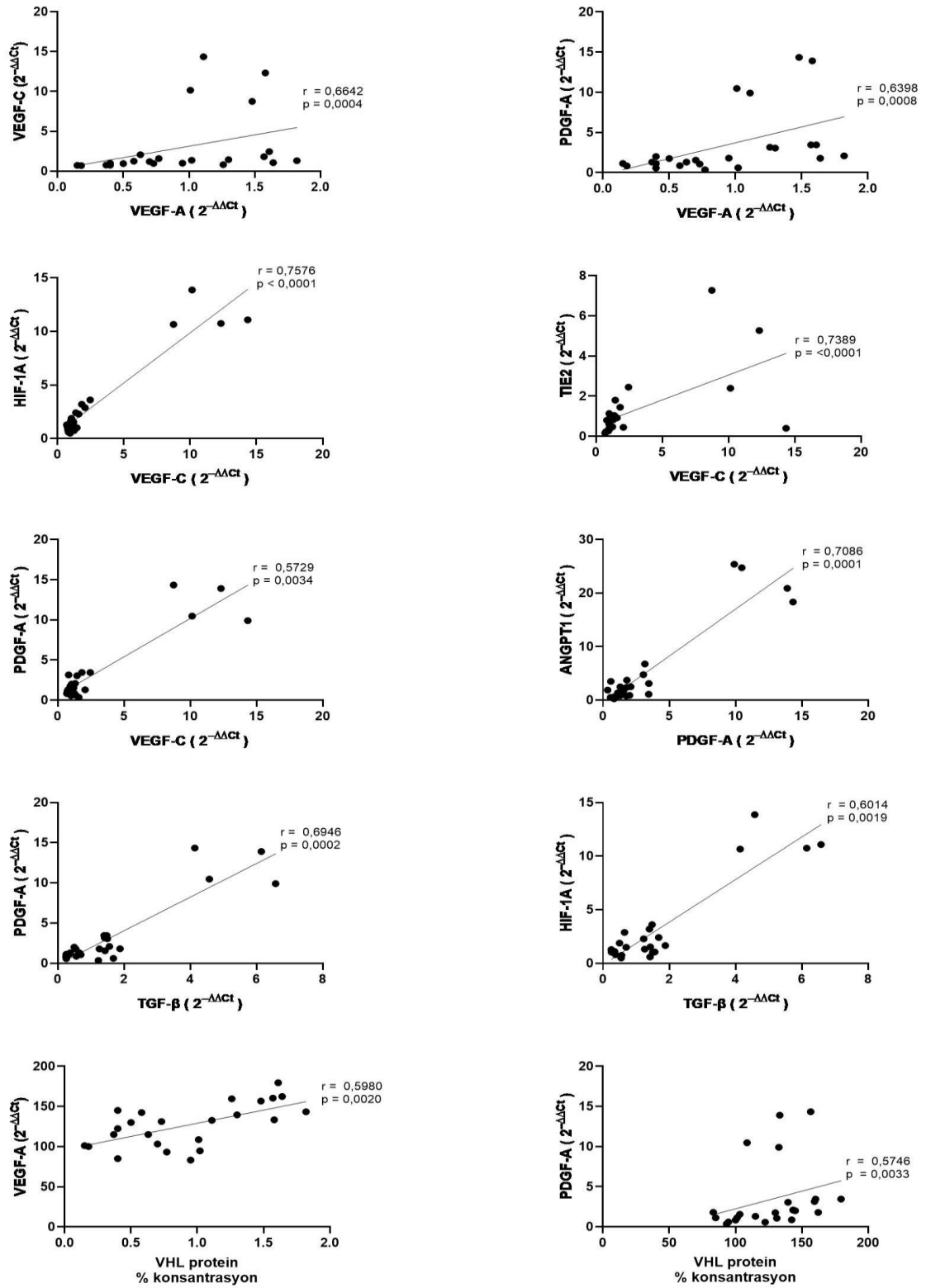
Sayısal değerler, Spearman testi sonuçlarından elde edilen korelasyon katsayısı (r) değerleridir.
 Koyulaşan renkler r değerinin artışı temsil eder.
 İstatistiksel anlamlılık düzeyleri için;
 $p < 0,05$ için *; $p < 0,001$ için **; $p < 0,0001$ için *** simgeleri tanımlanmıştır.



Şekil 4-14: Sunitinibe duyarlı gruplara spesifik olarak anlamlı korele bulunan gen ilişkilerinin gösterilmesi



Şekil 4-15: Sunitinibe duyarlı ve sunitinibe dirençli grupların her ikisinde de ortak olarak anlamlı korele bulunan gen ilişkilerinin gösterilmesi



Şekil 4-16: Sunitinibe dirençli gruplara spesifik, anlamlı korele bulunan gen ilişkilerinin gösterilmesi

5. TARTIŞMA

Kanserde tedavi başarısını oldukça etkisizleştiren unsurların başında ilaç direnci gelmektedir (156). Birçok farklı kanser türünde, zamanla ilaca karşı gelişen direnç yanıtı, tedavi etkinliğini ortadan kaldırarak, hasta sağkalımını tehdit etmektedir (116). Renal hücreli karsinom tedavilerinde oldukça sık kullanılan tirozin kinaz inhibitörlerinden sunitinib (131), bazı hastalarda özellikle tedavilerin erken döneminde zamanla gelişen direnç nedeniyle beklenen başarıyı gösterememekte, özellikle agresif metastatik olgular üzerinde gelişen dirence karşı tedavi uygulamasının yeniden düzenlenmesini, hatta sunitinibe ek olarak güvenilir bir ikincil ajan kullanımı ile yapılacak ilaç kombinasyon çalışmalarının gerekliliğini beraberinde getirmektedir (138). Literatürde, sunitinibe karşı gelişen dirençle birlikte, tümörün proliferasyon, anjiyogenez gibi yeteneklerinin güç kazandığı, apoptoz gibi kontrollü hücre ölüm mekanizmalarının engellenerek, invazyon ve metastaz yeteneklerinin beraberinde artışının gösterildiği çalışmalar sıklıkla mevcut olup, özellikle son dönemde, sunitinibe karşı oluşan bu direncin, kanser hücrelerinde sunitinib direnci üzerinde etkin, ve sağlıklı dokular üzerinde de en az toksisiteye neden olması istenen ikincil tedavi ajanları ile birlikte uygulanarak ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmalar da giderek önem kazanmaktadır. Yüksek doz sunitinib ile tedavinin, akciğer ve karaciğer kanseri için, tümör büyümesini ve metastaz yeteneklerini çok kısa dönemde tetikleyerek sağkalımı azalttığı bildirilmiştir (157). Sunitinibe dirençli böbrek kanseri hücre hatlarında proliferasyonun, tekrar sunitinib uygulamasından sonra ilaç direncine bağlı olarak yükseldiği ve sulforaphane kombinasyonu sonrasında baskılanabildiği gösterilmiştir (158). Bir başka çalışmada RHK hücrelerinde ginsenoside ve sunitinib kombinasyonunun, DNA hasarına ve hücre döngüsüne neden olarak büyümeyi engellediği gösterilmiştir (159). Sisplatin ve sunitinibin kombinasyon halinde düşük konsantrasyonlarda kullanılması, karaciğer hücre hatlarında başarılı olmuştur. HepG2 hücreleri üzerinde 4 µg/ml sisplatin ve 2,8 µg/ml sunitinib konsantrasyonları ile kombinasyonlarının Bcl-2 ifadesinin baskılanması ve Bax için bu ifadenin artışıyla sonuçlanarak nekroptozun engellenmesi ve apoptozun desteklenmesi ile sonuçlandığı gösterilmiştir (160). Bu yönüyle düşünüldüğünde, çalışmamızda, daha önce endometrium, lösemi ve böbrek hücrelerinde etkinliğini bildiğimiz ve sağlıklı

hücrelerde önemli bir toksik etkisi olmayan süksinik asitin, sunitinib direnci oluşturulan RHK hücrelerinde, anjiyogenez belirteçleri olarak seçilen gen ekspresyonlarındaki olası değişimler üzerinden sunitinib ve süksinik asit kombinasyonunun tedavi sonrasında sunitinib direncini değiştirmedeki başarısının incelenmesi hedeflenmiştir. Direnç gelişiminin gerçekleştirileceği doz olarak 10 µM sunitinib belirlendikten sonra, ACHN hücreleri, yöntemler kısmında belirtilen aralıklarla, artan sunitinib dozlarına maruz bırakılmıştır. Bu süreç sonunda, sunitinibe karşı direnç gelişimi sağlanmasını takiben, süksinik asitin, sunitinib dirençli hücrelerdeki tedavi etkinliği, özellikle anjiyogenez noktasında etkin role sahip olduğu bilinen VEGF-A, VEGF-C, PDGF-A, HIF-1A, TGF-β, VHL, ANGPT1, TIE2 gen ekspresyonlarının real-time PCR yöntem ile; PDGF-A, HIF-1A ve VHL protein düzeylerinin ise ELISA yöntemi ile analizi gerçekleştirilmiştir.

VEGF-A'nın, dirençli hücrelerde süksinik asitin tek başına ve sunitinib kombinasyonları ile uygulanan tedaviler sonrasında gen ekspresyon ve protein düzeyleri bakımından istenen bir düşüş yanıtı ile beraber seyretmediği görülmüştür. Hipoksi, büyüme faktörleri, IL-1, EGF'ler, PDGF'ler ve tümör nekroz faktörü α gibi sitokinler tarafından kolaylıkla uyarılabilmekte olan VEGF-A ekspresyonları, fizyolojik ve patolojik süreçlerin işleyişinde anjiyogenez için oldukça önemli bir yapıtaşdır (157). Tirozin kinaz inhibitörleri, klasik anjiyogenez yoluna öncülük eden ana merkezlerden biri olan VEGF inhibisyonunu amaçlamaktadır. Son dönemde yapılan araştırmalarda, ilaca karşı gelişen direnci ortadan kaldıracak adına geliştirilen immün kontrol noktası inhibitörleri RHK tedavisinde devrim yaratmış olsa da ihmal edilemeyecek sayıda hasta doğuştan dirençli veya birkaç ay içinde ICI tedavisine direnç geliştirme potansiyeline sahip olabildiğinden kendilerine alternatif anjiyogenez yolu oluşumları sağlayabilmektedir (133). Tümör hücreleri, EGFR, PIGF, FGF2, eritropoietin, TGF-α, IL-6, IL-8 gibi birçok VEGF ve PDGF bağımsız anjiyogenez öncüsü faktörün artmış sinyalizasyonu sayesinde, direnç gelişimi sağlayarak, tedavi başarısızlığını tetiklerken, en önemlisi de HIF yolunun aktivasyonunu ele geçirmiş olur (161). Yapılan bir çalışma, hipoksik ve yüksek metastaz özelliği yansıtan tümörlerden izole edilen tümör ilişkili endotelial hücrelerin proliferasyon ve invazyon yeteneklerinin daha yüksek olduğunu ve bunu yaparken pro-anjiyojenik (VEGF, VEGFR1/2, HIF-1A) mRNA ekspresyonunu tümör endotelial hücrelerden türetilen düşük metastatik tümörlere göre daha fazla arttırdığını göstermiştir (162). Sunitinibe duyarlı ve dirençli gruplarda kendi kontrol gruplarına göre sunitinib ile tedavisi sonrasında, kıyaslandıklarında; sunitinib dirençli

gruplarda sunitinib tedavisi sonrasında, sunitinibe duyarlı gruplarda VHL gen ekspresyon düzeyleri korunurken; TIE2 seviyelerinde artış; diğer tüm gen ekspresyonlarında ise azalma görüldüğü ve aslında tedavinin, ilaca direnç gelişmemiş hücrelerdeki başarısı doğrulanmıştır. Ancak sunitinibe dirençli gruplar kendi kontrollerine göre incelendiğinde, sunitinib ile tedavi sonrasında tüm gen ekspresyonlarında artış belirlenmiştir. VHL gibi özellikle HIF-A düzenleyicisi ve diğer anjiyogenez faktörlerinin oluşumunun ve akabinde tümörün devamlılığı açısından oldukça önemli bir noktanın, dirençli hücrelerde sunitinib ile süksinik asitin düşük dozu kombinasyon tedavisi sonrasındaki düzeylerinin dirençli kontrole göre korunduğu fakat yüksek doz süksinik asitin bu noktada, duyarlı hücrelerdeki tedavide gösterdiği başarıyı sağlayamadığı görülmüştür. Sunitinib direncine karşı ikincil bir tedavi uygulaması sonrasında VEGF gen ekspresyon seviyelerinin incelendiği bir çalışmada, sunitinib dirençli iki farklı hücrede tocilizumab aktivitesi sonrasında, VEGF ekspresyon düzeylerinin Caki-1 için azalırken SN12K1 için arttığı görülmüştür (163), bu da hücre tipi ve metastatik özelliklerin derecesine yönelik spesifik yanıtların alınabileceğini gösteriyor olup, çalışmamızda kullandığımız, sunitinibe direnç geliştirdiğimiz ve metastatik tipte ACHN hücrelerinde tedavi sonrasında artan VEGF düzeylerini açıklamaya yardımcı olabilecek bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır. VEGF-C ekspresyon seviyeleri lenfanjiyogenik bir faktör olarak, birçok tümör tipinde lenf nodu metastazı ile ilişkili ve yüksek düzeylerde tespit edilmiştir. Farelere implante edilen aşırı VEGF-C eksprese eden tümörlerde intratümör lenfatik damarların varlığı ve artmış metastaz yetenekleri gözlemlenmiştir. Çalışmamızın bulgularına paralel olarak; sunitinibin VEGF-C düzeylerini normal hücrelerde değil, sadece tümör hücrelerinde arttırmış olması; tümör hücresinin ilaca adaptasyonuna aracılık eden diğer genetik özelliklerin rolünü düşündürmektedir. Sunitinib hasta sağkalımı için oldukça başarılı sonuçlar vermiş olsa da, daha etkili VEGF-C hedeflemeleri ile etkinliği daha da iyileştirilebilir hale getirilebilir (164). Çalışmalar, kanser hastalarındaki metastaz ve sağkalımın, VEGF-C ekspresyonu ve lenfatik invazyona bağlı pozitif bir ilişkiyle desteklendiğini göstermiştir. Metastatik lenf nodlarındaki VEGF-C düzeyleri yüksek bulunan rahim ağzı kanserli hastaların 2 yıllık sağ kalım oranı %38 iken, VEGF-C düzeyi normal olarak tanımlanan hastalarda bu oran %81 olarak yansımıştır (165).

Sunitinibin PDGF-A üzerindeki başarısı, direnç gelişimi sonrasındaki tedavilerde ortadan kalkmış olsa bile, süksinik asit kombinasyonu bu nokta üzerindeki

kontrolü tekrar ele almakta ancak 25 μ M süksinik asitin tek başına ve sunitinib ile birlikteliğinde yalnız sunitinib ile tedavideki seviyelerde tutarak başarılı olabilmış, 50 μ M süksinik asitin dahil olduğu tedavi gruplarında ise başarılı olamamıştır. PDGF-A gen ekspresyon düzeyleri, sunitinibin hedeflerinden biri olarak, özellikle sunitinibe gelişen direnç sonrasında RHK tedavileri için önemli bir kaçış noktası olarak tekrar karşımıza çıkmıştır. Özofagus skuamöz hücreli karsinom hastalarında yapılan çalışmada, hastalığın kötü prognozunda PDGF-A aşırı ekspresyonunun potansiyel bir biyobelirteç olarak ilişkili olabileceği değerlendirilmiş olup, hastalığın tedavisi için olası bir moleküler hedef olarak gösterilmiştir (94). Meme karsinomlarında PDGF-A protein düzeyleri (166) ve bir diğer çalışmada küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında, tümör hücrelerinde PDGF-A ekspresyonu lenf nodu metastazı ile ilişkili bulunmuştur (167). RHK’de VHL inaktivasyonu, hipoksi ve hücre metabolizmalarının tümü HIF yolağını tetikleyebilmekte olduğundan, HIF yolunun hedeflendiği stratejiler oldukça önem teşkil eder (44). Bu anlamda dirençli grup üzerinde düşük doz süksinik asit ve sunitinib kombinasyonu neticesinde elde edilen HIF-1A seviyelerindeki geri dönüş önemlidir. Süksinik asitin 50 μ M dozu ile tek başına tedavilerde hem duyarlı hem de dirençli gruplarda protein ve gen ekspresyon düzeylerinde önemli artışlar tespit edilmiştir. Süksinik asitin 50 μ M dozu için sunitinib ile kombine uygulamalarda, dirençli hücreler üzerinde HIF-1A düzeylerinde önemli artışlar ve diğer yandan duyarlı hücre grubunda HIF-1A düzeylerinin önemli oranda azalması, belki de duyarlı gruptaki korunmuş fakat dirençli grupta 50 μ M süksinik asit ve sunitinib birlikteliğinde oldukça azalan VHL düzeyleri ile açıklanabilir. Özellikle hipoksik koşullara bağlı olarak ifadesi oldukça artan, ve kontrol ettiği diğer VEGF, PDGF, TGF gibi noktalar üzerinde de artışa neden olan ve diğer yandan VHL tarafından da kontrol edilen HIF-1A düzeylerindeki dalgalanmalar, bu karmaşık sürecin oluşumuna sebebiyet vermekte ve bu noktada süksinik asit ile sunitinib ilişkisinin net bir açıklama ile aydınlatılmasını zorlaştırmaktadır. Böbrek kanserli hastalarda HIF1 ve VEGF-A ekspresyonlarının, tümör dokularında kontrol dokuya göre sırasıyla 2 ve 5 kata kadar arttığı tespit edilmiştir. Öte yandan yine çalışmamızdaki bulgulara benzer olarak, VHL gen ekspresyonlarının, tümör dokularındaki ekspresyonlarının %30 oranında azaldığı belirlenmiştir. Protein ifadeleri yönünden, HIF1 düzeyleri tümör dokularında daha yüksek iken, VHL ve VEGF açısından normal dokuya göre herhangi bir değişim tespit edilmemiştir (168). Bu da sunitinibe duyarlı ve direnç gösteren gruplarımız arasında

tedaviye başlamadan dahi elde edilen farklarla örtüşmektedir. Sunitinib her ne kadar VEGF hedefli aktivasyon gösterse de nihayetinde VEGF diğer taraftan HIF1 hedefi olması dolayısıyla ve sunitinibe karşı gelişen direnç ile sunitinibin bu noktadaki yetersizliği, VEGF'in HIF1 tarafından uyarılmasına bağlı RHK ilerleyişinde etkili olmaya devam eder (169). TGF- β ailesi üyelerince sağlanan sinyale, transkripsiyon düzenleyici Smad proteinlerinin aracılık etmesiyle HIF-1 ifadesindeki uyarımla paralel, VEGF gen ekspresyonunda artış meydana gelmektedir (170). Bu tanımlamalar, çalışmamızda dirençli gruplarda HIF-1A; hem duyarlı hem de dirençli gruplarda VEGF-A korelasyon ilişkileri gösterilen TGF- β 'nın etkinliğinin bu yönde gerçekleştiğini doğrulamaktadır. TGF- β sinyali, büyüme, farklılaşma ve apoptoz gibi çeşitli hücresel süreçlerde düzenleyici role sahip bir yol olup, erken evreler için tümör baskılayıcı rolü olsa da, daha sonraki evrelerde tümör mekanizmasına katkı sunar. Ayrıca tümör dokularındaki TGF- β ifadeleri, komşu normal dokulara oranla yüksek düzeylerde seyredebilir. Anti-VEGF tedavilere dirençli tümörlerin yüksek TGF- β 1 ekspresyonuna sahip olması, direnç sürecinde önemli bir aktivitesi olduğuna işaret etmektedir (171). RHK hastaları üzerinde yapılan bir klinik çalışma, TGF- β -Smad yolağının tümör ilerleyiş invazyon ve kötü prognoz ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Böbrek korteksinde düşük ALK5-FL protein seviyeleri, ileri tümör evrelerinde ve büyük tümörlerde ise yüksek ALK5-FL protein seviyeleri izlenmiş olup ALK5 ve Smad yolunun önemine değinilmiştir (103). Çalışmamızda sunitinibe duyarlı ve dirençli gruplarda 50 μ M süksinik asit ile sunitinibin kombinasyon tedavisi sonrasında artan TGF-B düzeyleri, sunitinib birlikteliğindeki süksinik asitin, tümörün temel yeteneklerini teşvik edecek yönde bir eğilime neden olduğu görülmüştür. Sunitinibe dirençli grupta, 25 μ M süksinik asit ile sunitinib kombinasyonunda TGF-B düzeylerinin anlamlı olmasa da, yalnız sunitinib ile tedaviden elde edilen düzeylerden daha düşük olduğu görülmüştür. Sunitinibe duyarlı ve dirençli hücrelerdeki tedavi önceliği ve VHL düzeylerinin önemi düşünüldüğünde, sunitinibe duyarlı hücrelerde uygulanan 50 μ M süksinik asit ile sunitinibin kombinasyonu sonrasında azalan, ve diğer yandan 25 μ M süksinik asit ile sunitinibin kombinasyonu sonrasında, dirençli hücrelerde korunan VHL seviyeleri düşünüldüğünde düşük doz süksinik asit kullanımının daha önemli olduğu öne çıkmaktadır. Bu noktada, yine dirençli hücrelerde direnç yanıtı geliştikten sonraki tedavi sürecinde, ikincil bir tedavi ajanı kullanımında, doz seçimi ve kombine etkinin önemi tekrar ortaya çıkmakta olup, sunitinibin doz etkinliği ile ilgili farklı yaklaşımları

da düzenlemeyi gerektirebilir. HIF-1A yıkımının kontrolünü sağlayan, VEGF, PDGF gibi anjiyogenik yolların merkezinde yönlendirici ve çok önemli bir düzenleyici role sahip olan VHL etkinliğinin artışı, bu noktalardaki anjiyogenik yansımaların baskılanarak, tümörün kendine sağladığı bu yeteneklere engel olabilecek koşullardan birini sağlayabilmesi açısından önem teşkil etmektedir. VHL kaybına bağlı, VEGF mRNA ve protein aşırı ekspresyonlarında, yeniden atasal VHL verildiğinde VEGF kontrolünün tekrar kazanıldığı gösterilmiştir (44, 172).

ANGPT1, TIE2 aktivatörü olup, damar olgunlaşma, endotel hücre göçü ve hayatta kalma süreçlerinde etkindir. ANGPT2, ise ANGPT1 antagonisti olarak, TIE2 sinyalleşmesinin önüne geçmekte, özellikle de düşük TIE2 varlığında daha da artmak suretiyle, aktiflediği integrinler aracılığıyla endotel düzensizlik yaratabilmektedir. VEGF-A varlığında bunun yerine ANGPT2 anjiyogenezini teşvik eder. TIE2 eksprese eden makrofajlar, hem tümör anjiyogenezinde hem de tümör yayılımında etkili olabilir. Bu nedenle, ANGPT-TIE2 sinyali, tümörün ilerlemesi ve metastazı sırasında önemli bir noktayı temsil etmektedir (107, 173). Her ne kadar ANGPT1'in anjiyogenez ve tümör progresyonundaki rolü net olarak aydınlatılamamış olsa da, literatürdeki çoğu çalışmanın, ANGPT1'in patolojik vasküleriteyi inhibe ettiğine dair sunmuş olduğu veriler, ANGPT1'in birçok kanserde tümör baskılayıcı bir noktada temsil edildiğine işaret etmekte olup, ANGPT2/ANGPT1 oranındaki artışa bağlı malignitelerin kötü prognozla ilişkili olduğu savıyla da örtüştüğü bildirilmiştir. Konuyla ilgili günümüze dek elde edilen veriler değerlendirildiğinde, ANGPT1 yansımalarının kanserin tipine özgü ve ayrıca diğer anjiyogenez ile ilişkili genlere bağlı olabileceği görüşü öne çıkmaktadır (174). Çalışmamızdaki, dirençli kontrol grubunda, diğer hedeflere oranla yüksek düzeylerde eksprese olan ANGPT1 seviyelerinin, tümörün seyrine yönelik bir altyapıyı desteklemek için teşvik edildiği söylenebilir ve ayrıca 25 μ M süksinik asit ile sunitinib kombinasyonu sonrasında bu seviyelerin, tek başına sunitinib ile elde edilen düzeylere oranla 2 kata kadar azalması, bu yolağın tekrar kontrollü bir yöne çekildiğine dair bir anlama sahip gibi gözükmemektedir. Serviks kanserinde yüksek TIE2 seviyelerinin, TIE2 ve VEGFR2 ifadelerinin artışı ile, AKT/MAPK yolağını tetikleyerek güçlü anjiyogenez yeteneklerini uyardığı gösterilmiştir (175). ANGPT2 ise proinflamatuvar yönüyle öne çıkan, diğer anjiyogenik faktörlerin de varlığı söz konusu olması halinde ise, güçlü bir anjiyogenik yanıt için elverişli bir ortam hazırlayan ve ancak yeterince yüksek ANGPT2 konsantrasyonlarında vasküler regresyona neden

olabilen bir faktördür. Kolon, mide ve hepatoma hücrelerinde aşırı eksprese ANGPT2'nin, anjiyogenezi tetikleyerek ve tümör gelişimini desteklediği bildirilmiştir (176). Çalışmamızda, duyarlı grupta 25 μ M süksinik asit ile sunitinib kombinasyonu sonrasında, artan ANGPT1 ve azalan TIE2 seviyelerinin, sunitinib dirençli gruplarda tek başına sunitinib etkinliğine kıyaslandığında 25 μ M süksinik asit ile sunitinib kombinasyonunun ANGPT1 ve TIE2 düzeylerini azaltarak anjiyogenik yetenekler yönünden tümöre bir baskılama getirmek için davrandığı öne sürülebilir. ANGPT1 ve TIE2 seviyeleri, ANGPT2'nin ANGPT1 üzerindeki antagonistik ilişkisiyle birlikte ele alındığında, tedavi öncesinde ANGPT2 seviyelerinin ANGPT1'den daha yüksek olabileceği ve tedavi sonrasında antagonistik ANGPT2 etkisinin ortadan kaldırılarak tekrar daha dengeli bir ANGPT1-TIE2 sinyalizasyonuna elverişli bir ortama evrildiğini düşündürmektedir. Ancak yalnızca elimizdeki verilerle bu çıkarımları yapmak yetersiz olabileceğinden, yapacağımız ileri analizler ile bu ANGPT1/ANGPT2 ilişkisindeki noktanın aydınlatılarak, tedavi hedeflemelerinde bu noktaların olası hedeflenme potansiyeline olan yakınlığının da ayrıca incelenmesi öngörülmektedir.

Özet olarak, sunitinibe dirençli hücrelerde sunitinib tedavisine rağmen anjiyogenez aktivitesine neden olan genlerin ekspresyonunun devam etmesi, sunitinib direnci oluşmuş hücrelerde, anjiyogenez yeteneklerinin korunmaya devam ettiğini gösterirken; diğer yandan, yine sunitinibe direnç gelişen gruplarda, tek başına sunitinib ile tedavi devamlılığında istenilen başarının alınamayacağı açıkça görülmüştür. Dirençli hücrelerdeki bu ekspresyon seviyelerinin, 25 μ M süksinik asit ile sunitinib kombinasyonunda baskılanıp durdurulabildiği hatta bazen azaldığı görülmüş, ancak 50 μ M süksinik asit ile kombinasyon sonrası istenen başarı elde edilemediği gibi, VHL dışındaki tüm gen ekspresyonları için artan ifadeler görülmüştür ki VHL'nin HIF1 üzerindeki rolü düşünüldüğünde VHL kaybı tümörün kendisini teşvik etmesi anlamına geldiğinden, yüksek doz yani 50 μ M süksinik asit ile sunitinib kombinasyonunun tüm bu genel değerlendirmeler üzerine tedavi için sağlıklı bir tercih olmayacağına işaret etmektedir.

Sunitinibe duyarlı ve dirençli gruplarda VEGF-A'nın TGF- β , ANGPT1, TIE2 ve VHL ile, TGF- β 'nin ANGPT1 ile gösterilen korelasyonları, tümörün yeteneklerini artırmak için birden çok geni, farklı yollar üzerinden karmaşık sinyalizasyonlar ile aktive ettiğini göstermektedir. Özellikle çalışmamızda, azalan HIF-1A, VEGF-C ve PDGF-A devamlılığının sağlandığı durumlarda dahi artan VEGF-A düzeylerinin

VEGF-A'nın TGF- β ile olan etkileşimine bağlı olabileceği öne sürülebilir. Dirençli gruplarda VEGF-C'nin VEGF-A, HIF-1A ve PDGF-A; TGF- β 'nın PDGF-A ve HIF-1A ile gösterdikleri korelasyonlar, özellikle proliferasyon ve anjiyogenik yeteneklerin teşvik edilirken ilişkili uyarımların birbirini destekleyerek devamlılık sağlamayı amaçladığını göstermektedir.

Tez çalışmamızın sonuçları, sunitinibe dirençli grupta, 25 μ M süksinik ile kombine edilen sunitinibin, tedavi sonrasında, sunitinibe dirençli ve yalnız sunitinib ile tedavi edilen gruplara kıyaslandığında HIF-1A, TGF- β , ANGPT1 ve TIE2 gibi tümörün anjiyogeneze ve proliferasyon yeteneklerini uyaran etkileşimleri sağlayan genler üzerinde etki göstererek, ekspresyonlarını baskıladığı görülmüştür. Süksinik asitin, sunitinib direncine bağlı geliştiği düşünülen hipoksik yanıtı, HIF-1A üzerinden baskıladığı ve anjiyogeneze yanıtını ANGPT1-TIE2 düzeylerini kontrol ederek ele aldığı gözlenmiştir. TGF- β üzerindeki baskılanmanın tümörün proliferasyonunu engellemek adına önemli bir sonuç olduğu izlenimi elde edilmiştir. Ancak 50 μ M süksinik asit ile kombine edilen sunitinib ile tedavi sonrasında bu durumun oldukça tersine döndüğü ve aksine, ekspresyonların tetiklendiği görülmüştür. Bu nedenle tez çalışmamızın sonucunda, sunitinibe dirençli RHK hücresi olan ACHN üzerinde uygulanan süksinik asit tedavilerinde, anjiyogeneze yeteneklerini tümör gelişiminin aleyhinde düzenleyebilecek potansiyele sahip olduğunu gördüğümüz düşük dozda süksinik asit ile kombine ederek uyguladığımızda sunitinibin, sunitinibe dirençli hücrelerde yalnız sunitinib ile tedaviye göre daha başarılı sonuçlar verdiğini, ancak dirençli hücrelerin, yine de farklı yollar üzerinden gen ekspresyonlarını artırarak, anjiyogenik yeteneklerini korumaya yönelik davrandığı görülmüştür. Süksinik asitin, sunitinibe dirençli hücrelerde anjiyogeneze belirteçlerinin inhibisyonuna yönelik terapilerdeki potansiyel gücünün, diğer ilişkili gen ve yollar da dahil edilerek incelenmesinin daha net çıkarımlar yapmamıza önayak olacağı değerlendirilmiş olup, kullanılan sunitinib-süksinik asit kombinasyonunda, özellikle sunitinibin düşük dozlardaki optimizasyonlarının da dahil edilerek çalışılmasının hem süksinik asitin etkinliğini artırabilecek hem de tedavilerde daha net bakış açılarının elde edilmesinde faydalı olacağı öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Motzer RJ, Jonasch E, Agarwal N, Alva A, Baine M, Beckermann K, et al. Kidney Cancer, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2022;20(1):71-90.
2. Baral A, Cranford HM, Sharma J, Pinheiro PS. The prognostic role of cigarette smoking in Kidney Cancer Survival. *Cancer Med*. 2023.
3. Nabi S, Kessler ER, Bernard B, Flaig TW, Lam ET. Renal cell carcinoma: a review of biology and pathophysiology. *F1000Res*. 2018;7:307.
4. Kase AM, George DJ, Ramalingam S. Clear Cell Renal Cell Carcinoma: From Biology to Treatment. *Cancers (Basel)*. 2023;15(3).
5. Barata PC, Rini BI. Treatment of renal cell carcinoma: Current status and future directions. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(6):507-24.
6. Alsharedi M, Katz H. Check point inhibitors a new era in renal cell carcinoma treatment. *Med Oncol*. 2018;35(6):85.
7. Buczek M, Escudier B, Bartnik E, Szczylik C, Czarnecka A. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in clear cell renal cell carcinoma: from the patient's bed to molecular mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1845(1):31-41.
8. Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM, Curti BD, George DJ, Hudes GR, et al. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Jama*. 2006;295(21):2516-24.
9. Jin J, Xie Y, Zhang JS, Wang JQ, Dai SJ, He WF, et al. Sunitinib resistance in renal cell carcinoma: From molecular mechanisms to predictive biomarkers. *Drug Resist Updat*. 2023;67:100929.
10. Iplik ES, Catmakas T, Cakmakoglu B. A new target for the treatment of endometrium cancer by succinic acid. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2018;64(1):60-3.
11. Ertugrul B, Iplik ES, Cakmakoglu B. In Vitro Inhibitory Effect of Succinic Acid on T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines. *Arch Med Res*. 2021;52(3):270-6.
12. Kasarci G, Ertugrul B, Iplik ES, Cakmakoglu B. The apoptotic efficacy of succinic acid on renal cancer cell lines. *Med Oncol*. 2021;38(12):144.
13. Mingrone G, Castagneto-Gissey L, Macé K. Use of dicarboxylic acids in type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;75(3):671-6.
14. Escudier B, Porta C, Schmidinger M, Rioux-Leclercq N, Bex A, Khoo V, et al. Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2019;30(5):706-20.
15. Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Jacqmin D, Lee JE, Weikert S, et al. The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2011;60(4):615-21.
16. Häggström C, Rapp K, Stocks T, Manjer J, Bjørge T, Ulmer H, et al. Metabolic factors associated with risk of renal cell carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(2):e57475.
17. Boffetta P, Fontana L, Stewart P, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Janout V, et al. Occupational exposure to arsenic, cadmium, chromium, lead and nickel, and renal cell carcinoma: a case-control study from Central and Eastern Europe. *Occup Environ Med*. 2011;68(10):723-8.
18. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49.

19. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(1):7-33.
20. Padala SA, Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, Mohammed A, Vakiti A, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *World J Oncol.* 2020;11(3):79-87.
21. Yiğit P, Ataç Ö, Aydın S. Trends in the incidence rate of genitourinary system cancers in Turkey: 2004-2015. *Turk J Urol.* 2020;46(3):196-205.
22. Türkyilmaz Murat, Hamavioğlu Oruç Ege İhsan, Dündar Selin, Ergün Kavak Aysun, Sevinç Arzu, Tütüncü Semra. TÜRKİYE KANSER İSTATİSTİKLERİ 2018 Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı, Ankara, 2022.
23. Global Cancer Observatory, GLOBOCAN 2020, 2023. Erişim tarihi: 20.01.2023, Erişim site adı: <https://gco.iarc.fr/>.
24. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 1996;335(12):865-75.
25. Szendroi A, Tabák A, Riesz P, Szucs M, Nyírády P, Majoros A, et al. Clinical symptoms related to renal cell carcinoma are independent prognostic factors for intraoperative complications and overall survival. *Int Urol Nephrol.* 2009;41(4):835-42.
26. Sacco E, Pinto F, Sasso F, Racioppi M, Gulino G, Volpe A, et al. Paraneoplastic syndromes in patients with urological malignancies. *Urol Int.* 2009;83(1):1-11.
27. Buckle RM, McMillan M, Mallinson C. Ectopic secretion of parathyroid hormone by a renal adenocarcinoma in a patient with hypercalcaemia. *Br Med J.* 1970;4(5737):724-6.
28. Hegemann M, Kroeger N, Stenzl A, Bedke J. Rare and changeable as a chameleon: paraneoplastic syndromes in renal cell carcinoma. *World J Urol.* 2018;36(6):849-54.
29. Flanigan RC, Campbell SC, Clark JI, Picken MM. Metastatic renal cell carcinoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2003;4(5):385-90.
30. Zagoria RJ, Dyer RB, Wolfman NT, Hinn GC, Chen YM. Radiology in the diagnosis and staging of renal cell carcinoma. *Crit Rev Diagn Imaging.* 1990;31(1):81-115.
31. Sankineni S, Brown A, Cieciera M, Choyke PL, Turkbey B. Imaging of renal cell carcinoma. *Urol Oncol.* 2016;34(3):147-55.
32. Muglia VF, Prando A. Renal cell carcinoma: histological classification and correlation with imaging findings. *Radiol Bras.* 2015;48(3):166-74.
33. Lopez-Beltran A, Carrasco JC, Cheng L, Scarpelli M, Kirkali Z, Montironi R. 2009 update on the classification of renal epithelial tumors in adults. *Int J Urol.* 2009;16(5):432-43.
34. Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Montironi R, Kirkali Z. 2004 WHO classification of the renal tumors of the adults. *Eur Urol.* 2006;49(5):798-805.
35. Mohanty SK, Lobo A, Cheng L. The 2022 revision of the World Health Organization classification of tumors of the urinary system and male genital organs: advances and challenges. *Hum Pathol.* 2022.
36. Singh A, Singh I, Singh N, Puzanov I. Optimal Management of First-Line Advanced Renal Cell Carcinoma: Focus on Pembrolizumab. *Onco Targets Ther.* 2020;13:4021-34.
37. Robson CJ, Churchill BM, Anderson W. The results of radical nephrectomy for renal cell carcinoma. *J Urol.* 1969;101(3):297-301.
38. Edge SB, Byrd DR, Carducci MA, Compton CC, Fritz A, Greene F. *AJCC cancer staging manual*: Springer; 2010.

39. Ridge CA, Pua BB, Madoff DC. Epidemiology and staging of renal cell carcinoma. *Semin Intervent Radiol*. 2014;31(1):3-8.
40. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 1982;6(7):655-64.
41. Delahunt B, Cheville JC, Martignoni G, Humphrey PA, Magi-Galluzzi C, McKenney J, et al. The International Society of Urological Pathology (ISUP) grading system for renal cell carcinoma and other prognostic parameters. *The American journal of surgical pathology*. 2013;37(10):1490-504.
42. Rabjerg M, Gerke O, Engvad B, Marcussen N. Comparing World Health Organization/International Society of Urological Pathology Grading and Fuhrman grading with the prognostic value of nuclear area in patients with renal cell carcinoma. *Uro*. 2021;1(1):2-13.
43. Ghafouri S, Johnson DC, Kelly K, Pantuck A, Drakaki A. Molecular Biology and Genetics of Renal Cell Carcinoma. *Renal Cancer: Contemporary Management*. 2020:19-33.
44. Kim H, Shim BY, Lee SJ, Lee JY, Lee HJ, Kim IH. Loss of Von Hippel-Lindau (VHL) Tumor Suppressor Gene Function: VHL-HIF Pathway and Advances in Treatments for Metastatic Renal Cell Carcinoma (RCC). *Int J Mol Sci*. 2021;22(18).
45. Linehan WM, Srinivasan R, Schmidt LS. The genetic basis of kidney cancer: a metabolic disease. *Nat Rev Urol*. 2010;7(5):277-85.
46. Motzer RJ, Banchereau R, Hamidi H, Powles T, McDermott D, Atkins MB, et al. Molecular Subsets in Renal Cancer Determine Outcome to Checkpoint and Angiogenesis Blockade. *Cancer Cell*. 2020;38(6):803-17.e4.
47. Gu D, Dong K, Jiang A, Jiang S, Fu Z, Bao Y, et al. PBRM1 Deficiency Sensitizes Renal Cancer Cells to DNMT Inhibitor 5-Fluoro-2'-Deoxycytidine. *Front Oncol*. 2022;12:870229.
48. Ho TH, Kapur P, Joseph RW, Serie DJ, Eckel-Passow JE, Tong P, et al. Loss of histone H3 lysine 36 trimethylation is associated with an increased risk of renal cell carcinoma-specific death. *Mod Pathol*. 2016;29(1):34-42.
49. Hapke R, Venton L, Rose KL, Sheng Q, Reddy A, Prather R, et al. SETD2 regulates the methylation of translation elongation factor eEF1A1 in clear cell renal cell carcinoma. *Kidney Cancer J*. 2022;6(3):179-93.
50. Louie BH, Kurzrock R. BAP1: Not just a BRCA1-associated protein. *Cancer Treat Rev*. 2020;90:102091.
51. Fatima A, Mushtaq S, Loya A, Hassan U, Sheikh UN. Expression Of Bap1 In Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2022;34(2):283-7.
52. Walton J, Lawson K, Prinios P, Finelli A, Arrowsmith C, Ailles L. PBRM1, SETD2 and BAP1 - the trinity of 3p in clear cell renal cell carcinoma. *Nat Rev Urol*. 2023;20(2):96-115.
53. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, et al. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*. 1991;251(4995):802-4.
54. Zhang Y, Xia M, Jin K, Wang S, Wei H, Fan C, et al. Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. *Mol Cancer*. 2018;17(1):45.
55. Marona P, Górka J, Kotlinowski J, Majka M, Jura J, Miekus K. C-Met as a Key Factor Responsible for Sustaining Undifferentiated Phenotype and Therapy Resistance in Renal Carcinomas. *Cells*. 2019;8(3).

56. Tian T, Li X, Zhang J. mTOR Signaling in Cancer and mTOR Inhibitors in Solid Tumor Targeting Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3).
57. Nickerson ML, Warren MB, Toro JR, Matrosova V, Glenn G, Turner ML, et al. Mutations in a novel gene lead to kidney tumors, lung wall defects, and benign tumors of the hair follicle in patients with the Birt-Hogg-Dubé syndrome. *Cancer Cell.* 2002;2(2):157-64.
58. Wu M, Si S, Li Y, Schoen S, Xiao GQ, Li X, et al. Flcn-deficient renal cells are tumorigenic and sensitive to mTOR suppression. *Oncotarget.* 2015;6(32):32761-73.
59. Zhao X, Ma Y, Cui J, Zhao H, Liu L, Wang Y, et al. FLCN Regulates HIF2 α Nuclear Import and Proliferation of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Front Mol Biosci.* 2020;7:121.
60. Povey S, Burley MW, Attwood J, Benham F, Hunt D, Jeremiah SJ, et al. Two loci for tuberous sclerosis: one on 9q34 and one on 16p13. *Ann Hum Genet.* 1994;58(2):107-27.
61. Mrozek EM, Bajaj V, Guo Y, Malinowska IA, Zhang J, Kwiatkowski DJ. Evaluation of Hsp90 and mTOR inhibitors as potential drugs for the treatment of TSC1/TSC2 deficient cancer. *PLoS One.* 2021;16(4):e0248380.
62. Orlova KA, Crino PB. The tuberous sclerosis complex. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1184:87-105.
63. Aghamir SMK, Heshmat R, Ebrahimi M, Ketabchi SE, Parichehreh Dizaji S, Khatami F. The Impact Of Succinate Dehydrogenase Gene (SDH) Mutations In Renal Cell Carcinoma (RCC): A Systematic Review. *Onco Targets Ther.* 2019;12:7929-40.
64. Gill AJ. Succinate dehydrogenase (SDH) and mitochondrial driven neoplasia. *Pathology.* 2012;44(4):285-92.
65. Hoekstra AS, de Graaff MA, Briaire-de Bruijn IH, Ras C, Seifar RM, van Minderhout I, et al. Inactivation of SDH and FH cause loss of 5hmC and increased H3K9me3 in paraganglioma/pheochromocytoma and smooth muscle tumors. *Oncotarget.* 2015;6(36):38777-88.
66. Lehtonen HJ, Mäkinen MJ, Kiuru M, Laiho P, Herva R, van Minderhout I, et al. Increased HIF1 α in SDH and FH deficient tumors does not cause microsatellite instability. *Int J Cancer.* 2007;121(6):1386-9.
67. Tomlinson IP, Alam NA, Rowan AJ, Barclay E, Jaeger EE, Kelsell D, et al. Germline mutations in FH predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nat Genet.* 2002;30(4):406-10.
68. Kinch L, Grishin NV, Brugarolas J. Succination of Keap1 and activation of Nrf2-dependent antioxidant pathways in FH-deficient papillary renal cell carcinoma type 2. *Cancer Cell.* 2011;20(4):418-20.
69. Sudarshan S, Shanmugasundaram K, Naylor SL, Lin S, Livi CB, O'Neill CF, et al. Reduced expression of fumarate hydratase in clear cell renal cancer mediates HIF-2 α accumulation and promotes migration and invasion. *PLoS One.* 2011;6(6):e21037.
70. Pollard PJ, Brière JJ, Alam NA, Barwell J, Barclay E, Wortham NC, et al. Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1 α in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet.* 2005;14(15):2231-9.
71. Xie H, Ma K, Zhang K, Zhou J, Li L, Yang W, et al. Cell-cycle arrest and senescence in TP53-wild type renal carcinoma by enhancer RNA-P53-bound enhancer regions 2 (p53BER2) in a p53-dependent pathway. *Cell Death Dis.* 2021;12(1):1.
72. Diesing K, Ribback S, Winter S, Gellert M, Oster AM, Stühler V, et al. p53 is functionally inhibited in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC): a mechanistic and

correlative investigation into genetic and molecular characteristics. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2021;147(12):3565-76.

73. Wang Z, Peng S, Jiang N, Wang A, Liu S, Xie H, et al. Prognostic and clinicopathological value of p53 expression in renal cell carcinoma: a meta-analysis. *Oncotarget.* 2017;8(60):102361-70.

74. Noon AP, Vlatković N, Polański R, Maguire M, Shawki H, Parsons K, et al. p53 and MDM2 in renal cell carcinoma: biomarkers for disease progression and future therapeutic targets? *Cancer.* 2010;116(4):780-90.

75. Li F, Aljahdali IAM, Zhang R, Nastiuk KL, Krolewski JJ, Ling X. Kidney cancer biomarkers and targets for therapeutics: survivin (BIRC5), XIAP, MCL-1, HIF1 α , HIF2 α , NRF2, MDM2, MDM4, p53, KRAS and AKT in renal cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021;40(1):254.

76. Wang Z, Dabrosin C, Yin X, Fuster MM, Arreola A, Rathmell WK, et al. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. *Semin Cancer Biol.* 2015;35 Suppl(Suppl):S224-s43.

77. Comandone A, Vana F, Comandone T, Tucci M. Antiangiogenic Therapy in Clear Cell Renal Carcinoma (CCRC): Pharmacological Basis and Clinical Results. *Cancers (Basel).* 2021;13(23).

78. Schönenberger D, Rajski M, Harlander S, Frew IJ. Vhl deletion in renal epithelia causes HIF-1 α -dependent, HIF-2 α -independent angiogenesis and constitutive diuresis. *Oncotarget.* 2016;7(38):60971-85.

79. Boström AK, Lindgren D, Johansson ME, Axelson H. Effects of TGF- β signaling in clear cell renal cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;435(1):126-33.

80. Cook KM, Figg WD. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J Clin.* 2010;60(4):222-43.

81. Falcón BL, Hashizume H, Koumoutsakos P, Chou J, Bready JV, Coxon A, et al. Contrasting actions of selective inhibitors of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 on the normalization of tumor blood vessels. *Am J Pathol.* 2009;175(5):2159-70.

82. Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell.* 2009;15(3):220-31.

83. Lu KV, Chang JP, Parachoniak CA, Pandika MM, Aghi MK, Meyronet D, et al. VEGF inhibits tumor cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. *Cancer Cell.* 2012;22(1):21-35.

84. Situ Y, Xu Q, Deng L, Zhu Y, Gao R, Lei L, et al. System analysis of VEGFA in renal cell carcinoma: The expression, prognosis, gene regulation network and regulation targets. *Int J Biol Markers.* 2022;37(1):90-101.

85. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(2):455-67.

86. Guillaume Z, Auvray M, Vano Y, Oudard S, Helley D, Mauge L. Renal Carcinoma and Angiogenesis: Therapeutic Target and Biomarkers of Response in Current Therapies. *Cancers (Basel).* 2022;14(24).

87. Zhang LQ, Xu XS, Wan Y, Song SD, Wang RT, Chen W, et al. Prognostic implications of estrogen receptor 1 and vascular endothelial growth factor A expression in primary gallbladder carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2015;21(4):1243-50.

88. Lin YW, Huang ST, Wu JC, Chu TH, Huang SC, Lee CC, et al. Novel HDGF/HIF-1 α /VEGF axis in oral cancer impacts disease prognosis. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1083.
89. Campbell EJ, Dachs GU, Morrin HR, Davey VC, Robinson BA, Vissers MCM. Activation of the hypoxia pathway in breast cancer tissue and patient survival are inversely associated with tumor ascorbate levels. *BMC Cancer*. 2019;19(1):307.
90. Li X, Song D, Liu H, Wang Z, Ma G, Yu M, et al. Expression levels of VEGF-C and VEGFR-3 in renal cell carcinoma and their association with lymph node metastasis. *Exp Ther Med*. 2021;21(6):554.
91. Lange C, Storkebaum E, de Almodóvar CR, Dewerchin M, Carmeliet P. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. *Nature Reviews Neurology*. 2016;12(8):439-54.
92. Yu J, Ustach C, Kim HR. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol*. 2003;36(1):49-59.
93. Mantur M, Koper O. [Platelet- derived growth factor--the construction, role and it's receptors]. *Pol Merkur Lekarski*. 2008;24(140):173-6.
94. Han N, Zhang YY, Zhang ZM, Zhang F, Zeng TY, Zhang YB, et al. High expression of PDGFA predicts poor prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(20):e25932.
95. Sulzbacher I, Birner P, Träxler M, Marberger M, Haitel A. Expression of platelet-derived growth factor-alpha alpha receptor is associated with tumor progression in clear cell renal cell carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2003;120(1):107-12.
96. Yu G, Zhou A, Xue J, Huang C, Zhang X, Kang SH, et al. FoxM1 promotes breast tumorigenesis by activating PDGF-A and forming a positive feedback loop with the PDGF/AKT signaling pathway. *Oncotarget*. 2015;6(13):11281-94.
97. Ghanem M, Nijman R, Safan M, van der Kwast T, Vansteenbrugge G. Expression and prognostic value of platelet-derived growth factor-AA and its receptor α in nephroblastoma. *BJU Int*. 2010;106(9):1389-93.
98. Görlach A, Bonello S. The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem J*. 2008;412(3):e17-9.
99. Li Z, Wang D, Messing EM, Wu G. VHL protein-interacting deubiquitinating enzyme 2 deubiquitinates and stabilizes HIF-1 α . *EMBO Rep*. 2005;6(4):373-8.
100. Tosi GM, Orlandini M, Galvagni F. The Controversial Role of TGF- β in Neovascular Age-Related Macular Degeneration Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11).
101. Pardali E, Goumans MJ, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol*. 2010;20(9):556-67.
102. Itoh F, Itoh S, Adachi T, Ichikawa K, Matsumura Y, Takagi T, et al. Smad2/Smad3 in endothelium is indispensable for vascular stability via S1PR1 and N-cadherin expressions. *Blood*. 2012;119(22):5320-8.
103. Sitaram RT, Mallikarjuna P, Landström M, Ljungberg B. Transforming growth factor- β promotes aggressiveness and invasion of clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(24):35917-31.
104. Boguslawska J, Kryst P, Poletajew S, Piekliko-Witkowska A. TGF- β and microRNA Interplay in Genitourinary Cancers. *Cells*. 2019;8(12).
105. Turcotte S, Sutphin PD, Giaccia AJ. Targeted therapy for the loss of von Hippel-Lindau in renal cell carcinoma: a novel molecule that induces autophagic cell death. *Autophagy*. 2008;4(7):944-6.

106. Metheny-Barlow LJ, Li LY. The enigmatic role of angiopoietin-1 in tumor angiogenesis. *Cell Res.* 2003;13(5):309-17.
107. Michael IP, Orebrand M, Lima M, Pereira B, Volpert O, Quaggin SE, et al. Angiopoietin-1 deficiency increases tumor metastasis in mice. *BMC Cancer.* 2017;17(1):539.
108. Elbanna M, Orillion AR, Damayanti NP, Adelaiye-Ogala R, Shen L, Miles KM, et al. Dual Inhibition of Angiopoietin-TIE2 and MET Alters the Tumor Microenvironment and Prolongs Survival in a Metastatic Model of Renal Cell Carcinoma. *Mol Cancer Ther.* 2020;19(1):147-56.
109. Nong B, Su T, Jin M, Huang J, Huang A, Fang D, et al. Immune-related gene ANGPT1 is an adverse biomarker for endometrial carcinoma. *Transl Cancer Res.* 2021;10(6):2962-76.
110. Lin JZ, Meng LL, Li YZ, Chen SX, Xu JL, Tang YJ, et al. Importance of activated hepatic stellate cells and angiopoietin-1 in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Mol Med Rep.* 2016;14(2):1721-5.
111. Grenga I, Kwilas AR, Donahue RN, Farsaci B, Hodge JW. Inhibition of the angiopoietin/Tie2 axis induces immunogenic modulation, which sensitizes human tumor cells to immune attack. *J Immunother Cancer.* 2015;3:52.
112. Lara Jr PN, Tangen CM, Conlon SJ, Flanigan RC, Crawford ED. Predictors of survival of advanced renal cell carcinoma: long-term results from Southwest Oncology Group Trial S8949. *The Journal of urology.* 2009;181(2):512-7.
113. Hu B, Lara PN, Evans CP. Defining an individualized treatment strategy for metastatic renal cancer. *Urologic Clinics.* 2012;39(2):233-49.
114. Janzen NK, Kim HL, Figlin RA, Belldegrun AS. Surveillance after radical or partial nephrectomy for localized renal cell carcinoma and management of recurrent disease. *Urologic Clinics.* 2003;30(4):843-52.
115. Dabestani S, Thorstenson A, Lindblad P, Harmenberg U, Ljungberg B, Lundstam S. Renal cell carcinoma recurrences and metastases in primary non-metastatic patients: a population-based study. *World journal of urology.* 2016;34:1081-6.
116. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull.* 2017;7(3):339-48.
117. Catalano A, Iacopetta D, Ceramella J, Scumaci D, Giuzio F, Saturnino C, et al. Multidrug Resistance (MDR): A Widespread Phenomenon in Pharmacological Therapies. *Molecules.* 2022;27(3).
118. Jiang T, Zhu Z, Zhang J, Chen M, Chen S. Role of tumor-derived exosomes in metastasis, drug resistance and diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Front Oncol.* 2022;12:1066288.
119. Petejova N, Martinek A. Renal cell carcinoma: Review of etiology, pathophysiology and risk factors. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2016;160(2):183-94.
120. Gabr AH, Steinberg Z, Eggener SE, Stuart Wolf J, Jr. Indications for adrenalectomy during radical nephrectomy for renal cancer. *Arab J Urol.* 2014;12(4):304-8.
121. Thorlund MG, Wennevik GE, Andersen M, Andersen PE, Lund L. High success rate after arterial renal embolisation. *Dan Med J.* 2015;62(5).
122. Ball MW. Surgical management of metastatic renal cell carcinoma. *Discov Med.* 2017;23(129):379-87.

123. Graves A, Hessamodini H, Wong G, Lim WH. Metastatic renal cell carcinoma: update on epidemiology, genetics, and therapeutic modalities. *Immunotargets Ther.* 2013;2:73-90.
124. Rini BI, Campbell SC, Escudier B. Renal cell carcinoma. *Lancet.* 2009;373(9669):1119-32.
125. Ishibashi K, Koguchi T, Matsuoka K, Onagi A, Tanji R, Takinami-Honda R, et al. Interleukin-6 induces drug resistance in renal cell carcinoma. *Fukushima J Med Sci.* 2018;64(3):103-10.
126. Akaza H, Kawai K, Tsukamoto T, Fujioka T, Tomita Y, Kitamura T, et al. Successful outcomes using combination therapy of interleukin-2 and interferon-alpha for renal cell carcinoma patients with lung metastasis. *Jpn J Clin Oncol.* 2010;40(7):684-9.
127. Zarrabi KK, Handorf E, Miron B, Zibelman MR, Anari F, Ghatalia P, et al. Comparative Effectiveness of Front-Line Ipilimumab and Nivolumab or Axitinib and Pembrolizumab in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Oncologist.* 2023;28(2):157-64.
128. Ljungberg B, Albiges L, Abu-Ghanem Y, Bensalah K, Dabestani S, Fernández-Pello S, et al. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update. *Eur Urol.* 2019;75(5):799-810.
129. Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene.* 2000;19(49):5548-57.
130. Aparicio LMA, Fernandez IP, Cassinello J. Tyrosine kinase inhibitors reprogramming immunity in renal cell carcinoma: rethinking cancer immunotherapy. *Clin Transl Oncol.* 2017;19(10):1175-82.
131. Calvo E, Porta C, Grünwald V, Escudier B. The Current and Evolving Landscape of First-Line Treatments for Advanced Renal Cell Carcinoma. *Oncologist.* 2019;24(3):338-48.
132. Michaelis J, Grabbert M, Sigle A, Yilmaz M, Schlager D, Gratzke C, et al. Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Metastasised Renal Cell Carcinoma-Future or the Past? *Cancers (Basel).* 2022;14(15).
133. Sharma R, Kadife E, Myers M, Kannourakis G, Prithviraj P, Ahmed N. Determinants of resistance to VEGF-TKI and immune checkpoint inhibitors in metastatic renal cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2021;40(1):186.
134. Saharinen P, Eklund L, Alitalo K. Therapeutic targeting of the angiopoietin-TIE pathway. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(9):635-61.
135. Munárriz J, Reynés G, Sánchez-Lorenzo L, Esteban E, Basterretxea L, de Avila-Lizárraga L, et al. Sunitinib rechallenge in advanced renal cell carcinoma: outcomes of a multicenter retrospective study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019;84(4):781-9.
136. Nachbargauer S, Bruchbacher A, Fajkovic H, Remzi M, Schmidinger M. Sunitinib Rechallenge in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer.* 2020;18(3):e277-e83.
137. Zhou L, Liu XD, Sun M, Zhang X, German P, Bai S, et al. Targeting MET and AXL overcomes resistance to sunitinib therapy in renal cell carcinoma. *Oncogene.* 2016;35(21):2687-97.
138. Bersanelli M, Iacovelli R, Buti S, Houede N, Laguerre B, Procopio G, et al. Metastatic Renal Cell Carcinoma Rapidly Progressive to Sunitinib: What to Do Next? *Eur Urol Oncol.* 2021;4(2):274-81.

139. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356(2):115-24.
140. Rausch M, Weiss A, Achkhanian J, Rotari A, Nowak-Sliwinska P. Identification of low-dose multidrug combinations for sunitinib-naïve and pre-treated renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2020;123(4):556-67.
141. Greenberg JW, Kim H, Ahn M, Moustafa AA, Zhou H, Barata PC, et al. Combination of Tipifarnib and Sunitinib Overcomes Renal Cell Carcinoma Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors via Tumor-Derived Exosome and T Cell Modulation. *Cancers (Basel)*. 2022;14(4).
142. Tretter L, Patocs A, Chinopoulos C. Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1857(8):1086-101.
143. Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999;51(5):545-52.
144. Liu Y, Esen O, Pronk JT, van Gulik WM. Uncoupling growth and succinic acid production in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Biotechnol Bioeng*. 2021;118(4):1576-86.
145. Ryan DG, Murphy MP, Frezza C, Prag HA, Chouchani ET, O'Neill LA, et al. Coupling Krebs cycle metabolites to signalling in immunity and cancer. *Nat Metab*. 2019;1:16-33.
146. Moosavi B, Berry EA, Zhu XL, Yang WC, Yang GF. The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(20):4023-42.
147. Kancherla P, Daneshvar M, Sager RA, Mollapour M, Bratslavsky G. Fumarate hydratase as a therapeutic target in renal cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2020;24(9):923-36.
148. Neuzil J, Weber T, Gellert N, Weber C. Selective cancer cell killing by α -tocopheryl succinate. *Br J Cancer*. 2001;84(1):87-9.
149. Wei CW, Yu YL, Chen YH, Hung YT, Yiang GT. Anticancer effects of methotrexate in combination with α -tocopherol and α -tocopherol succinate on triple-negative breast cancer. *Oncol Rep*. 2019;41(3):2060-6.
150. Wu JY, Huang TW, Hsieh YT, Wang YF, Yen CC, Lee GL, et al. Cancer-Derived Succinate Promotes Macrophage Polarization and Cancer Metastasis via Succinate Receptor. *Mol Cell*. 2020;77(2):213-27.e5.
151. Abd-El Fattah AA, Darwish HA, Fathy N, Raafat A, Shouman SA. Promising antitumor effect of α -tocopheryl succinate in human colon and liver cancer cells. *Medicinal Chemistry Research*. 2012;21(10):2735-43.
152. Xia L, Zhang H, Wang X, Zhang X, Nie K. The Role of Succinic Acid Metabolism in Ovarian Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:769196.
153. Jung Y, Song JS, Ahn S. Pharmacokinetics and Tissue Distribution of (13)C-Labeled Succinic Acid in Mice. *Nutrients*. 2022;14(22).
154. Prag HA, Gruszczak AV, Huang MM, Beach TE, Young T, Tronci L, et al. Mechanism of succinate efflux upon reperfusion of the ischaemic heart. *Cardiovasc Res*. 2021;117(4):1188-201.
155. Zhang J, Wang YT, Miller JH, Day MM, Munger JC, Brookes PS. Accumulation of Succinate in Cardiac Ischemia Primarily Occurs via Canonical Krebs Cycle Activity. *Cell Rep*. 2018;23(9):2617-28.

156. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *Int J Mol Sci.* 2020;21(9).
157. Haibe Y, Kreidieh M, El Hajj H, Khalifeh I, Mukherji D, Temraz S, et al. Resistance Mechanisms to Anti-angiogenic Therapies in Cancer. *Front Oncol.* 2020;10:221.
158. Tsaur I, Thomas A, Taskiran E, Rutz J, Chun FK, Haferkamp A, et al. Concomitant Use of Sulforaphane Enhances Antitumor Efficacy of Sunitinib in Renal Cell Carcinoma In Vitro. *Cancers (Basel).* 2022;14(19).
159. Hwang HJ, Hong SH, Moon HS, Yoon YE, Park SY. Ginsenoside Rh2 sensitizes the anti-cancer effects of sunitinib by inducing cell cycle arrest in renal cell carcinoma. *Sci Rep.* 2022;12(1):19752.
160. El-Demiry SM, El-Yamany M, El-Gendy SM, Salem HA, Saber MM. Necroptosis modulation by cisplatin and sunitinib in hepatocellular carcinoma cell line. *Life Sciences.* 2022;301:120594.
161. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(8):592-603.
162. Ohga N, Ishikawa S, Maishi N, Akiyama K, Hida Y, Kawamoto T, et al. Heterogeneity of tumor endothelial cells: comparison between tumor endothelial cells isolated from high- and low-metastatic tumors. *Am J Pathol.* 2012;180(3):1294-307.
163. Kamli H, Owens EP, Vesey DA, Prasanna R, Li L, Gobe GC, et al. Overcoming sunitinib resistance with tocilizumab in renal cell carcinoma: Discordance between in vitro and in vivo effects. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022;586:42-8.
164. Dufies M, Giuliano S, Ambrosetti D, Claren A, Ndiaye PD, Mastri M, et al. Sunitinib Stimulates Expression of VEGFC by Tumor Cells and Promotes Lymphangiogenesis in Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *Cancer Res.* 2017;77(5):1212-26.
165. Fujimoto J, Toyoki H, Sato E, Sakaguchi H, Tamaya T. Clinical implication of expression of vascular endothelial growth factor-C in metastatic lymph nodes of uterine cervical cancers. *Br J Cancer.* 2004;91(3):466-9.
166. Liu DS, Zhang XJ, Chen G, Lu CF, Dong HY. [Expression of platelet-derived growth factor receptor α and its ligand PDGF- A in breast cancer]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 2011;27(3):313-4, 6.
167. Donnem T, Al-Saad S, Al-Shibli K, Busund LT, Bremnes RM. Co-expression of PDGF-B and VEGFR-3 strongly correlates with lymph node metastasis and poor survival in non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2010;21(2):223-31.
168. Wierzbicki PM, Klacz J, Kotulak-Chrzaszcz A, Wronska A, Stanislawowski M, Rybarczyk A, et al. Prognostic significance of VHL, HIF1A, HIF2A, VEGFA and p53 expression in patients with clear-cell renal cell carcinoma treated with sunitinib as first-line treatment. *Int J Oncol.* 2019;55(2):371-90.
169. Sato H, Uzu M, Kashiba T, Suzuki R, Fujiwara T, Okuzawa H, et al. Sodium butyrate enhances the growth inhibitory effect of sunitinib in human renal cell carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2017;14(1):937-43.
170. Sánchez-Elsner T, Botella LM, Velasco B, Corbí A, Attisano L, Bernabéu C. Synergistic cooperation between hypoxia and transforming growth factor-beta pathways on human vascular endothelial growth factor gene expression. *J Biol Chem.* 2001;276(42):38527-35.
171. Itatani Y, Kawada K, Yamamoto T, Sakai Y. Resistance to Anti-Angiogenic Therapy in Cancer-Alterations to Anti-VEGF Pathway. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4).

172. Siemeister G, Weindel K, Mohrs K, Barleon B, Martiny-Baron G, Marmé D. Reversion of deregulated expression of vascular endothelial growth factor in human renal carcinoma cells by von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Cancer Res.* 1996;56(10):2299-301.
173. Duran CL, Borriello L, Karagiannis GS, Entenberg D, Oktay MH, Condeelis JS. Targeting Tie2 in the Tumor Microenvironment: From Angiogenesis to Dissemination. *Cancers (Basel).* 2021;13(22).
174. Dai J, Wan S, Zhou F, Myers RE, Guo X, Li B, et al. Genetic polymorphism in a VEGF-independent angiogenesis gene ANGPT1 and overall survival of colorectal cancer patients after surgical resection. *PLoS One.* 2012;7(4):e34758.
175. Tan S, Chen Y, Du S, Li W, Liu P, Zhao J, et al. TIE2-high cervical cancer cells promote tumor angiogenesis by upregulating TIE2 and VEGFR2 in endothelial cells. *Transl Oncol.* 2022;26:101539.
176. Huang H, Bhat A, Woodnutt G, Lappe R. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(8):575-85.



HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

SUNİTİNİB DİRENÇLİ BÖBREK KANSERİ HÜCRE SERİLERİNDE,
DİRENÇ YANITINDA ETKİLİ GEN EKSPRESYONLARININ,
SÜKSİNİK ASİT TEDAVİSİ SONRASI KARŞILAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 4	% 4	% 1	% 2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Haliç Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
4	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<% 1
5	freidok.uni-freiburg.de İnternet Kaynağı	<% 1
6	cdn.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	9lib.net İnternet Kaynağı	<% 1
8	lib.ugent.be İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Barış	Soyadı	Ertuğrul
Doğ.Yeri	Fatih / İstanbul	Doğ.Tar.	17.07.1990
Email	baris.ertugrul@istanbul.edu.tr	Uyruğu	T.C

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi	2023
Yük.Lis.	Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul Üniversitesi	2017
Lisans	Biyoloji, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi	2012
Lise	Bayrampaşa Anadolu Lisesi	2008

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi	Günümüz (2018-)
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	YDS Puanı	YÖKDİL Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	77,5	81,5
Almanca	Orta	Orta	Orta		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Ulsan M, Bireller S, **Ertugrul B**, Kasarci G, Atas MN, Aydemir L, Ergen A, Cakmakoglu B. What if amoxicillin/clavulanic acid reduces the cisplatin anticancer impact on oral cancer treatment? J Stomatol Oral Maxillofac Surg. 2023.
2. Bozaci Kilicoglu M, **Ertugrul B**, Kasarci G, Comoglu S, Aydemir L, Keles Turel MN, et al. How do the genetic variants of MMP 9 and TIMP 1 and vitamin D affect chronic rhinosinusitis with nasal polyposis? J Ist Faculty Med 2023;86(2):152-158.
3. Atas MN, **Ertugrul B**, Iplik ES, Cakmakoglu B, Ergen A. Betulinic acid may modulate autophagy in renal cell carcinoma cells. Bratisl Lek Listy. 2023;124(2):104-108.
4. Atas MN, **Ertugrul B**, Iplik ES, Cakmakoglu B, Ergen A. The Inhibitory Effect of Betulinic Acid on Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway in Renal Cell Carcinoma. Medical Oncology 2022;39 (11), 170.
5. Iyibozkurt AC, **Ertugrul B**, Iplik ES, Cakmakoglu B. NF-κB and COX-2 Relation Between Endometrial Cancer and the Clinicopathological Parameters. Clin Exp Health Sci 2022; 12: 1025-1031.
6. Atas MN, **Ertugrul B**, Iplik ES, Cakmakoglu B, Ergen A. Effects of betulinic acid on AKT/mTOR pathway in renal cell carcinoma. Turkish Journal of Urology. 2022.
7. Kasarci G, **Ertugrul B**, Iplik ES, Cakmakoglu B. The apoptotic efficacy of succinic acid on renal cancer cell lines. Medical Oncology. 2021;38(12):1-8.
8. **Ertugrul B**, Iplik ES, Cakmakoglu B. In Vitro Inhibitory Effect of Succinic Acid on T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines. Archives of Medical Research. 2021;52(3):270-6.
9. Aydemir L, Iplik ES, **Ertugrul B**, Kasarci G, Atas MN, Ulsan M, et al. Levofloxacin might be safe to use for OSCC patients. Medical Oncology. 2021;38(8):1-8.
10. Aslan BT, **Ertugrul B**, Iplik ES, Cakmakoglu B. Apoptotic effects of acacetin in human colon cancer HT-29 and HCT 116 cells. Journal of Cancer Research and Therapeutics. 2021;17(6):1479.
11. Iplik ES, **Ertugrul B**, Ergen HA, Cakmakoglu B, Özçınar B. Galectin-3 Expression in Thyroid Papillary Cancer. 2020.
12. Ergen A, Iplik ES, **Ertugrul B**, Atas MN, Kasarci G, Cakmakoglu B. Examination of the apoptotic effects of betulinic acid on renal cancer cell lines. Marmara Medical Journal. 2020;33(3):113-8.

13. Summakoglu D, **Ertugrul B**. Şizofreni ve tedavisi. Lectio Scientific. 2018;2(1):43-61.
14. İplik ES, Kahraman R, **Ertugrul B**, Candan G, Ergen A, Çakmakoglu B. The role of COX-2 gene variants on the disease mechanism of inflammatory bowel disease in a Turkish population. Archives of Clinical and Experimental Medicine. 2018;3(2):45-8.
15. İplik ES, **Ertugrul B**, Kozanoglu I, Baran Y, Cakmakoglu B. An answer to colon cancer treatment by mesenchymal stem cell originated from adipose tissue. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2018;21(5):465.
16. İplik ES, **Ertugrul B**, Candan G, Pamuk S, Aydemir L, Celik M, et al. ROS related enzyme levels and its association to molecular signaling pathway in the development of head and neck cancer. 2018.
17. Çatmakaş T, **Ertugrul B**, İplik ES, Çakmakoglu B. Hesperidin triggering apoptosis on neuroblastoma cell. Archives of Clinical and Experimental Medicine. 2018;3(3):123-6.
18. Avci H, Ergen A, Bireller ES, **Ertugrul B**, Cakmakoglu B. A strong relationship between oral squamous cell carcinoma and DNA repair genes. Biochemical genetics. 2017;55(5):378-86.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Müzik, basketbol, sinema.