



T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**CİSPLATİN DİRENÇLİ CALU-1 AKCİĞER KANSERİ HÜCRE  
SERİSİ'NDE RESVERATROL'ÜN GRP78 ÜZERİNDEKİ  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Yüksek Lisans Tezi**

Cansu ÇANKAYA

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir  
2023

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**CİSPLATİN DİRENÇLİ CALU-1 AKCİĞER KANSERİ HÜCRE  
SERİSİ'NDE RESVERATROL'ÜN GRP78 ÜZERİNDEKİ  
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Cansu ÇANKAYA

Danışman(lar)  
Doç. Dr. Fatma Zuhale EROĞLU

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir  
2023

## Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

**Başkan** : Doç. Dr. F. Zuhale EROĞLU .....

(Danışman)

**Üye** : Prof.Dr. Cumhur GÜNDÜZ .....

**Üye** : Prof.Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNAL .....

**Üye** : Prof.Dr. ....

**Üye** : Prof.Dr. ....

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiğı tarih: **02.08.2023**

## Önsöz

Bilime olan ilgim 6 yaşındayken başladı. O zamanlar bilim insanı olmak en büyük hayalimdi. Lise döneminde biyoloji öğretmeniminde etkisiyle bu ilgim daha da harmanlandı. 2015-2019 yılları arasında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi'nde Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde lisansımı tamamladıktan sonra 2020 yılında Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans hayatıma başladım. En başta çok kıymetli danışman hocam Doç.Dr.F. Zuhale EROĞLU, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Bölüm başkanı Prof.Dr. Cumhur GÜNDÜZ ve bölümde bulunan saygıdeğer hocalarımdan aldığım eğitim ve desteğin etkisiyle verimli bir yüksek lisans eğitim hayatım oldu. Bu güzel serüvende ihtiyacım olan her an da benden yardımlarını esirgemeyen sevgili bölüm arkadaşlarımdan katkıları da oldukça fazlaydı.

Yapmış olduğumuz bu tez çalışması ile Dünya'da ve Türkiye'de her yıl artış gösteren ve ölümle sonuçlanan kanser türlerinin başında gelen akciğer kanserinde umut vaat edecek yeni bir tedavi yönteminin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kanser tedavisinde önemli çokça kullanılan kemoterapi yönteminde kullanılan en popüler etken maddelerden biri olan Cisplatin'e karşı direnç kazanmış küçük hücreli akciğer kanseri hücre hattı Calu-1 ve GRP78 gen ekspresyonu üzerinde, son yıllarda birçok kanser türünün çoklu ilaç direnci tedavisinde olumlu etkileri olan Resveratrol'un etkileri değerlendirilmiş ve literatürde daha önce bir benzeri olmayan bu tez çalışmasının sonraki literatür çalışmalarına referans olması umulmaktadır.

İzmir, 7.09.2023

Cansu ÇANKAYA

## Özet

### **Cisplatin Dirençli Calu-1Akciğer Kanseri Hücre Serisi'nde Resveratrol'ün Grp78 Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması**

Akciğer kanseri, dünyada en sık teşhis edilen ve kansere bağlı ölümlerin en fazla olduğu kanser türüdür. Akciğer kanserinin prognozu diğer kanser türlerine nispeten kötüdür ve hastaların yaklaşık %75'ine ileri evrelerde teşhis konulabilmektedir. Akciğer kanserinin nedenlerinin başında % 90'luk bir oranla sigara ve tütün ürünlerinin kullanımı gelmekte %10'luk kısım da ise radon gazı, asbest, hava kirliliğine maruz kalma ve kronik enfeksiyonlar gibi etmenler neden olabilmektedir. Tüm bunların yanında akciğer kanseri kalıtsal olarak da aktarılabilen bir kanser türüdür. Akciğer kanseri farklı şekillerde büyüyüp yayılan iki histolojik sınıfa ayrılır. Bunlar; Küçük Hücreli Akciğer Karsinomları (KHAK) ve Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Karsinomları (KHOAK) dır. Akciğer kanserinin tedavisinde hastalığın evrelerine göre farklı tedavi şekilleri uygulanmaktadır. Bunlar, radyasyon, cerrahi, kemoterapi tedavisi veya hedefe yönelik yapılan tedavilerdir. Akciğer kanserinde kemoterapi tedavisinde en sık kullanılan ilaçlardan biri Cisplatin'dir. Cisplatin, Cisplatin veya cis-diamindikloroplatin (II) olarak bilinen platin bazlı bir antikanser ilacıdır. Cisplatin akciğer kanserinin yanı sıra mesane, baş ve boyun kanseri ve testis kanseri gibi pek çok farklı kanserin tedavisinde de kullanılmaktadır. Cisplatin kullanımı oldukça yaygın olmasına karşın tedavinin ilerleyen süreçlerinde hastalarda direnç gelişebilmesi tedavinin sınırlanabilmesine neden olabilmektedir. Son dönemlerde yapılan çalışmalar ER stresi markerı olan Glikoz Düzenlemeli Protein 78 (GRP78)'in ilaç direnci üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Cisplatin direnç gelişiminin altında yatan mekanizmanın aydınlatılması tedavi süreci açısından oldukça önemlidir ve bu mekanizmanın aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkisel etken maddelerin kanser tedavisinde kullanımı her geçen gün artmaktadır. Bu etken maddelerden biri olan Resveratrol'ün cisplatin direnci gelişmiş akciğer kanser hücreleri üzerindeki etkisi tam olarak bilinmemektedir. Yaptığımız bu çalışmada, Resvaratrol'ün Cisplatin'e dirençli ve duyarlı Calu-1 hücreleri üzerindeki etkileri sitotoksisite çalışması ile ve ayrıca bu hücre hatlarında GRP78 şaperon proteinleri üzerindeki etkileri QPCR ve apoptoz çalışmaları ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Resvaratrol'ün Cisplatin direnç gelişimini üzerindeki etkisinin ne

olduğu ve GRP78 gen ekspresyonuna etkileri neticesinde yeni bir tedavi yaklaşımına katkı sağlayıp sağlayamayacağı irdelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler;** Akciğer Kanseri, Calu-1 hücree serisi, Cisplatin, Resveratrol, Grp78, ER Stresi



## **Abstract**

### **Investigation of the Effects of Resveratrol on Grp78 in the Cisplatin-Resistant Calu-1 Lung Cancer Cell Line**

Lung cancer is the most frequently diagnosed type of cancer in the world and has the highest number of cancer-related deaths. The prognosis of lung cancer is relatively poor compared to other types of cancer, and approximately 75% of patients can be diagnosed in advanced stages. The leading cause of lung cancer is the use of cigarettes and tobacco products with a rate of 90%, while the other 10% may be caused by factors such as radon gas, asbestos, exposure to air pollution and chronic infections. In addition to all these, lung cancer is a type of cancer that can be inherited. Lung cancer is divided into two histological classes, which grow and spread in different ways. These; Small Cell Lung Carcinomas (SCLC) and Non-Small Cell Lung Carcinomas (NCLC). In the treatment of lung cancer, different treatment modalities are applied according to the homes of the disease. These are radiation, surgery, chemotherapy treatment or targeted therapies. Cisplatin is one of the most commonly used drugs in chemotherapy treatment in lung cancer. Cisplatin is a platinum-based anticancer drug known as Cisplatin or cis-diaminedichloroplatin (II). In addition to lung cancer, cisplatin is also used in the treatment of many different cancers such as bladder, head and neck cancer, and testicular cancer. Although the use of cisplatin is quite common, the development of resistance in the patients in the later stages of the treatment may cause the treatment to be limited. Recent studies show that the ER stress marker, Glucose Regulated Protein 78 (GRP78), is effective on drug resistance. The elucidation of the mechanism underlying the development of cisplatin resistance is very important for the treatment process and more studies are needed to elucidate this mechanism. The use of herbal active substances in cancer treatment is increasing day by day. The effect of Resveratrol, one of these active ingredients, on cisplatin-resistant lung cancer cells is not fully known. In this study, the effects of Resvaratrol on Cisplatin-resistant and sensitive Calu-1 cells were investigated by cytotoxicity study, and also its effects on GRP78 chaperone proteins in these cell lines were investigated by QPCR and apoptosis studies. According to the results obtained, the effect of Resveratrol on the development of Cisplatin resistance and whether it can contribute to a new treatment approach due to its effects on GRP78 gene expression has been examined.

**Keywords;** Lung Cancer, Calu-1 cell line, Cisplatin, Resveratrol, Grp78, ER Stress





## İçindekiler

|                                                            |     |
|------------------------------------------------------------|-----|
| Önsöz .....                                                | II  |
| Özet.....                                                  | III |
| Abstract.....                                              | V   |
| İçindekiler .....                                          | VII |
| Tablolar Dizini.....                                       | IX  |
| Şekiller Dizini .....                                      | X   |
| Grafikler Dizini .....                                     | XI  |
| Kısaltma Listesi .....                                     | XII |
| 1.Giriş .....                                              | 1   |
| 1.1. Araştırmanın Problemi.....                            | 1   |
| 1.2. Araştırmanın Hipotezleri .....                        | 2   |
| 1.3. Araştırmanın Varsayımları.....                        | 3   |
| 1.4. Araştırmanın Sınırlılıkları .....                     | 3   |
| 1.5. Araştırmanın Amacı .....                              | 4   |
| 2.Genel Bilgiler .....                                     | 5   |
| 2.1. Akciğerin Yapısı ve Fonksiyonları.....                | 5   |
| 2.2.Akciğer Kanseri.....                                   | 5   |
| 2.2.1. Patogenez .....                                     | 5   |
| 2.2.2. Tanı, Evreleme ve Tedavi .....                      | 6   |
| 2.3. GRP78 .....                                           | 7   |
| 2.3.1. GRP78'in Akciğer Kanseriyle İlişkisi .....          | 7   |
| 2.4. Cisplatin .....                                       | 8   |
| 2.5. Resveratrol.....                                      | 8   |
| 3.Gereç ve Yöntem .....                                    | 10  |
| 3.1. Hücrelerin Temin Edilmesi .....                       | 10  |
| 3.2. Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi .....       | 10  |
| 3.3. Hücre Kültürü .....                                   | 11  |
| 3.4. Hücrelerin Pasajlanması .....                         | 12  |
| 3.5. Hücrelerin Dondurulması ( Kriyoprezervasyon ).....    | 12  |
| 3.6. Calu-1 Hücrelerine Cisplatin Direnci Kazandırma ..... | 13  |
| 3.7. Hücre Proliferasyon Deneyi .....                      | 13  |
| 3.8. Sitotoksite Deneyi .....                              | 13  |

|                                                                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.9. Apoptoz .....                                                                                                                                                                             | 15 |
| 3.10. RNA İzolasyonu.....                                                                                                                                                                      | 16 |
| 3.11. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi .....                                                                                                                                                    | 18 |
| 3.12. qPCR Analizi .....                                                                                                                                                                       | 18 |
| 4.Bulgular.....                                                                                                                                                                                | 22 |
| 4.1. Proliferasyon Deneyi.....                                                                                                                                                                 | 22 |
| 4.2. Sitotoksosite Deneyi-1 ( Cisplatin'in Duyarlı Ve Dirençli Calu-1Hücre Hattı Canlılığı Üzerindeki Etkisinin -IC <sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi. ).....                               | 22 |
| 4.3. Sitotoksosite Deneyi-2 ( Resveratrol'ün Duyarlı Calu-1 Ve Dirençli Calu-1Hücre Hattındaki Hücrelerin Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Yani IC <sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi. ) ..... | 24 |
| 4.5. Resveratrol'ün GRP78 mRNA Ekspresyonu Üzerindeki Etkisinin Analizi .....                                                                                                                  | 27 |
| 5.Tartışma .....                                                                                                                                                                               | 30 |
| Sonuç ve Öneriler .....                                                                                                                                                                        | 37 |
| Kaynaklar .....                                                                                                                                                                                | 38 |
| Ekler .....                                                                                                                                                                                    | 45 |
| Teşekkür .....                                                                                                                                                                                 | 46 |
| Özgeçmiş .....                                                                                                                                                                                 | 47 |

## Tablolar Dizini

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1:</b> cDNA sentezi mixi için kullanılan reaktifler ve miktarları.....                                                           | 18 |
| <b>Tablo 2:</b> qPCR reaksiyon mixi .....                                                                                                 | 20 |
| <b>Tablo 3:</b> 96'lık platte kuyucuklara konulan örnekler.....                                                                           | 20 |
| <b>Tablo 4:</b> GRP78 ve GAPDH genlerinin primerlerinin baz dizilimi ve bp sayıları.                                                      | 21 |
| <b>Tablo 5:</b> Duyarlı ve dirençli Calu-1 hücre hatlarında GRP78 ve GAPDH'ın elde edilen Cp değerleri.....                               | 28 |
| <b>Tablo 6:</b> Duyarlı Calu-1 ve dirençli Calu-1 hücre hattında hedef genin housekeeping gene oranıyla bulunan ekspresyon değerleri..... | 29 |



## Şekiller Dizini

|                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1: GRP78'in genel yapısı.....                                                                                                                      | 2  |
| Şekil 2: Calu-1 hücre serisi mikroskop görüntüsü.....                                                                                                    | 10 |
| Şekil 3: Neubauer Hemositometresi.....                                                                                                                   | 11 |
| Şekil 4: WST-1 testinin çalışma prensibi.....                                                                                                            | 14 |
| Şekil 5: Annexin V yönteminin hücreler üzerindeki apoptotik etkisi..                                                                                     | 15 |
| Şekil 6: Resveratrol'ün belirlenen IC <sub>50</sub> değerlerinin duyarlı Calu-1 hücre hattına 48. saatteki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları.....  | 26 |
| Şekil 7: Resveratrol'ün belirlenen IC <sub>50</sub> değerlerinin dirençli Calu-1 hücre hattına 48. saatteki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları..... | 27 |



## Grafikler Dizini

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Grafik 1:</b> Duyarlı Calu-1 hücre hattı Cisplatin etken maddeli sitotoksisite deneyi analiz sonucu ( $IC_{50}$ değeri).....    | 23 |
| <b>Grafik 2:</b> Dirençli Calu-1 hücre hattı Cisplatin etken maddeli sitotoksisite deneyi analiz sonucu ( $IC_{50}$ değeri).....   | 23 |
| <b>Grafik 3:</b> Duyarlı Calu-1 hücre hattı Resveratrol etken maddeli sitotoksisite deneyi analiz sonucu ( $IC_{50}$ değeri).....  | 25 |
| <b>Grafik 4:</b> Dirençli Calu-1 hücre hattı Resveratrol etken maddeli sitotoksisite deneyi analiz sonucu ( $IC_{50}$ değeri)..... | 25 |



## Kısaltma Listesi

|        |                                                             |
|--------|-------------------------------------------------------------|
| GRP78: | Glikoz Düzenlemeli protein                                  |
| ER:    | Endoplazmik Retikulum                                       |
| UPR:   | Unfolded protein response                                   |
| ATP:   | Adenozin trifosfat                                          |
| ABD:   | ATP Bağlama Alanı                                           |
| NDB:   | Nükleotid Bağlama Alanı                                     |
| SBD:   | Subsrat Bağlama Alanı                                       |
| WHO:   | World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)             |
| KHAK:  | Küçük Hücreli Akciğer Kanseri                               |
| KHDAK: | Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri                          |
| BT:    | Bilgisayarlı Tomografi                                      |
| PET:   | Pozitron Emisyon Tomografisi                                |
| ERST:  | Endoplazmik Retikulum Stres Toleransı                       |
| DNA:   | Deoksiribo Nükleik Asit                                     |
| FBS:   | Fetal Bovine Serum                                          |
| DMEM:  | Dulbecco's Modified Medium                                  |
| EDTA:  | Etilendiamin Tetraasetik Asit                               |
| DMSO:  | Dimetil Sülfoksit                                           |
| WST-1: | Water-Soluble Tetrazolium-1                                 |
| MTT:   | 3-(4,5- dimetilyazol-2-il)-2-5 difeniltetrazolyum<br>bromür |
| PS:    | Fosfotidilserin                                             |
| PI:    | Propidyum İyodür                                            |
| PBS:   | Phosphate Buffered Salline (Fosfat Tamponlu<br>Salin)       |

qPCR: Gerçek Zamanlı PCR

GAPDH: Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz



## 1.Giriş

### 1.1. Araştırmanın Problemi

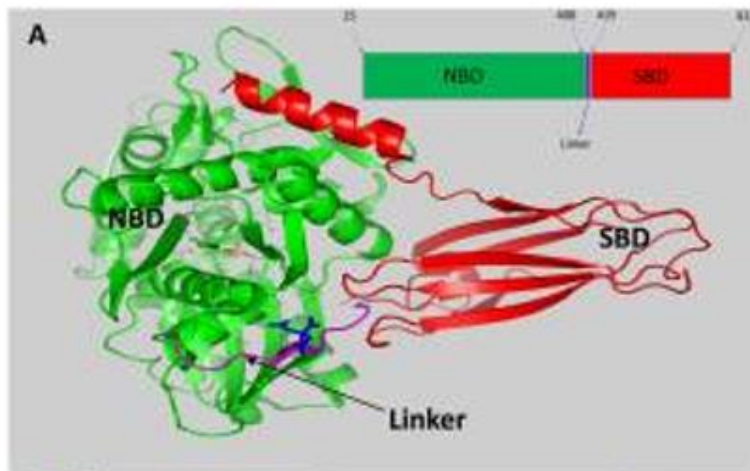
Akciğer kanseri, dünyada en sık teşhis edilen ve kansere bağlı ölümlerin en sık yaşandığı kanser türüdür. Erkeklerde ölüme sebep olan kanser türlerinde birinci sırada yer alırken, kadınlarda meme kanserinde sonra ikinci sırada yer almaktadır. 2018 yılında yapılan araştırmalara göre akciğer kanserinin dünya çapında 1.8 milyondan fazla kişinin ölümüne neden olduğu ve toplam 5 yıllık sağkalım oranının da yaklaşık % 19 olduğu belirtilmektedir. Akciğer kanseri teşhisi konulan hastalarda hayatta kalma oranı çoğunlukla hastalığın erken tanısı ve tedavisine bağlıdır. Birçok kanser türünde olduğu gibi akciğer kanserinde de tedavi esnasında kanserli hücrelerde, Cisplatin'e karşı direncin gelişmesi tedaviyi olumsuz etkileyen nedenlerin başında gelmektedir. Akciğer kanserinde ilaç direncinin oluşumunda GRP78 ve GRP78 ilişkili katlanmamış protein yanıtı ( UPR=Unfolded protein response ) önemli bir role sahip olduğu belirtilmektedir. GRP78, endoplazmik retikulum'da (ER) moleküler bir şaperon görevi gören sinyal peptit dizisine sahip bir proteindir. GRP78, ER üzerindeki ribozomlardan sentezlenen proteinlerin uygun şekilde katlanması ve yanlış katlanmış proteinlerin proteazomlara yönlendirilmesinde, ER'de kalsiyum depolanması ve UPR sinyal yolağında görev alan moleküllerin aktivasyonunda rol oynamaktadır. Hücrede çeşitli nedenlerle ER stresi oluştuğunda aktive edilmiş GRP78 proteini katlanmamış protein yanıtını (UPR) devreye sokarak hücrenin homeostazının korunması ve yanlış katlanan proteinlerin doğru katlanmaya yönlendirilmesi ve stress ortadan kaldırılamadığında hücrenin apoptoza yönlendirilmesinde rol alabilmektedir. GRP78'in akciğer kanserinde aşırı ifade edilmesi tümör hücre proliferasyonu,metastaz oluşumu, ilaç direncinin gelişmesi gibi olaylarda rol alabilmektedir.

Son yıllarda, tümör gelişiminde GRP78 ve GRP78 ilişkili katlanmamış protein yanıtının ( UPR ) öneminin anlaşılması, bilim insanlarını kanser hücrelerinin yaşadığı kronik ER stresine ilişkin yeni anlayışlar ve potansiyel terapötik hedeflerin araştırılmasına teşvik etmektedir. Resveratrol, meme, kolorektal, karaciğer, pankreas ve prostat kanserleri üzerinde in vivo olarak uygulanmış ve olumlu etkileri olduğu gözlemlenmiştir. Resveratrol'ün birçok kanser türünde bu denli olumlu neticeler vermesi akciğer kanseri içinde umut verici bir tedavi seçeneği olabileceğini düşündürmektedir



## 1.2. Araştırmanın Hipotezleri

Glikoz Düzenlemeli Protein 78 (GRP78), son yıllarda yoğun bir şekilde çalışılan bir şaperon ısı şoku proteinidir. GRP78, Amino terminalde ATP bağlama alanı ( ABD ) ya da nükleotid bağlama alanı ( NBD ) olarak adlandırılan ve karboksil terminalinde substrat bağlanma alanı ( SBD ) olarak adlandırılan ve **Şekil 1**'de de gösterildiği gibi iki bölgeden oluşmaktadır.



**Şekil 1. A)** 1.67 Å çözünürlükte GRP78 çözölmüş yapının (PDB ID 6EOC) x-ışını apo formunu gösterir. Yeşil renkli kısım (NBD), kırmızı (SBD) ve mor (bağlayıcı) ile temsil edilir. GRP78 dizisi de protein alanlarıyla aynı renkle temsil edilir.

Normal hücrelerde GRP78, ER lümeninde bulunan proteinlerin katlanmasını destekleyen, proteinlerin kalitesini kontrol eden ve  $Ca^{+2}$  yoluyla ER stres sinyalini düzenleyen moleküler bir şaperon proteinidir. Fakat tümör hücrelerinde GRP78 ve GRP78 ilişkili protein yanıtı ( UPR ) bu görevlerini olumsuz yönde kullanarak kanser hücrelerinin çoğalmasına neden olabilmektedir. UPR, tümör hücrelerinin aşırı ekspresyonuna sebep olarak bu hücrelerin hızlı bir şekilde çoğalmasına olanak sağlayabilmektedir. Ana UPR düzenleyici protein olarak GRP78, çeşitli tümör hücrelerinde yüksek oranda eksprese edilmektedir. GRP78, birçok kanser türündeki hücreler de olduğu gibi akciğer tümör hücrelerinde de kemoterapi direnci ile birlikte tümörijeniz, apoptoz, otofaji, istila ve metastaz dahil olmak üzere tümör biyolojisinin çeşitli aşamalarında rol alabilmektedir.

Resverstrol'ün çeşitli kanser türleri ile yapılan in vivo çalışmalar sonucunda olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Resveratrol'ün bu kadar etkili bir etken madde olması çalışmamızın hipotezi olan Cisplatin dirençli akciğer kanser hücrelerinde direnç değişimi üzerinde ve GRP78 gen ekspresyonunu baskılamada etkili olabileceği ihtimalini bizlere düşündürmüştü ve bu nedenle bu araştırma planlanmıştır.

### **1.3. Araştırmanın Varsayımları**

Cisplatin'e dirençli Calu-1 hücre hattında Resveratrol'ün hücreler üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla Cisplatin'e karşı duyarlı ve dirençli Calu-1 hücreleri kullanılmıştır. Calu-1 hücrelerine belirli dozlarda Cisplatin uygulanarak Cisplatin'e karşı direnç kazandırılmış, ardından bu duyarlı ve dirençli hücrelere belirli dozlarda Resveratrol uygulanarak sitotoksikite, apoptoz deneyleri gerçekleştirilmiş ve ayrıca GRP78 gen ekspresyonu üzerindeki etkisi saptanarak KHDAK hücreleri için yeni bir tedavi seçeneği olabilirliği araştırılmıştır.

### **1.4. Araştırmanın Sınırlılıkları**

Araştırmamızın hasta serumu veya doku örneğinden direkt olarak elde edilen hücreler ile in vivo olarak yapılan bir çalışma olmaması, laboratuvar ortamında üretilmiş bir hücre hattının hücre kültüründe çalışılıyor olması, proje bütçesinin yeterli olmaması sebebiyle yapılan işlemlerin sınırlı tutulması, hücreleri çözme, pasajlama veya dondurma esnasında hücre morfolojisinde değişikliklerin oluşabilmesi ve tüm bunlara ek olarak hücrelerin flaks içinde etüvde saklandığı sırada kontaminasyona maruz kalabilme riskinin mevcut olması araştırmamızın sınırlılıklarını oluşturan etkenlerdir.

### 1.5. Araştırmanın Amacı

Dünyada en sık rastlanan ve kansere bağlı ölümlerin başında gelen akciğer kanseri her yıl milyonlarca insanın sağlığını tehdit etmekte ve yaşam kalitelerini olumsuz yönde etkilemektedir. Birçok kanser türünde olduğu gibi akciğer kanserinin tedavisinde de kemoterapi yöntemi uygulanmaktadır. Yapılan tedaviler sonucunda birçok hastada kemoterapide kullanılan Cisplatin isimli ilaca karşı kanserli hücrelerinin direnç kazandığı ve kemoterapi tedavisinin olumsuz sonuçlandığı, hücrelerin çoğalmaya devam ettiği gözlemlenmektedir. Yapacağımız bu tez çalışmasının amacı; çeşitli kanser türlerinde olumlu etkileri gözlemlenmiş antioksidan özelliğe sahip ve doğal fitoaleksine olan Resveratrol'un Cisplatin dirençli ve duyarlı hücrelere uygulanması sonucunda direnç gelişimi ve ER stresinde önemli rolü olan GRP78'in gen ifadesinde ne tür değişiklikler oluşturduğunun gözlenmesi ve daha ileri çalışmalarla Resveratrol'un tedavi amacıyla kullanılıp kullanılamayacağını irdelemektir.

## **2.Genel Bilgiler**

### **2.1. Akciğerin Yapısı ve Fonksiyonları**

Akciğer, göğüs boşluğunda, göğüs kafesinin içinde bulunan ve Plevra adı verilen koruyucu bir zarla çevrili solunum ve dolaşım sisteminde görevli bir organdır. Esnek ve süngerimsi bir yapısı vardır. Biri sağ diğeri solda olmak üzere iki adettir. Sağ akciğer 3 lob, sol akciğer ise 2 lobtan meydana gelmektedir. Sol akciğerin üçüncü lobunun yerinde kalp bulunmaktadır. Bu sebeple sağ akciğer sol akciğerden daha büyüktür. Akciğerin en önemli fonksiyonu dışarıdan aldığı hava içerisinde bulunan oksijenin alveollerin etrafında bulunan kılcal damarlar ile kana karışmasını ve ayrıca diğerk organlardan gelen kirli kanda bulunan karbondioksitin alveollerden dışarıya atılmasını sağlamaktır. Akciğer aynı zamanda boşaltım sistemi organı gibi işlev görmektedir. Örneğin; alkolün bir kısmı, anestezi maddeleri vb. solunum yoluyla dışarı atılır. Vücut pH'ının dengede tutulması da akciğerin bir diğerk fonksiyonudur. Akciğer, vücut sıvılarındaki karbondioksit miktarına göre solunum sayısını, derinliğini artırarak veya azaltarak vücudun asit-baz dengesini korumaktadır.

### **2.2.Akciğer Kanseri**

Akciğer kanseri, akciğer dokularındaki hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmasıyla oluşmaktadır. Bu kanser, dünyada en sık teşhis edilen kanser türü olmasının yanında kansere bağlı ölümlerin en sık yaşandığı kanser türüdür. Akciğer kanserinin prognozu diğerk kanser türlerine nispeten kötüdür ve hastaların yaklaşık %75'ine ileri evrelerde teşhis konulur. Akciğer kanserinin nedenlerinin başında %90'lık bir oranla sigara kullanımı ve tütün ürünlerinin kullanımı gelmektedir. Geriye kalan %10'luk kısım ise radon gazı, asbest, hava kirliliğine maruz kalma ve kronik enfeksiyonlar gibi akciğer karsinogenezine katkısı olan etmenlerdir. Tüm bunların yanında akciğer kanseri kalıtsal olarak da aktarılabilen bir kanser türüdür.

#### **2.2.1. Patogenez**

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) akciğer kanserini skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom, büyük hücreli karsinom ve küçük hücreli karsinom olmak üzere dört ana tipte tanımlamaktadır. Bu tümörler genellikle histolojik yapıları ve tedavilerindeki

farklılıklara göre ise iki gruba ayrılırlar: küçük hücreli karsinomlar (KHAK) ve küçük hücreli dışı karsinomlar (KHDAK). Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), tüm akciğer kanseri çeşitlerinin % 15'ini temsil etmektedir. Proliferatif hızı, kolay nüks ve erken metastaz özellikleri nedeniyle kötü prognoza sahiptir. Çoğunlukla tütün kullanımı sonucu oluşan türüdür. Son 50 yılda, 40 dan fazla faz 3 denemesi dahil çok sayıda klinik çalışma yapılmasına rağmen bu hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı % 7 'nin altındadır. Çoğu hasta tanıdan sonraki 1 yıl içerisinde hayatını kaybetmektedir. KHAK'nin kullanılan standart birinci basamak kemoterapik tedavisi etoposid ile kombine edilmiş Cisplatin veya Carboplatindir.

Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK), akciğer kanseri çeşitlerinin % 85'ini oluşturmaktadır ve üç ana türü bulunmaktadır:

**Adenokarsinom:** akciğer kanserlerinin % 40'ını oluşturmaktadır ve mukos salgılayan hücrelerin erken evresinde görülmektedir. Çoğunlukla sigara kullanan veya eskiden sigara kullanmış bireylerde görülse de hiç sigara kullanmamış kişilerde de en sık rastlanan türdür. Gençlerde ve kadınlarda görülme sıklığı daha fazladır. Adenokarsinom genellikle akciğerlerin dış bölümlerinde oluşan ve nispeten daha yavaş büyüyen bir türdür.

**Skumoz hücreli karsinom:** Akciğer kanserlerinin % 30'luk kısmını oluşturmaktadır. Skumöz hücreli akciğer tümörleri sıklıkla akciğerin orta kısmında veya sol veya sağ bronş gibi ana hava yolunda meydana gelir. Gelişim nedeni çoğunlukla sigara kullanımıyla ilişkilidir.

**Büyük hücreli karsinom:** Akciğer kanserlerinin % 15'lik kısmını kapsamaktadır. Akciğerlerin herhangi bir bölgesinde görülen türüdür. Hızlı yayılma ve büyümeye yatkındır, bu durum tedavisini güçleştirmektedir.

### 2.2.2. Tanı, Evreleme ve Tedavi

Akciğer kanserinde fiziki muayene ve tıbbi geçmişin yanı sıra yapılan bazı testler de tanı konmasına yardımcı olmaktadır. Bu testler: göğüs röntgeni, akciğer grafisi, bilgisayarlı tomografi (BT) taraması, pozitron emisyon tomografisi (PET) taraması, PET/BT taraması, kemik taraması, bronkoskopi, mediastinoskopidir. KHDAK yayılma durumuna göre I, II, IIIA-IIIB ve IV olmak üzere 5 evrede

değerlendirilmektedir. Erken evre olan I ve II. evrede hastalar cerrahi yöntemle tedavi edilebilmektedir. Bu durumda akciğerin hasarlı olan lobu veya loblarının bir kısmı ya da tamamının alınması söz konusudur. IIIA evresindeki hastalara cerrahi yöneme ek olarak ilaç tedavisi de uygulanırken, IIIB evresi ve IV. evre cerrahi yöntemlere uygun olmayan evreler olduğu için bu evrelerdeki hastalara kemoterapi ve radyoterapi yöntemleri uygulanmaktadır. IV. evre hastalarda iyileştirme mümkün olmadığından semptomları azaltmaya ve hastanın yaşam süresini birkaç ay daha uzatmaya yönelik tedaviler uygulanmaktadır.

### **2.3. GRP78**

Glukoz düzenleyici protein 78 (GRP78); ER bulunan, proteinlerin katlanmasında rol oynayan, oluşan proteinlerin kalitesini kontrol eden ve  $Ca^{+2}$  yardımıyla UPR sinyal yolağında yer alan proteinleri düzenleyen bir şaperondur.

GRP78 ekspresyonu, hücrenin şekerden kısıtlanması ve hücrenin glikosilasyonunu engelleyen reaktiflere maruz kalması, ER'den golgiye protein transportunun bozulması, ER lümeninde  $Ca$  un azalması gibi olaylar yanında mutasyon, radyasyon ve enfeksiyon gibi ER stresine neden olan durumlarda artmaktadır. GRP78 iki fonksiyonel alandan oluşur. Bunlar: Nükleotid bağlama alanı (NBD) ve substrat bağlama alanı (SBD) dır. NBD ATP'yi bağlayıp hidrolize etmekle, SBD ise polipeptitleri bağlamakla görevlidir. GRP78, son yirmi yılda yoğun olarak incelenen bir ısı şoku proteinidir. Normal hücrelerde GRP78, ER'deki katlanmamış proteinlerin veya yanlış katlanmış proteinlerin hücresel bozunma mekanizmaları sayesinde bozunmasında veya bu proteinlerin yeniden katlanmasında görevlidir. Kanser hücrelerinde GRP78 ekspresyon artışının kanser hücrelerinin çoğalmasına zemin hazırlayan bir faktör olduğu belirtilmektedir

#### **2.3.1. GRP78'in Akciğer Kanseriyle İlişkisi**

ER stresi, kanser hücrelerinin oluşumunun erken dönemlerinde GRP78 ve diğer şaperon proteinlerin ekspresyonlarının artışına neden olabilmektedir. Sağlıklı akciğer hücreleriyle karşılaştırıldığında, kanserli hücrelerde GRP78 mRNA ve protein

seviyelerinde bir artış gözlenmektedir. GRP78 ekspresyon seviyesindeki bu artışın akciğer kanserinin oluşumu ve farklılaşmasıyla ilişkili olduğu bildirilmektedir. Birçok hücre tipinde aşırı GRP78 ekspresyonu, apoptozu ve ER stresini azaltarak kanserli hücrelerin kemo-direncini arttırmaktadır. GRP78, akciğer kanseri hücrelerinde ER stres toleransının (ERST), Cisplatin tedavisi esnasında AKT sinyal kaskadının aktive edilmesine neden olarak, parental hücre dizilerine göre daha kolay hayatta kalmasını sağlayabilmektedir. GRP78 'in tümör biyolojisindeki kilit faktörlerden biri olması bilim insanlarına akciğer kanseri üzerinde önemli klinik etkileri olabileceğini düşündürmektedir; tümör tedavisinde hedef olarak kullanılabilmesi, klinikte yaygın olarak kullanılan ilaçların terapötik etkilerini arttırabilecek olması ve akciğer kanseri hastalarının prognozu ve değerlendirilmesinde bir biyobelirteç olarak kullanılabilirliği bunlardan bazılarıdır.

#### **2.4. Cisplatin**

Cisplatin ya da *cis*-diamindikloroplatin (II), testis, yumurtalık, akciğer, baş ve boyun, mesane , rahim ağzı ve melanom gibi birçok kanser türlerinin tedavisi için en uygun ve en yaygın olarak kullanılan platin bazlı bir kemoterapötik ilaçtır. Karsinomlar, sarkomlar, lenfomalar ve germ hücreli tümörlerde de etkilidir. Cisplatin, hızlı bir şekilde değişime uğrayarak aktif olmayan metabolitlerine dönüşebilen bir terapötik ajandır. Başlangıç plazma yarı ömrü 25-49 dakika, dağılım sonrası yarı ömrü ise 58-73 saattir. DNA çift zicirinde pürin bazlarıyla ( A, G ) çapraz bağlanma yapıp, DNA onarım mekanizmalarına etki ederek kanserli hücrelerde apoptozu indüklemektedir. Yan etkileri ( genç hastalarda ciddi böbrek sorunları, alerjik reaksiyonlar, enfeksiyonlara karşı bağışıklığın azalması, gastrointestinal bozukluklar, kanama, işitme vb. ) ve tümör hücrelerinin Cisplatin'e karşı oluşturduğu ilaç direnci gibi olumsuzluklar bu ilacın kullanımını ve etkisini sınırlayan etmenlerdir.

#### **2.5. Resveratrol**

Resveratrol, dut, yer fıstığı, ravent, ananas, çilek ve özellikle kırmızı üzümün kabuğu ve çekirdeğinde bolca bulunan polifenolik stilbenoiddir. Üzüm kabuğunda bulunan Resveratrol'un güçlü antioksidan özelliği, E vitamininden 50 kat, C vitamininden 30 kat daha fazladır. Diğer tüm fenolik bileşikler gibi antioksidan etkisine sahip

olduğundan reaktif oksijen tümörlerini temizlemektedir. DNA hasarına engel olmakta ve hücre membranında lipid peroksidasyonunu önlemektedir. İnflamasyon karşıtı etkisi ile doku hasarını ve hücrel proliferasyonu baskılamakta ve cild yapısını korumaktadır. Tüm bunların yanı sıra Resveratrol'ün, diyabet, obezite, nörodejeneratif rahatsızlıklar, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi kronik rahatsızlıkların önlenmesinde önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Resveratrol'ün, immün hücre düzenlenmesi, proinflamatuvar sitokinlerin sentezi ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol alarak bağışıklığı düzenlediği belirtilmektedir.

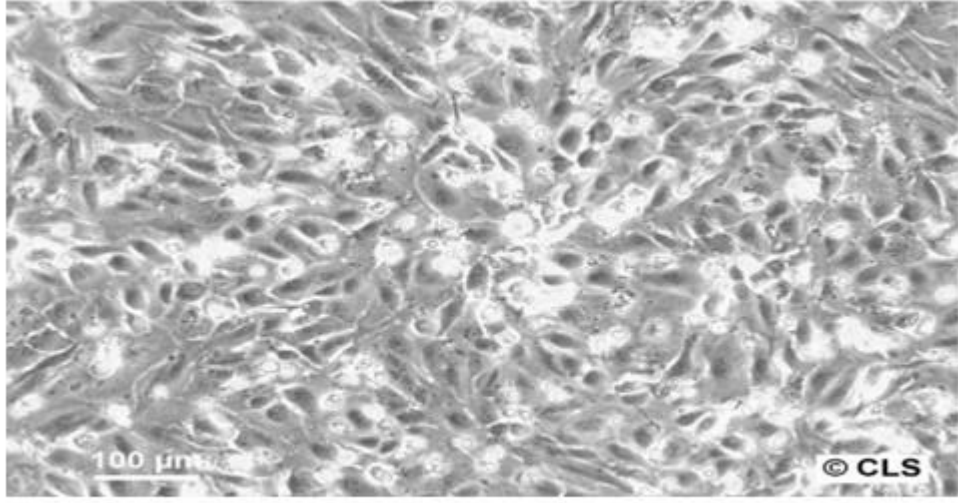




### 3.Gereç ve Yöntem

#### 3.1. Hücrelerin Temin Edilmesi

Bu tez çalışması için kullanacağımız akciğer hücre hattı olan Calu-1 hücre hattı bir in vitro hücre hattı olup, Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan stoktan teğmin edilmiştir. Calu-1 hücrelerinin mikroskop görüntüsü **Şekil 2** 'deki gibidir.



**Şekil 2 : Calu-1 hücre serisi mikroskop görüntüsü**

#### 3.2. Dondurulmuş Hücre Hatlarının Çözdürülmesi

Ege Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda -80°C de saklanan hücrelerin dondurulmuş haldeki hücrelerin çözdürülmesi için aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. Kriyotüpteki hücrelerin üzerine 1ml besiyer eklenip pipetaj yaparak hücrelerin ortam içerisinde çözünmesi sağlandı.
2. Çözünen hücreler 15'lik falkonun içine alındı, üzerine 9 ml daha besiyer eklendi ve 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj yapıldı.
3. Santrifüj sonrası tüpte oluşan süpernatant döküldü ve pelletin üzerine yeniden 10 ml besiyer eklenerek 1200 rpm'de 10 daha santrifüj işlemi tekrarlandı.

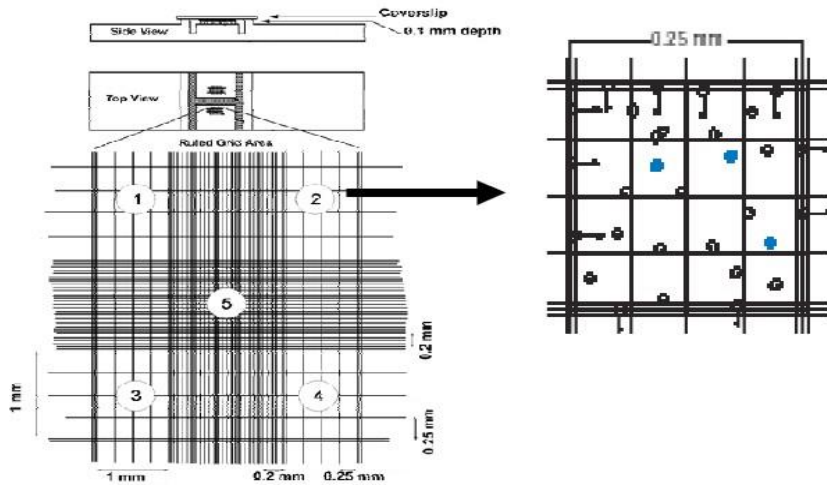
4. Santrifüj sonrası falkondaki süpernatant tekrar döküldü ve kalan pellet üzerine 1ml besiyer eklenerek pipetaj yapıldı , ardından 50 µl hücrelerin olduğu besiyerden alınıp üzerine 50 µl Tripan Mavisi eklendi ve bu karışım pipetajlandıktan sonra Neubauer Lamı ile sayılarak hücre canlılığı belirlendi.

5. Sayılan hücreler 10 ml ortamın bulunduğu 75cm<sup>2</sup>'lik flaska ekildi.

### 3.3. Hücre Kültürü

Çözdürülen Calu-1 hücreleri (Cisplatin'e duyarlı ve dirençli Calu-1 hücreleri (CR-Cal-1)), içerisinde %10'luk FBS (Fetal Bovine Serum), 5ml L-Glutemin ve 5ml Penisilin + Streptomisin karışımı bulunan 500ml Dulbecco's Modified Medium (DMEM)'dan alınan 10ml ortamın içine konulduğu 75cm<sup>2</sup>'lik flasklar içinde 37°C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde çoğalmaları için saklandı.

Çoğalan hücrelerin pasajlama, proliferasyon ve dondurma işlemlerindeki hücre sayılarını belirlemek için 50 µl Tripan Mavisi + 50 µl hücrelerden oluşan solüsyon Neubauer Lamı üzerine alınarak İnverted Mikroskop altında sayımları yapıldı. Hücrelerin Neubauer Lamı üzerindeki görüntüsü Şekil 3' de gösterilmiştir.



Şekil 3: Neubauer Hemositometresi

### 3.4. Hücrelerin Pasajlanması

Konulduğu 75 cm<sup>2</sup>'lik flaskların yüzeyini kaplayacak sayıya ulaşan Calu-1 hücreleri adherent ( yüzeye yapışarak tutunan hücreler ) hücreler olduğundan hücre pasajlaması şu şekilde gerçekleşti :

1. Hücrelerin içinde bulunduğu ortam döküldü. Flaska FBS bulundurmeyen ortam eklendi ve flaskların yüzeyi yıkandı böylece flastaki FBS'li ortam tamamen uzaklaştırıldı.
2. İçerisinde hücrelerin yüzeye yapışık halde bulunduğu flaska, hücreleri flastan ayırmak için 1.5ml Tripsin-EDTA eklendi ve 37<sup>0</sup>C etüvde 5 dakika kadar bekletildi.
3. Inkübasyon sonrası hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadığı inverted mikroskopla kontrol edildi. Ayrılan hücrelerin üzerine Tripsin'in etkisini inhibe etmek amacıyla Tripsinin 2 katı besiyeri eklendi ve hücreler 15'lik falkona alınarak 1200 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı.
4. Santrifüj sonrası hücrelerin toplandığı falkonun süpernatantı atıldı, pelletin üzerine 2 ml besiyeri eklenip pipetaj yapılarak hücreler kaldırıldı.
5. Kaldırılan hücelerin bulunduğu besiyerden 50 µl alındı üzerine 50 µl Tripan Mavisi eklenip sayım yapıldı . Deney için gerekli olacak kadar hücre içerisinde 10 ml besiyeri bulunan 75 cm<sup>2</sup>'lik flaslara iyice pipetajlanarak ekildi. Deneyde kullanılmayacak hücreler ise saklamak için -80<sup>0</sup>C 'lik dondurucuya kaldırıldı.

### 3.5. Hücrelerin Dondurulması ( Kriyoprezervasyon )

Deneylerde kullanılmayacak olan fazla hücreleri dondurmak için sırasıyla şu işlemler uygulandı.

1. Flask içerisindeki ortam döküldü ve flaska FBS bulundurmeyen ortam eklendi, yıkama yapılarak kalan besiyer uzaklaştırıldı.
2. Ardından yine hücelerin olduğu flaska 1.5ml Tripsin-EDTA eklendi, 37<sup>0</sup>C'lik etüvde 5 dakika bekletilip hücreler kalktığında ekstra olarak Tripsinin 2 katı besiyer eklenerek hücrelerin olduğu bu solusyon 15'lik falkona alınıp 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.

3. Santrifüj sonrası falkondaki süpernatant atıldı. Pellete 1ml besiyer eklenerek pipetaj yapıldı ve 50µl hücre + 50µl Tripan Mavisi solusyonu Neubauer Lamı üzerinde sayım yapıldı.

4. Sayım sonrası tekrar aynı şartlarda santrifüj yapılan hücrelerin süpernatantı atılıp pellet her kriyotüpte  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde 9:1 oranındaki FBS+DMSO karışımıyla buz üzerindeki kriyotüplere alındı ve hücre adı, pasaj sayısı ve dondurulduğu tarih üzerine yazılarak  $-80^{\circ}\text{C}$ 'deki dondurucuya kaldırıldı.

### **3.6. Calu-1 Hücrelerine Cisplatin Direnci Kazandırma**

Duyarlı Calu-1 hücreleri ilk olarak 5 µm Cisplatinli ortamda muamele edilerek hücrelerin 5µm Cisplatine direnç kazandırılması sağlandı. Verilen Cisplatin miktarı daha sonra 10 µm, 15µm ve 20 µm olarak artırıldı. Son olarak 20 µm Cisplatin'e direnç kazanan hücreler dirençli Calu-1 hücreleri olarak kullanıldı.

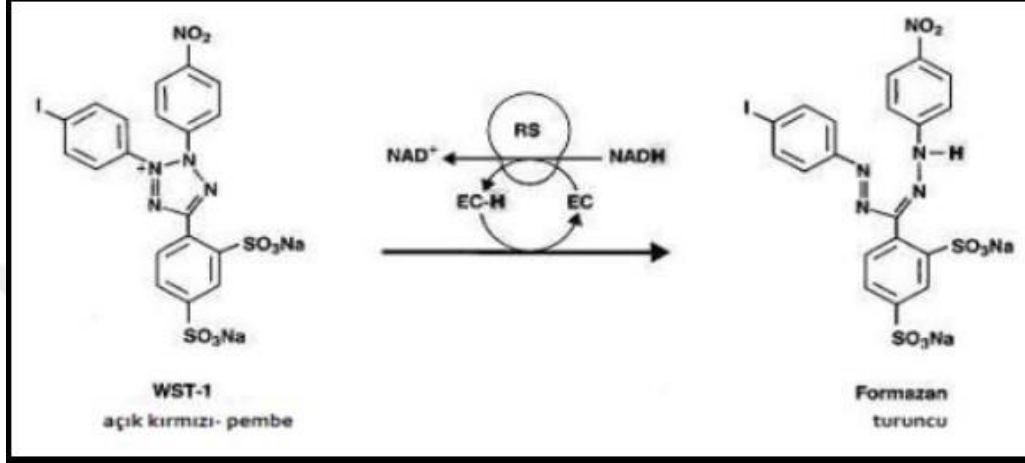
### **3.7. Hücre Proliferasyon Deneyi**

Hücre proliferasyon deneyi, proliferasyona uğramış hücrelerin dehidrojenaz enzim aktivitesinin tetrazolyumu (MTT: sarı, WST1: kırmızı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesiyle oluşan renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu veya spektrofotometre ile ölçülmesini sağlayan bir yöntemdir. Calu-1 hücrelerinin proliferasyon deneyi için 96'lık plate'in her kuyucuğunda 100 µl hücre olacak şekilde 3'er kuyuya tekrarlı hücre ekimi yapıldı. Ekimin ardından plate  $37^{\circ}\text{C}$ 'deki etüvde 96 saat inkübe edildi. 96. saatte platedeki hücelere, kuyucuk başına 10µl olacak şekilde WST-1 ( water- soluble tetrazolium-1 ) eklendi ve yarım saat sonra ölçüm yapılarak çıkan hücre sayısına bakılarak sitotoksite deneyi için kullanılacak hücre miktarı belirlendi. Bu miktar kuyucuk başına 4500 hücre olarak bulundu.

### **3.8. Sitotoksite Deneyi**

Cisplatin'e duyarlı ve dirençli Calu-1 hücrelerinde farklı dozlarda Cisplatin ve Resveratrol uygulanan hücre hatlarının  $\text{IC}_{50}$  değerleri WST-1 yardımıyla belirlendi.

WST-1 hücre proliferasyon testi ile bağıl değeri ölçmek için tasarlanmış basit, kolorimetrik bir testtir. Suda çözünür tuz, hücre kültürü ortamına salınır. İnkübasyon süresi içinde reaksiyon, hücre kültüründeki mitokondriyal dehidrojenaz miktarı ile doğru orantılı olarak bir renk değişikliği üretir ve bu şekilde hücrelerin metabolik aktivitesi ölçülmektedir. WST-1 Testinin çalışma prensibi Şekil 4’de gösterildiği gibidir.



Şekil 4: WST-1 Testi'nin çalışma prensibi

96'lık platelerin kuyucuklarına 3'er tekrarlı olarak 24,48 ve 72 saatlik WST-1 ölçümü için her kuyucukta 4500 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. 24 saat etüvde bekletilen plate inverted mikroskopla incelenerek hücrelerin kuyucukların yüzeyine yapışarak çoğalmaya devam edip etmedikleri kontrol edildi. Kuyucuk yüzeylerine yapışarak çoğalan hücrelerin içinde bulunduğu besiyer kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve yerine içerisinde belirlenen dozlarda da Cisplatin bulunan yeni besiyerler eklendi. (Duyarlı Calu-1 hücrelerinde kullanılan Cisplatin dozları; 50, 30, 20, 15, 10 ve 5µM. Dirençli Calu-1 hücrelerinde kullanılan Cisplatin dozları ;80, 65, 50, 35, 20 ve 5 µM. Bu iki farklı hücre hattında farklı dozların kullanımının nedeni Dirençli Calu-1 hücre hattına kazandırılan direncin sağlamanın yapılmasıydı )

Besiyeri ortamında bulunan duyarlı ve dirençli Calu-1 hücrelerine 300, 250, 200, 150, 100 ve 50µM dozlarda Resveratrol ilave edildi.

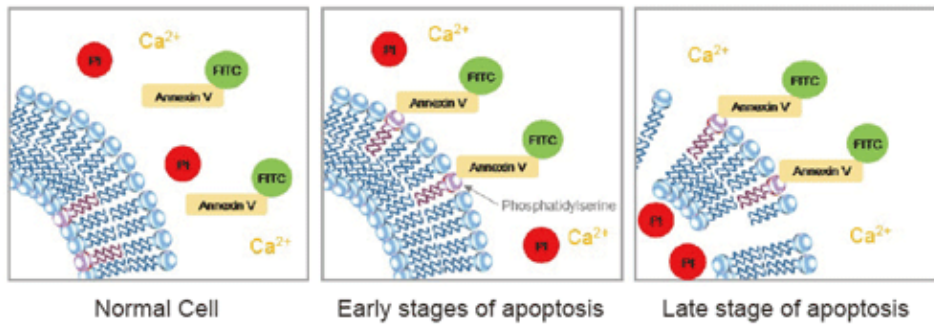
Resveratrol verildikten sonraki 24, 48 ve 72. saatlerde bu hücrelerin bulunduğu her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 eklenerek her yarım saatte bir olmak üzere 8 defa

mikroplak okuyucuda (Multiskan Fc, Thermo) 450 nm absorbands 620 nm referans aralığındaki değerlerinin ölçümleri gerçekleştirildi. Ölçümler sonucunda elde edilen veriler Calcusyn Software programında hesaplanarak Resveratrol için hücrelerin %50 sini öldürecek doz anlamına gelen  $IC_{50}$  değeri belirlendi.

### 3.9. Apoptoz

Resveratrol'un Calu -1 hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisi Annexin V kiti kullanılarak araştırıldı. Duyarlı Calu-1 hücreleri ile dirençli Calu-1 hücrelerinin her biri için  $3 \times 10^5$  adet hücreden oluşacak şekilde 2 tane 25cm'lik flask içerisine ekim yapıldı. Her iki hücre hattının da birer flaskına sitotoksikite deneyiyle belirlenen  $IC_{50}$  dozlarında Resveratrol verilerek 48. saatte protokole uygun olarak ölçümleri yapıldı. Resveratrol eklenmeyen duyarlı Calu-1 ve dirençli Calu-1 hücreleri deneyin kontrol grupları olarak kullanıldı. Kontrol gruplarındaki apoptoz ile Resveratrol verilen hücre gruplarında meydana gelen apoptoz seviyelerine bakılarak Resveratrol'un hücreler üzerindeki etkisi gözlemlendi.

**Annexin V Yöntemi:** Normal hücrelerde, hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde zar lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Hücre apoptoza girerse, normalde iç yüzeyde bulunan PS molekülleri, hücre zarının dış yüzeyine doğru yer değiştirmektedir. Bu yer değiştirme, hücre zarı bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken aşamalarında meydana gelmektedir. Bu deney, protein Anneksin V'nin kalsiyum varlığında fosfatidilserin (PS) 'e bağlanma kabiliyetine dayanmaktadır. Anneksin V boyalı hücrelere propidyum iyodür (PI) ilavesi; canlı hücreler, erken apoptotik ve geç apoptotik ve nekrotik hücreler arasında ayırım yapılmasına yardımcı olmaktadır. Anneksin V'nin hücreler üzerindeki apoptotik etki mekanizması **Şekil 5**'de gösterildiği gibidir.



**Şekil 5:** Annexin V yönteminin hücreler üzerindeki apoptotik etkisi

### **Annexin V Protokolü :**

1. Apoptoz deneyi Resveratrol verildikten sonra ki 48. saatte sonlandırıldı.
2. 25'lik flaslara ekili hücreler PBS ile yıkandı.
3. Yıkanan flaslara 750 µl tripsin eklendi ve 5 dakika etüvde inkübasyon yapıldı.
4. Flask yüzeyinden ayrılan hücrelerin üzerine eklenen tripsinin iki katı (1500 µl) FBS'li DMEM eklendi ve hücreler 15'lik falkonlara toplandı.
5. Falkonlarda toplanan hücreler 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
6. Santrifüj sonrası falkonlarda oluşan süpernatant döküldü ve hücrelere 1000 µl PBS eklendi.
7. Kontrol grupları iki tane, doz grubu bir tane olmak üzere PBS içeren hücreler 1.5'luk ependorflara alınarak tekrar 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı.
8. Santrifüj sonrası ependorflarda bulunan süpernatant tamamen alındı.
9. İki adet kontrol grubu bir adet doz içeren ependorflardan ;  
Kontrol 1: 100µl Binding Buffer  
Kontrol 2: 100µl Binding Buffer + 2.5 µl Annexin V  
Doz : 100µl Binding Buffer + 2.5 µl Annexin V+ 2.5 µl PI eklendi
10. 15 dakika karanlık ortamda inkübasyonun ardından kontrol gruplarına da PI eklenerek BD Accuri C6 Flow akım sitometrisi cihazında ölçümler yapıldı.

### **3.10. RNA İzolasyonu**

RNA izolasyon çalışmasında Cisplatin duyarlı ve dirençli Calu-1 hücrelerinin her ikisinden de ikişer adet 25 cm<sup>2</sup>'lik flaslara Resveratrol verilecek ve kontrol grubu olacak şekilde toplamda 4 flaska hücre ekimi yapıldı. Her bir flaskta 3x10<sup>5</sup> adet hücre bulunmasına dikkat edildi. Flaslara Resveratrol eklendikten sonraki 48. saatte izolasyon "Total RNA Mini Kit" protokoline uygun olarak yapıldı.

**Protokol:**

1. Flasklardaki hücreler PBS ile yıkandı. Her bir flaska 7500 µl Tripsin eklenip hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması için 5 dk etüvde bekletildi.
2. Flask yüzeyinden ayrılan hücreler üzerlerine 1.500 µl FBS bulunduran DMEM eklenerek 15'lik falkonlarda toplandı.
3. 15'lik falkonlar 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüjden çıkarılan hücrelerin süpernatantı döküldü. Pellet üzerine 1000 µl PBS eklendi, pipetaj yapıldıktan sonra ependorflara aktarıldı ve tekrar 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası hücrelerin üzerindeki PBS alınıp onun yerine 350 µl lysis buffer eklendi. 2 dakika kadar pipetaj yapıldı.
6. Aynı ependorflara pipetaj sonrası 350 µl ethanol eklendi ve tekrar pipetaj yapıldı.
7. Pipetaj sonrası hücrelerin olduğu solusyon spin kolonlara aktarılıp üzerlerine 700 µl 'Low Stringency' eklenerek 13000 g'de 30 sn santrifüj edildi.
8. Santrifüj sonrası kolonun alt haznesindeki kısım döküldü. Hücrelerin olduğu kolon kısmına 80 µl DNaz ekledi, 15dk inkübasyona bırakıldı.
9. Inkübasyon sonrası kolonlara 700 µl 'High Stringency' eklenip 130000 g'de 30sn santrifüj edildi.
10. Santrifüj sonrası kolonun alt haznesindeki kısım dökülüp kolon içerisine 700 µl 'Low Stringency' eklenerek 13000 g'de 1dk santrifüj edildi.
11. Santrifüj sonrası tekrar alt haznedeki kısım dökülerek, 13000 g'de 2 dk kurutma için santrifüj yapıldı.
12. Son olarak spin kolonlara 80 ml 'Elütion' eklenip 1dk bekletildikten sonra 13000 g'de 2 dk santrifüj edilerek kolonlardaki RNA ependorflara aktarıldı.

Tüm işlemler bittikten sonra her bir örnekten 2 µl alınarak Nanodrop cihazıyla her bir örnek grubundaki RNA'nın saflığı ölçüldü.



### 3.11. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

cDNA sentezi için 10 µl RNA, 10 µl hazırlanan mixten alınarak 4 örnek oluşturuldu. Mix için kullanılan bileşenler ve miktarları aşağıda **Tablo 1**'de belirtildiği gibi hazırlandı. Örnekler cihaza yerleştirildi. 2 saat 11dk.nın sonunda elde edilen cDNA'ların saflıkları tekrar Nanodrop cihazında ölçüldü.

| Komponentler                      | Volumler |
|-----------------------------------|----------|
|                                   |          |
| 10X RT Buffer                     | 2.0 µl   |
| 25X dNTP Mix ( 100 mM )           | 0.8 µl   |
| 10X RT Random Primer              | 2.0 µl   |
| MultiScribe™ Reverse Transkriptaz | 1.0 µl   |
| Nuclease-Free H <sub>2</sub> O    | 4.2 µl   |
| Total per reaction                | 10.0 µl  |

**Tablo 1** : cDNA sentezi mix için kullanılan reaktifler ve miktarları

### 3.12. qPCR Analizi

Duyarlı ve dirençli Calu-1 hücre hatlarından elde edilen cDNA'lar kullanılarak GRP78 gen ekspresyon seviyelerini belirlemek amacıyla Tablo 4 'de dizileri belirtilen forward ve revers primerler kullanılarak PCR analizi yapıldı. Yapılan qPCR analizi çalışmasında hedef gen olan GRP78 geni , housekeeping gen olarak ise Tablo 4 de forward ve reverz gen dizileri belirtilmiş olan GAPDH geni çalışıldı . qPCR analizi için " EnTurbo™ SYBRGreen PCR SuperMix" kiti kullanıldı.

#### Protokol :

1. qPCR Analizi için gerekli olan GRP78 primerleri kılavuzda yazdığı miktardaki distile su ile muamele edilerek çözündürüldü.

2. GRP78 forward primeri 718 µl, revers primeri ise 476 µl distile su kullanıldı. GAPDH geninin forward primeri için ise 537 µl, revers primeri için 501 µl distile su kullanıldı.
3. Primerler kullanıma uygun hale geldikten sonra **Tablo 2**'de belirtilen miktarlarda sybrgreen, primer, cDNA ve nükleaz free den oluşturulan mix'den 10 ml 96'lık plate kuyucuklara aktarıldıktan sonra herbir kuyucuğa **Tablo 3**'de belirtildiği miktarlarda örnekler eklenerek 1 dakika santrifüj yapıldı ve ardından Roche Light Cycler 480 cihazına yerleştirilerek 2 saat 15 dakika süren PCR analizi başlatıldı.
4. Elde edilen veriler Excel ve GraphPad programlarıyla analiz edildi.



| Reaktifler         | Hacimler |
|--------------------|----------|
| SYBGreen           | 5 µl     |
| cDNA örneği        | 2 µl     |
| Upstream Primer    | 1 µl     |
| Downstream Primer  | 1 µl     |
| ddH <sub>2</sub> O | 1 µl     |
| Son hacim          | 10 µl    |

**Tablo 2:** qPCR reaksiyon mixi

|   | 1                             | 2                            | 3                             | 4                                       | 5                                        |
|---|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|
| A | GAPDH +<br>Negatif<br>Kontrol | GAPDH +<br>Duyarlı<br>Calu-1 | GAPDH +<br>Dirençli<br>Calu-1 | GAPDH +<br>Duyarlı<br>Calu-1<br>Kontrol | GAPDH +<br>Dirençli<br>Calu-1<br>Kontrol |
| B | GRP78 +<br>Negatif<br>Kontrol | GRP78 +<br>Duyarlı<br>Calu-1 | GRP78 +<br>Dirençli<br>Calu-1 | GRP78 +<br>Duyarlı<br>Calu-1<br>Kontrol | GRP78 +<br>Dirençli<br>Calu-1<br>Kontrol |

**Tablo 3:** 96'lık platte kuyucuklara konulan örnekler

| Gen Primerleri | Primer Baz Dizilimi          | BP   |
|----------------|------------------------------|------|
| GRP78 Forward  | 5'-CTGTCCAGGCTGTGTGCTCT-3'   | 21bp |
| GRP78 Reverse  | 5'-CTTGGTAGGCACCACTGTGTTC-3' | 22bp |
| GAPDH Forward  | 5'-GTCCCTCTGACTTCAACAGCG-3'  | 21bp |
| GAPDH Reverse  | 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3' | 22bp |

**Tablo 4:** GRP78 ve GAPDH genlerinin primerlerinin baz dizilimi ve bp sayısı



## 4.Bulgular

### 4.1. Proliferasyon Deneyi

Calu-1 hücre hattının sitotoksosite deneyi için gerekli olan hücre sayısını bulmak için 96'lık plate 3 tekrarlı olacak şekilde, her kuyuya içinde  $1 \times 10^4$  hücre bulunan 100  $\mu$ l FBS'li DMEM koyularak hücre ekimi yapıldı. Ekilen hücreler,  $36^0$  C etüvde 96 saat bekletildi. 96.satte her kuyucuğa 10  $\mu$ l WST-1 eklendi ve yarım saatte bir olmak üzere 8 defa Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusu ile okutmalar yapılarak hücre sayısı  $4.5 \times 10^3$  hücre/mililitre olarak belirlendi.

### 4.2. Sitotoksosite Deneyi-1 ( Cisplatin'in Duyarlı Ve Dirençli Calu-1Hücre Hattı Canlılığı Üzerindeki Etkisinin -IC<sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi. )

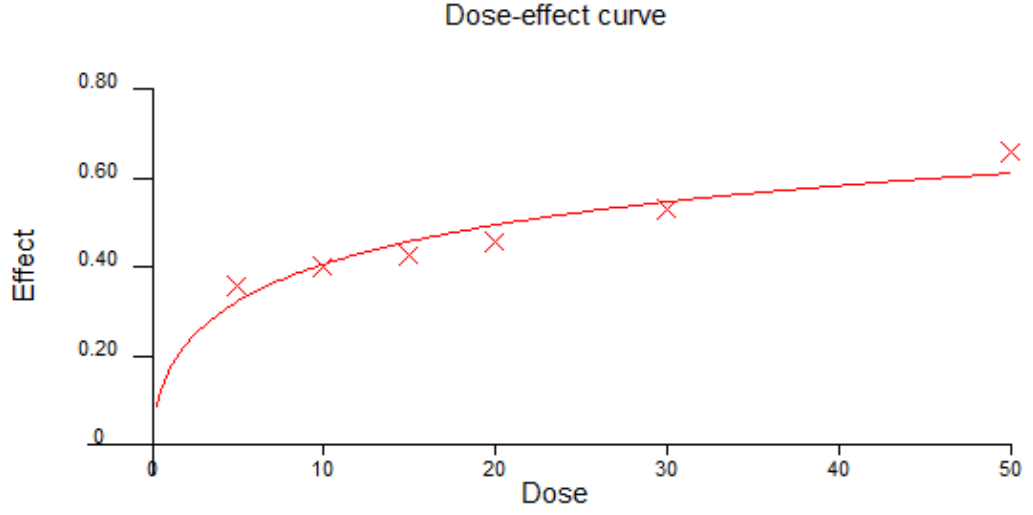
Cisplatin'e duyarlı ve dirençli Calu-1hücreleri için eş zamanlı olarak sitotoksosite deneyi kurularak Calu-1 hücre hattına Cisplatin'e karşı kaç kat direnç kazandırıldığı belirlenmek istendi. Bu amaçla 1 platte duyarlı Calu-1 diğer platte dirençli Calu-1hücre hattı olmak üzere 2 ayrı 96'lık plate 3 tekrarlı olacak şekilde her kuyu içerisinde  $4.5 \times 10^3$  hücre olan 100 $\mu$ l FBS'li DMEM eklendi ve hücrelerin kuyucuklara tutunması için 24 saat  $36^0$ C etüvde inkübe edildi. 24. saatin sonunda kuyucuklardaki ortam uzaklaştırılarak duyarlı Calu-1 hücrelerinin olduğu platteki kuyucuklara yukarıdan aşağı sırasıyla 50, 30, 20, 15, 10 ve 5  $\mu$ M Cisplatin içeren FBS'li DMEM eklendi.

Dirençli Calu-1hücrelerinin olduğu platteki kuyucuklara ise yine yukarıdan aşağı olmak üzere sırasıyla 80, 65, 50, 35, 20 ve 5  $\mu$ M Cisplatin içeren FBS'li DMEM eklendi.

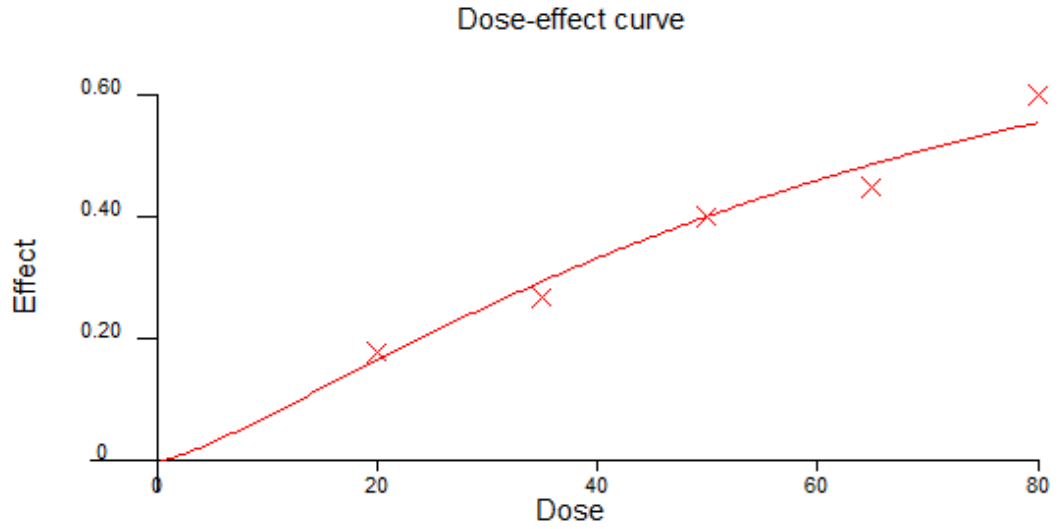
Her iki plate aynı etüve kaldırıldı ve Cisplatin verildikten sonraki 24., 48. ve 72. saatte kuyucuklara 10'ar  $\mu$ l WST-1 eklenerek yarım saatte bir olmak üzere 8 defa Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusu ile okumalar yapıldı.

Okumalar sonucunda elde edilen verilerin **CalcuSyn** programında gerekli hesaplamaların yapılmasıyla ortaya çıkan IC<sub>50</sub> değerleri **Grafik 1** ve **Grafik 2**'de gösterildiği gibi CalcuSyn programında gerekli hesaplamaların yapılmasıyla ortaya çıkan IC<sub>50</sub> değerleri duyarlı Calu-1 için 48.saatte 20.66  $\mu$ M , dirençli Calu-1için 48.

saatte 67.54  $\mu$ M olarak bulundu. Dirençli Calu-1 hücrelerine ait  $IC_{50}$  değerinin duyarlı Calu-1 hücrelerine ait  $IC_{50}$  değerine oranlanmasıyla 3.2 kat direnç kazandırılmış olduğu saptandı.



**Grafik 1 :** Duyarlı Calu-1 hücre hattı Cisplatin etken maddeli sitotoksisite deneyi analiz sonucu(  $IC_{50}$  değeri )



**Grafik 2 :** Dirençli Calu-1 hücre hattı Cisplatin etken maddeli sitotoksisite deneyi analiz sonucu (  $IC_{50}$  değeri )

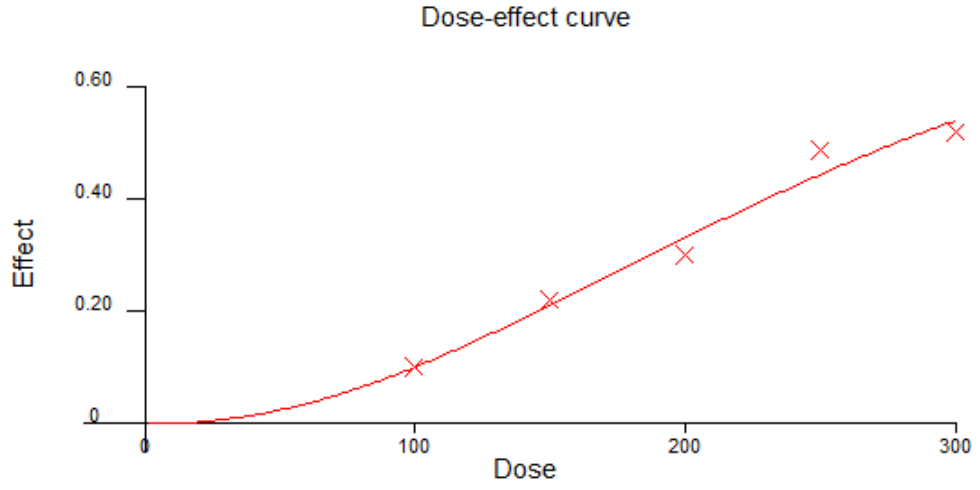
#### **4.3. Sitotoksosite Deneyi-2 ( Resveratrol'ün Duyarlı Calu-1 Ve Dirençli Calu-1Hücre Hattındaki Hücrelerin Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Yani IC<sub>50</sub> Değerinin Belirlenmesi. )**

Resveratrol'ün, Cisplatin'e duyarlı Calu-1 hücre hattı ile Cisplatin'e dirençli dirençli Calu-1hücre hattının canlılığı üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla her iki hücre hattından da 96'lık 2 adet platte sitotoksosite deneyi kuruldu.

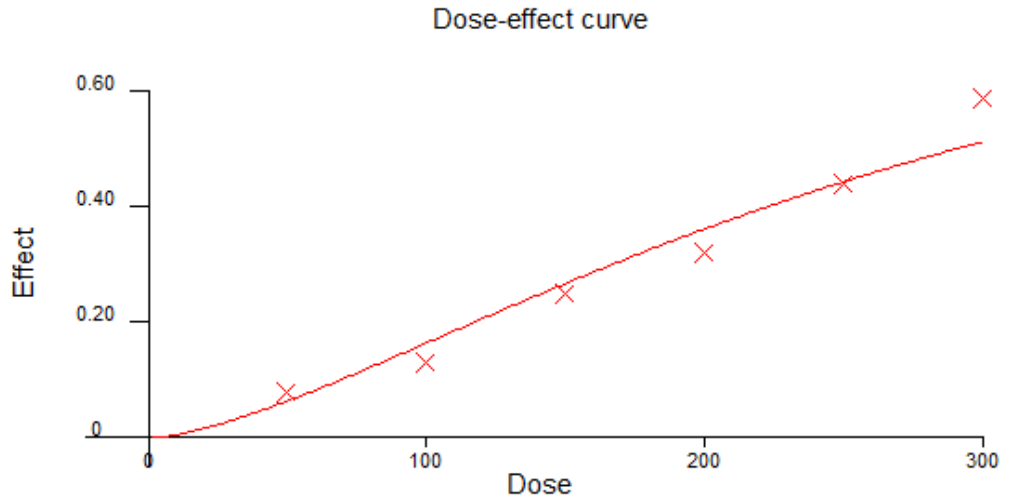
Platelerdeki her kuyucuğa içerisinde  $4.5 \times 10^3$  adet hücre bulunan 100 µl FBS'li DMEM koyuldu. Her dozu 3 tekrarlı olacak şekilde 24, 48 ve 72. saatlerde ölçüm yapmak amacıyla ekimler tamamlandı. Ekim yapıldıktan sonra hücreler kuyucuk yüzeylerine tutunabilsin diye 24. saat 36°C sıcaklıktaki etüvde inkübe edildi. 24. saatin sounda kuyucuklardaki ortamlar çekilip yerine belirlenen dozlardaki Resverol içeren FBS'li DMEM eklendi.

Duyarlı Calu-1 hücreleri için belirlenen Resveratrol dozları yukarıdan aşağıya sırasıyla 350, 300, 200, 150, 100 ve 50 µM idi. Dirençli Calu-1 hücreleri içinde belirlenen Resveratrol dozları yukarıdan aşağıya sırasıyla 300, 250, 200, 150, 100 ve 50 µM idi.

Her iki platte tekrar 36°C sıcaklıktaki etüve kaldırıldı. Bu işlemi takip eden 24, 48 ve 72. saatlerde belirlenen kuyucukların her birine 10 µl WST-1 eklenerek yarım saatte bir olmak üzere 8 defa Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusu ile okumalar yapıldı. Okutmalar sonucunda elde edilen verilerin CalcuSyn programında gerekli hesaplamaların yapılmasıyla ortaya çıkan IC<sub>50</sub> değerleri **Grafik 3** ve **Grafik 4**'de gösterildiği gibi Duyarlı Calu-1 için 48.saatte 277 µM , Dirençli Calu-1 için 48. Saatte 290 µM olarak bulundu.



**Grafik 3:** Duyarlı Calu-1 hücre hattı Resveratrol etken maddeli sitotoksisite deneyi analiz sonucu (  $IC_{50}$  değeri )

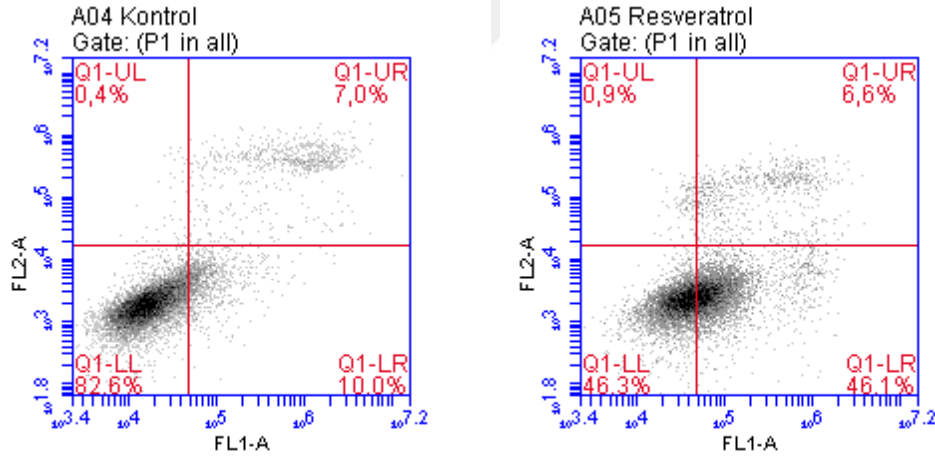


**Grafik 4 :** Dirençli Calu-1 hücre hattı Resveratrol etken maddeli sitotoksisite deneyi analiz sonucu (  $IC_{50}$  değeri)

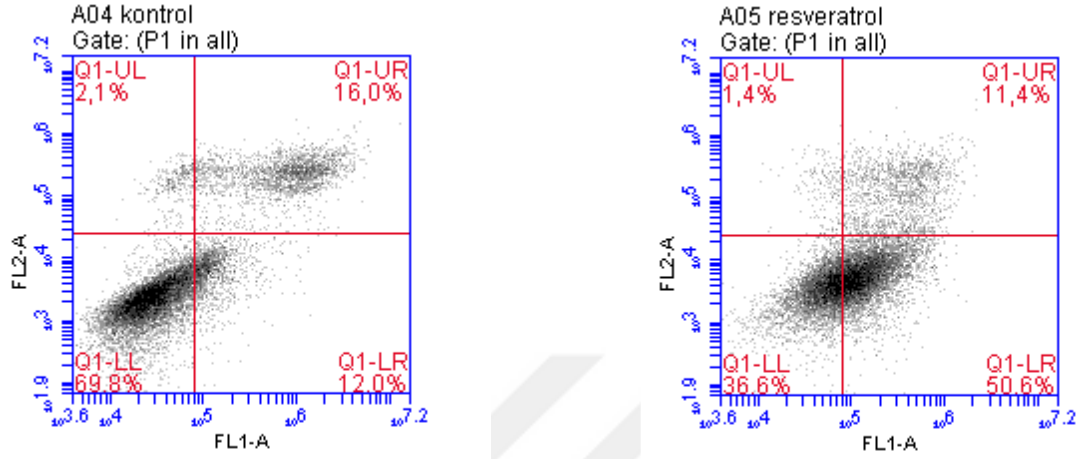


#### 4.4. Apoptoz Deneyleri ( Resveratrol'ün Duyarlı Calu-1 Hücre Hattı Ve Dirençli Calu-1Hücre Hattı Üzerideki Apoptotik Etkisinin Belirlenmesi. )

Resveratrol'ün Duyarlı ve Dirençli Calu-1 hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisini belirlemek amacıyla bir adet kontrol grubu bir adet etken madde verilecek grup olmak üzere iki hücre hattından ikişer flaks olacak ve her flaskta  $3 \times 10^5$  adet hücre içeren 3 µl FBS'li DMEM besiyeri bulunacak şekilde toplamda 4 tane 25cm<sup>2</sup> 'lik flaska hücre ekimi yapıldı. Ardından hücreler flask yüzeyine tutunması için 24 Saat 36<sup>0</sup> C etüvde inkübe edildi. 24.saatte etken madde verilecek flasklardaki besiyer uzlaştırıldı ve yerine sitotoksisite deneyleriyle belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerindeki etken madde dozlarını içeren 3µl FBS'li ortamlar tekrar flasklara eklendi. 48 saat boyunca yine 36<sup>0</sup>C etüvde inkübe edilen hücre hatları 48. Saatin sonunda apoptoz analizi Annexin V yöntemiyle yapıldı. Kontrol gruplarıyla etken maddenin verildiği gruplardaki apoptoz oranları karşılaştırıldığında Duyarlı Calu-1 hücre hattında bu oran % 52.7, Dirençli Calu-1 hücre hattında % 62 olarak bulunmuştur. Elde edilen apoptoz oranları **Şekil 6** ve **Şekil 7** de gösterilmektedir.



**Şekil 6 :** Resveratrol'ün belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinin duyarlı Calu-1 hücre hattına 48. saatteki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları



**Şekil 7 :** Resveratrol'ün belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinin dirençli Calu-1 hücre hattına 48. Saatteki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları

#### 4.5. Resveratrol'ün GRP78 mRNA Ekspresyonu Üzerindeki Etkisinin Analizi

Resveratrol'ün Duyarlı ve Dirençli Calu-1 hücre hatlarındaki GRP78 geninin ekspresyona etkisinin ne olduğunu belirlemek için qPCR Analiz yöntemiyle gen ekspresyon seviyelerinin ölçümü yapıldı. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi sonucunda elde edilen cDNA örnekleri SYBRGreen, hedef gen olan GRP78 geni ve housekeeping gen olan GAPDH geni primerleri ve ddH<sub>2</sub>O ile hazırlanan mix 96'lık pcr plate kuyucuklarına **Tablo 2** 'de de belirtilen hacimlerde eklendi. 1 dakikalık santrifüjün ardından plate Roche Light Cycler 480 cihazına yerleştirildi ve 2 saat 15 dakikalık pcr döngüsünün ardından elde edilen veriler Excel'de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değerleri hesaplanıp gen ekspresyon seviyeleri belirlendi ( **Tablo 5** ve **Tablo 6** ). Yapılan analizler sonucunda Resveratrol'ün, Duyarlı Calu-1 hücre hattındaki GRP78 geni ekspresyonunu kontrol grubuna göre 1.34 kat arttırdığını, Dirençli Calu-1 hücre hattında ise GRP78 gen ifadesini kontrol grubuna göre 0,55 kat azalttığını belirlendi.

| Örnekler                      | Cp Değeri |
|-------------------------------|-----------|
| Duyarlı Calu-1 GRP78          | 22,05     |
| Dirençli Calu-1 GRP78         | 22,04     |
| Duyarlı Calu-1 Kontrol GRP78  | 14,45     |
| Dirençli Calu-1 Kontrol GRP78 | 8,77      |
| Duyarlı Calu-1 GAPDH          | 21,52     |
| Dirençli Calu-1 GAPDH         | 19,82     |
| Duyarlı Calu-1 Kontrol GAPDH  | 12,58     |
| Dirençli Calu-1 Kontrol GAPDH | 6,00      |

**Tablo 5 :** Duyarlı ve Dirençli Calu-1 hücre hatlarında GRP78 ve GAPDH'ın elde edilen Cp değerleri

| GRP78-GAPDH Oranı            | 2 <sup>-ct</sup> | FC   | Log2 |
|------------------------------|------------------|------|------|
| Duyarlı Calu-1 GRP78/GAPDH   | 0,69             | 2,53 | 1,34 |
| Dirençli Calu-1 GRP78/GAPDH  | 0,21             | 1,46 | 0,55 |
| Duyarlı Kontrol GRP78/GAPDH  | 0,27             | 1,00 | 0,00 |
| Dirençli Kontrol GRP78/GAPDH | 0.15             | 1,00 | 0,00 |

**Tablo 6 :** Duyarlı Calu -1 ve Dirençli Calu-1 hücre hattında hedef genin housekeeping gene oranıyla bulunan ekspresyon değerleri

## 5.Tartışma

Kanser, vücudun herhangi organ yada dokusundaki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ve büyümesi sonucu ortaya çıkan bir hastalık olup, olduğu dokuya göre adlandırılmaktadır. Bugün 200'den fazla kanser türü tespit edilmiştir. En sık görülen ve en yüksek oranda ölüme yol açan kanserler ise akciğer, mide, karaciğer, kolon ve meme olarak bilinmektedir. Bu kanser türleri içinde birinci sırayı akciğer kanseri almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ / WHO) verilerine göre 2020 yılında dünyada 2.21 milyon yeni akciğer kanseri vakası tespit edilmiş ve yine aynı verilere göre 2020 yılında akciğer kanserinden hayatını kaybeden kişi sayısının 1.8 milyon olduğu açıklanmıştır. Akciğer kanseri teşhisi konulan hastalarda hayatta kalma oranı çoğunlukla hastalığın erken tanısı ve tedavisine bağlıdır. Yine DSÖ verilerine göre akciğer kanserine yakalanmış hastalarda 5 yıllık sağkalım oranı %19 civarındadır. Akciğer kanserine neden olan etmenlerin başında tütün kullanımı gelmektedir. Tütün kullanımına ek olarak, aile öyküsü, ilerlemiş yaş, pasif içicilik, bazı metallere maruz kalmak, genetik yatkınlık, radyasyon ve hava kirliliği akciğer kanserinin oluşumunda rol oynayan nedenlerden bazılarıdır. Akciğer kanseri, kanser hücrelerinin özelliklerine bağlı olarak küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücreli olmayan kanseri olarak iki alt türe ayrılmaktadır.

- **Küçük hücreli olmayan akciğer kanseri.** Akciğer kanserlerinin %80 ila 85'ini oluşturur.
- **Küçük hücreli akciğer kanseri.** Akciğer kanserlerinin %10 ila 15'ini oluşturur.

Küçük hücreli akciğer kanserinin oluşumu büyük ölçüde sigara kullanımına bağlıdır. Ayrıca asbest ya da radon gibi bazı kimyasallara uzun süre maruz kalmak da kanser gelişimine neden olabilir. Küçük hücreli akciğer kanserinin kitle olarak saptandığı bölgeler genellikle göğüs boşluğu ya da havayolu mukozalarıdır.

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin, farklı hücre tiplerinde gelişimine bağlı olarak alt grupları bulunmaktadır. Fakat bu grupların hepsi, hastalığın ilerleyişi ve tedavi yöntemlerinin benzer olması sebebiyle küçük hücreli dışı akciğer kanseri olarak isimlendirilir.

Bu alt gruplar: Skuamöz hücreli karsinom (epidermoid karsinom), büyük hücreli karsinom ve adenokarsinom olarak adlandırılır. Bu alt grupların yanında daha az rastlanan küçük hücre dışı akciğer kanseri grupları ise pleomorfik, karsinoid tümör, tükürük bezi karsinomu ve sınıflandırılmamış karsinomdur.

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin tanısında fiziki muayene ve tıbbi geçmiş bilgilerine ek olarak tanının konulmasında yardımcı olabilecek testler bulunmaktadır.

Bu testler:

- **Göğüs Röntgeni:** Akciğerde herhangi bir anormallik olduğunda istenilen ilk testtir.
- **BT (Bilgisayarlı Tomografi) Taraması:** Akciğer tümörlerini saptanmasında rutin röntgenlere göre daha iyidir. Tümörlerin şekli, boyutu ve pozisyonunun belirlenmesine yardımcı olur.
- **PET (Pozitron Emisyon Tomografisi) Taraması:** PET taraması, vücudunuzun içinin 3 boyutlu (3D) resimlerini oluşturan bir testtir. PET, pozitron emisyon tomografisi anlamına gelir.
- **PET/BT Taraması:** bu yöntem yüksek radyoaktivite gösteren alanların, BT taramasından gelen detaylı görüntü ile kıyaslanmasına olanak sağlar. Akciğer kanseri teşhisi kullanılan hastalara en sık uygulanan PET taraması tekniğidir.
- **Kemik Taraması:** Kanser kemiklere yayılıp yayılmadığını saptamaya yardımcıdır. Bu yöntem genellikle diğer yöntemlerin yeterli olmadığı durumlarda kullanılır.

Akciğer kanserinde hastanın sağlık durumu, kanserin türü ve evresi gibi faktörler göz önünde bulundurularak cerrahi yöntem, kemoterapi yöntemi, radyoterapi yöntemi veya immünoterapi yöntemlerinden uygun olanıyla tedaviye başlanmaktadır. Glukoz düzenleyici protein 78 (GRP78), proteinlerin kalitesini ve katlanmasını kontrol eden,  $Ca^{+2}$  yardımıyla ER stres yolunu düzenleyen, ER’de bulunan bir moleküler şaperondur. Tümör çevresinde meydana gelen değişiklikleri algılayıp bu değişikliklere uyum sağlayan merkezi bir stress sensörü olarak görev yapmaktadır. Yapılan çalışmalar GRP78’in akciğer kanserinin kötü prognozu ve ilerlemesiyle yakından ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu sebeple akciğer kanserinin tedavisinde GRP78’in işlevinin detaylı olarak bilinmesi otofaji,

apoptoz, ilerleme, ilaç direnci ve tümörjenez üzerindeki etkisinin araştırılmasıyla akciğer kanserinin tedavisinde yeni bir umut kaynağı olacağı düşünülüp bununla ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.

Akciğer kanserinin tedavi yöntemlerinden birisi olan kemoterapi yöntemi sık sık kullanılmakta ve tedavinin gidişatı açısından olumlu sonuçlarda alınmaktadır. Bununla birlikte bazı hastalarda akciğer kanserinin tekrar nüks ettiği ve kanserli hücrelerin kemoterapide kullanılan ilaçlara karşı direnç kazandığı bu nedenle de kemoterapinin hastalığın tedavisinde yetersiz kaldığı sıkça görülen bir durumdur. Akciğer kanseri hücrelerinin direnç kazandığı kemoterapi ilaçlardan biri Cisplatin'dir. Cisplatin, akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, baş ve boyun kanseri, mesane kanseri, rahim ağzı kanseri ve beyin tümörlerinin tedavisinde sıkça kullanılan platin bazlı bir kemoterapik ajandır. Kanser hücrelerinin ilaçlara direnç kazanması birçok hastanın hayatını riske atacağından tedavi esnasında gerçekleşmesi istenmeyen bir olumsuzluktur. Resveratrol, başta kırmızı üzüm olmak üzere ananas, yerfıstığı gibi bitkilerde çokca bulunan doğal bir fitoaleksindir. Resveratrol'un kanserİ önleyici, kanserin oluşum basamaklarını geriletici ve erken dönemde kanseri baskılayıcı etkisini gösteren çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Araştırmalarda Resveratrol'un antikanserojen etkisinin; antiinflamatuvar, antimitojenik, parsiyel östrojenik (agonist/antagonist) ve antioksidan etkisi ile ilgili olabileceği ileri sürülmektedir. Ayrıca, Resveratrol'un kardiyovasküler sistem üzerindeki nitrik oksit oluşumunu artırıcı ve serbest oksijen radikallerini azaltıcı etkilerinin genel sağlığın düzelmesine katkı sağladığı bilinmektedir. Yine deneysel çalışmalarla, Resveratrol'un yaşam süresini uzattığı, metabolik ve nörodejeneratif hastalıklarda koruyucu etkileri olduğu saptanmıştır. Resveratrol'un bir çok kanser türünde çoklu ilaç direncini tersine çevirip dirençli hücreleri tekrar duyarlı hale getirdiğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Biz de bu çalışmamızda Cisplatin'e karşı direnç kazanmış akciğer kanseri hücrelerinde Resveratrol'un direnç üzerinde ne tür bir etki gösterdiği ve GRP78 gen ekspresyonu üzerindeki etkisi araştırıldı.

Son yıllarda Resveratrol'ün kanser gelişimi üzerindeki etkilerine yoğunlaşarak pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sitotoksiste, apoptoz ve gen ekspresyonu verilerinin birkaçı şu şekildedir:

Chengzhi Chen ve arkadaşları etken madde olarak Resveratrol'ü kullandıkları çalışmalarında akciğer kanseri hücre hattı olan A549 ile kurdukları sitotoksiste deneyinde MTT yöntemiyle yaptıkları okutmalar sonucunda A549 hücrelerinin %50'sini öldürecek etken madde dozu anlamına gelen  $IC_{50}$  değerini 25  $\mu M$  olarak bulmuşlardır (Chengzhi Chen ve ark. 2013)

Başka bir çalışmada Yameng Fan ve arkadaşları yine etken maddenin Resveratrol olduğu ve kullandıkları hücre hattında A549 olduğu çalışmalarında A549 hücrelerini 0  $\mu M$ , 25  $\mu M$ , 50  $\mu M$ , 100  $\mu M$  ve 200  $\mu M$  dozlarında Resveratrol ile muamele edip 24, 48 ve 72. saatlerde MTT ile okutmalar yapmışlar ve bu okutmalar sonucunda A549 hücre hattının  $IC_{50}$  değerini 91.77  $\mu M$  olarak bulmuşlardır. (Yameng Fan ve ark. 2020)

Bhurichaya Innets ve arkadaşları etken maddenin Resveratrol'ün türevleri olan 4,4'-(ethane-1, 2-diyl) bis (2-methoxyphenol) (RD2) ve 4-(3-hydroxyl-4-methoxyphenethyl)-2-methoxyphenol (RD3) 'ün olduğu, akciğer kanseri hücre hatlarından A549 ve H23 hücre hatlarıyla bir çalışma yapmışlar ve RD2 etken maddesiyle yaptıkları sitotoksiste deneyinde A549 hücrelerinin  $IC_{50}$  değerini 108.6  $\mu M$ , H23 hücrelerinin  $IC_{50}$  değerini 103,5  $\mu M$  olarak belirlerken RD3 etken maddesiyle yaptıkları sitotoksiste deneyi sonucunda A549 ve H23 hücre hatlarının her ikisinde de  $IC_{50}$  değerini 200  $\mu M$  üzerinde bulmuşlardır (Bhurichaya Innest ve ark.2022)

Biz ise yaptığımız bu çalışmada Resveratrol'ü etken madde olarak kullandığımız duyarlı Calu-1 ve dirençli Calu-1 hücre hatlarıyla kurduğumuz WST-1 sitotoksiste deneyleri sonucunda duyarlı Calu-1 hücre hattının  $IC_{50}$  değerini 277  $\mu M$ , dirençli Calu-1 hücre hattının  $IC_{50}$  değerini 290  $\mu M$  olarak belirledik. Bulduğumuz bu  $IC_{50}$  değerlerinin literatürde belirtilen  $IC_{50}$  değerleriyle uyumlu olduğu belirlendi.



Etken madde olarak Resveratrol'ün kullanıldığı çalışmaların bazılarında apoptoz deneyleri sonucunda elde edilen sonuçlara baktığımızda:

Wangping Li ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, KHDAK hücre hattı olan H446 hücre hattı 40 µg/ml Resveratrol içeren besiyer içerisine 24 saat bırakıldıktan sonra 24. saatte Annexin V yöntemiyle apoptoz deneyi yapmış ve bu deney sonucunda H446 hücre hattındaki apoptotik oranı % 40.39 olarak bulmuşlardır (Wangping Li ve ark. 2020)

Oing-sheng Zhao ve arkadaşları etken madde olarak Resveratrol'ü kullandıkları çalışmalarında A549 akciğer kanseri hücre hattına sitotoksosite deneyi sonucu buldıkları IC<sub>50</sub> değerindeki dozda Resveratrol ile maumele etmiş ve 24. saatin sonunda Annexin V yöntemiyle yapılan apoptoz deneyi sonucunda apoptotik oranı % 20 olarak bulmuşlardır (Oing-sheng Zhao ve ark. 2016)

Bhurichaya Innest ve arkadaşları sitotoksosite deneyinde anlattığımız çalışmalarında A549 hücre hattını sırasıyla 10, 100 ve 200 µM RD2 etken maddesiyle muamele edip sonrasında yaptıkları apoptoz deneyi sonucunda A549 hücrelerindeki apoptotik oranları sırasıyla % 23,25, % 61,26 ve %86,30 olarak bulmuşlardır. H23 hücre hattını ise yine aynı etken madde ile 100 ve 200 µM muamele edip %36,63 ve %75,79 oranda apoptoza uğradıklarını saptamışlardır. RD3 etken maddesi A549 ve H23 hücre hatlarına 200 µM olarak uygulanmış ve sonrasında yapılan apoptoz deneyi sonucunda A549 hücre hattında apoptotik oranı %13,25, H23 hücre hattında apoptotik oranı %18,57 olarak belirlemişlerdir (Bhurichaya Innest ve ark. 2022)

Yameng Fan ve arkadaşları Resveratrol etken maddesiyle tasarladıkları apoptoz deneyinde A549 hücre hattına sırasıyla 50 ve 100 µM Resveratrole maruz bırakmış ve sonrasında A549 hücre hattı Annexin V yöntemiyle apoptoz deneyi yaparak apoptotik oranları sırasıyla %9,98 ve %14,47 olarak bulmuşlardır (Yameng Fan ve ark. 2020)

Biz yaptığımız bu çalışmada Cisplatin'e duyarlı Calu-1 ve dirençli Calu-1 hücre hatlarına sitotoksosite deneyinde elde ettiğimiz IC<sub>50</sub> değerlerinde Resveratrol uygulayarak 48 saat etüvde inkübe ettikren sonra 48. saatte AnnexinV yöntemiyle yaptığımız apoptoz deneyinde kontrol hücrelerine oranla duyarlı Calu-1 hücrelerinde apoptotik oranı %52.7, dirençli Calu-1 hücrelerinde apoptotik oranı %62 olarak

bulundu ve bulduğumuz bu apoptoz oranlarının yaptığımız literatür taramasıyla elde ettiğimiz apoptoz oranlarıyla uyumlu olduğu belirlendi.

Resveratrol'un akciğer kanseri hücrelerinin ekspresyonu üzerindeki etkiyi araştırmak amacıyla etken maddenin Resveratrol olduğu çalışmalar yapılmış ve gen ekspresyon seviyelerine kıyaslanarak Resveratrol'un kanser gelişim üzerindeki etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Huixia Wang ve arkadaşları Resveratrol'un küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin (KHDAK) ortotopik sıçan dokularındaki tümör ilerlemesine etkisini araştırmak için bir çalışma yapmışlar ve yaptıkları bu çalışmada Resveratrol'un NSCLC ortotopik sıçan dokularındaki tümörlü genlerin ekspresyonunda anlamlı bir azalmaya yol açtığını saptamışlardır (Huixia Wang ve ark. 2020)

Wangping Li ve arkadaşları akciğer kanseri hücre hattı olan h446 hücre hattını Resveratrol ile muamele ettikten sonra H446 hücre hattındaki gen ekspresyonu üzerindeki etkilerini görmek amacıyla PCR analizi yapmış ve elde ettikleri veriler ışığında Bax geninin ekspresyonunda azalma olduğunu belirlemişlerdir. (Wangping Li ve ark. 2020)

Başka bir çalışmada Yan Lin ve arkadaşları Resveratrol'un ER stresi ve buna bağlı genlerin ekspresyonu üzerindeki etkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada kardiyomiyosit hipertrofinin Resveratrol tarafından inhibe edilmesinin ER stresini nasıl etkilediği araştırmışlar. ER stresi ve apoptotik faktörlerinin gen ekspresyonlarını belirlemek amacıyla yaptıkları PCR analizleri sonucunda Resveratrol'un GRP78, GRP94, CHOP, Bcl-2 ve Bax gen ifadelerinin azalmasına neden olduğunu belirtmişlerdir (Yan Lin ve ark. 2016)

Literatür taramaları yapıldığında Resveratrol'un etken madde olarak kullanıldığı ve GRP78 geninin ekspresyonunu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışma bulunmadığından bizim bu araştırmamızda GRP78 gen ekspresyon seviyesinin Yan Lin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada buldukları GRP78 gen ekspresyonu sonucuyla kıyasladığımızda duyarlı Calu-1 hücre hattındaki GRP78 gen

ekspresyonunun artış gösterdiği ve bu nedenle literatür ile uyumsuz olduğu , dirençli Calu-1hücre hattındaki GRP78 gen ekspresyon seviyesinin ise literatürde belirtildiği gibi bir azalma gösterdiği ve bu nedenle literatür ile uyumlu olduğu belirlendi. Bu konuda daha fazla çalışma yapılarak daha kesin sonuçların elde edilmesinin doğru olacağını düşünmekteyiz.



## Sonuç ve Öneriler

Resveratrol son 10 yılda birçok projede yer almış ve kanser türleri üzerinde de olumlu etkileri bulunan bir etken maddedir. Çoklu ilaç direnci kazanmış kanser hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda etken maddenin Resveratrol olduğu gruplarda ilaç dirençlerinin inhibe edilmesi konusunda oldukça başarılı olduğu gözlemlenmiştir. Dünyada en çok rastlanan kanser türü olan akciğer kanserinin farklı gruplarında da Resveratrol'un etken madde olduğu çalışmalar yapılmış ve hala yapılmaktadır. Bizde bir akciğer kanseri alt grubu olan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ( KHDAK ) hücre hattı olan Calu-1 hücreleriyle yaptığımız çalışmada Duyarlı Calu-1 hücre hattı ve Cisplatin'e karşı direnç kazanmış Calu-1 hücre hattıyla etken maddenin Resveratrol olduğu bu çalışmamızda yaptığımız Sitotoksitesite, apoptoz ve gen ekspresyonu deneyleri sonucunda Resveratrol'un Cisplatin'e karşı direnç kazanmış Calu-1 hücrelerinden elde edilen verilere bakarak çoklu ilaç direncinde üretimi artan ER stres şaperonu olan GRP78 geninin ekspresyonunda azalmaya yol açtığını belirledik. Resveratrol'un akciğer kanseri üzerindeki etkisini saptamak amacıyla yapılmış diğer çalışmalarla kıyasladığımızda çalışmamızın literatür ile uyumlu olduğunu gözlemledik. Buda bize Resveratrol'un akciğer kanserinin tedavisi açısından umut vaad eden bir etken madde olduğunu düşündürdü. Yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak Resveratrol'un akciğer kanseri tedavisinde kullanılabilirliğiyle ilgili daha çok çalışmanın yapılması ve böyle doğal etken maddelerin akciğer kanseri başta olmak üzere birçok kanserin tedavisinde kullanımına olanak sağlayabileceği değerlendirilmesini yaptık.

## Kaynaklar

- Anna M. Romaszko & Anna Doboszyńska (2018). Multiple primary lung cancer: A literature review **doi:** [10.17219/acem/68631](https://doi.org/10.17219/acem/68631)
- Bhurichaya Innets, Sunisa Thongsom, Korrakod Petsri, Satapat Racha, Masashi Yokoya, Sohsuke Moriue, Chatchai\_Chaotham & Pithi\_Chanvorachote (2022). Akt/mTORnnTargeting Activity of Resveratrol Derivatives in Non-Small Lung Cancer **doi:** [10.3390/molecules27238268](https://doi.org/10.3390/molecules27238268)
- Chang, C. H., Lee, C. Y., Lu, C. C., Tsai, F. J., Hsu, Y. M., Tsao, J. W. & Wang, C. C. (2017). Resveratrol-induced autophagy and apoptosis in cisplatin-resistant human oral cancer CAR cells: A key role of AMPK and Akt/mTOR signaling. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3866>
- Charles M. Rudin, Elisabeth Brambilla, Corinne Faivre-Finn & Julien Sage (2021). Small-cell lung cancer **doi:** [10.1038/s41572-020-00235-0](https://doi.org/10.1038/s41572-020-00235-0)
- Chen, H., Wang, X., & Gou, S. (2019). A cisplatin-based platinum(IV) prodrug containing a glutathione s-transferase inhibitor to reverse cisplatin-resistance in non-small cell lung cancer. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.01.014>
- Chengzhi Chen, Jiang X , Zhao W, & Zhang Z. (2013). Dual role of resveratrol in modulation of genotoxicity induced by sodium arsenite via oxidative stress and apoptosis **doi:** [10.1016/j.fct.2013.05.030](https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.030)
- Curran, W. J., Hirsch, F. R., Wu, Y.-L., Mulshine, J. L., Scagliotti, G. V., Paz-Ares, L.& Kwon, R. (2016). Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)30958-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)30958-8)

Çetinkaya, S., & Dursun, H. G. (2016). Cell Life and Death Decision in Endoplasmic Reticulum Stress. <https://doi.org/10.5505/sakaryamedj.2016.03371>

Dasari S. & Bernard Tchounwou (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

Fang Huang, Xiuxian Li, Na Zhao, Li Duan & Yu Chen (2018). Circulating GRP78 acts as a biomarker in the early diagnosis of lung cancer .  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6963050/>

Fan, W., Zhou, S., Cheng, W., Jiang, Y. & Luo, C. (2018). Glucose-Related Protein 78 Expression and Its Effects on Cisplatin-Resistance in Cervical Cancer. <https://doi.org/10.12659/msm.906413>

Hadeer M. Abdelaziz, Ahmed O. Elzoghby, Maged W. Helmy, Magda W. Samaha, Jia-You Fang & May S. Freag (2019). Liquid crystalline assembly for potential combinatorial chemo-herbal drug delivery to lung cancer cells  
**doi:** [10.2147/IJN.S188335](https://doi.org/10.2147/IJN.S188335)

Hidetaka Uromata , Kenji Sugio, Tsunehiro Oyama, Shoji Nakata, Kenji Ono, Takashi Yoshimastu, Masaru Morita & Kosei Yasumoto (2005). Expression and clinical significance of the endoplasmic reticulum molecular chaperone Grp78 in human lung cancer **doi:** [10.1016/j.lungcan.2004.12.011](https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2004.12.011)

Huixia Wang, Ruzhen Jia, Tianle Lv, Mei Wang, Shiwei He & Xia Zhang (2020). Resveratrol Suppresses Tumor Progression by Inhibiting the STAT3/HIF-1 $\alpha$ /VEGF Pathway in an Orthotopic Rat Model of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). **doi:** [10.2147/OTT.S259016](https://doi.org/10.2147/OTT.S259016)

Ibrahim M. Ibrahim, Doaa H. Abdelmalek & Abdo A. Elfiky (2019). GRP78: A cell's response to stress **doi:** [10.1016/j.ifs.2019.04.022](https://doi.org/10.1016/j.ifs.2019.04.022)

Irfan Maghfoor & Michael C Perry (2005). Lung cancer

**doi:** [10.5144/0256-4947.2005.1](https://doi.org/10.5144/0256-4947.2005.1)

Irina Fadejeva, Horst Olschewski & Andelko Hrzenjak (2017). MicroRNAs as regulators of cisplatin resistance in non-small cell lung carcinomas.

**doi:** [10.18632/oncotarget.22975](https://doi.org/10.18632/oncotarget.22975)

Jiaqiao Li, Yameng Fan, Yan Zhang, Yamei Liu, Yan Yu & Mao Ma (2022). Resveratrol Induces Autophagy and Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells by Activating the NGFR-AMPK-mTOR Pathway.

**doi:** [10.3390/nu14122413](https://doi.org/10.3390/nu14122413)

Jingjing Wu, Youqile Wu & Xuemei Lian (2020). Targeted inhibition of GRP78 by HA15 promotes apoptosis of lung cancer cells accompanied by ER stress and autophagy. **doi:** [10.1242/bio.053298](https://doi.org/10.1242/bio.053298)

Jun Hee Lee, Yeo Min Yoon & Sang Hun Lee (2017). GRP78 Regulates Apoptosis, Cell Survival and Proliferation in 5-Fluorouracil-resistant SNUC5 Colon Cancer Cells.

<https://ar.iiarjournals.org/content/37/9/4943.abstract>

Lauren Averett Byers & Charles M Rudin (2015). Small cell lung cancer: where do we go from here? **doi:** [10.1002/cncr.29098](https://doi.org/10.1002/cncr.29098)

Li, R., Yanjiao, G., Wubin, H., Yue, W., Jianhua, H., Huachuan, Z., ... Zhidong, L. (1935). Secreted GRP78 activates EGFR-SRC-STAT3 signaling and confers the resistance to sorafenib in HCC cells. [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget)

Lindsay G. Carter, John A. D'Orazio & Kevin J. Pearson (2014). Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence. doi: [10.1530/ERC-13-0171](https://doi.org/10.1530/ERC-13-0171)

Lucia Malaguarnera (2019). Influence of Resveratrol on the Immune Response doi: [10.3390/nu11050946](https://doi.org/10.3390/nu11050946)

Matthew B Schabath & Michele L Cote (2019). Cancer Progression and Priorities: Lung Cancer. doi: [10.1158/1055-9965.EPI-19-0221](https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-0221)

Mohammad Ahmad, Insu Frank Hahn & Satadal Chatterjee (2014). GRP78 upregulation leads to hypersensitivity to cisplatin in A549 lung cancer cells. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24982359/>

Narjust Duma, Rafael Santana-Davila & Julian R Molina (2019). Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis and Treatment. doi: [10.1016/j.mayocp.2019.01.013](https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.01.013)



Qi Wang, Zhongzhou He, Jinhui Zhang, Yingyan Wang, Tao Wang, Shuping Tong, Liju Wang, Shujing Wang & Yuhua Chen (2005). Overexpression of endoplasmic reticulum molecular chaperone GRP94 and GRP78 in human lung cancer tissues and its significance. doi: 10.1016/j.cdp.2005.09.010. Epub 2005 Nov 16.

Qing-Sheng Zhao, Ling-Ling Hu, Zhi-Dong Wang, Zhao-Pei Li, Ai-We Wang & Jing Liu (2017). Resveratrol-loaded folic acid grafted dextran stearate submicron particles exhibit enhanced antitumor efficacy in non-small cell lung cancers. doi: [10.1016/j.msec.2016.10.077](https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.10.077)

Sabina Galiniak, David Aebisher & Dorota Bartusik-Aebisher (2019). Health benefits of applying resveratrol. doi: [10.18388/abp.2018\\_2749](https://doi.org/10.18388/abp.2018_2749)

Shaloam Dasari & Paul Bernard Tchounwou (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. doi: [10.1016/j.ejphar.2014.07.025](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025)

Shengkai Xia, Wenzhe Duan, Wenwen Liu, Xinri Zhang & Qi Wang (2021). GRP78 in lung cancer. doi: [10.1186/s12967-021-02786-6](https://doi.org/10.1186/s12967-021-02786-6)

Sonam Mittal & Maitreyi S Rajala (2020). Heat shock proteins as biomarkers of lung cancer. doi: [10.1080/15384047.2020.1736482](https://doi.org/10.1080/15384047.2020.1736482)

Song Hu ,Xiaolin Li , Rongrong Xu , Lingyun Ye , Hui Kong , Xiaoning Zeng , Hong Wang, & Weiping Xie (2016). The synergistic effect of resveratrol in combination with cisplatin on apoptosis via modulating autophagy in A549 cells. doi: [10.1093/abbs/gmw026](https://doi.org/10.1093/abbs/gmw026)

Sumit Ghosh (2019). Cisplatin: First metal-based anticancer drug. doi: [10.1016/j.bioorg.2019.102925](https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.102925)

Wang, S., Meng, Q., Xie, Q. & Zhang, M. (2017). Effect and mechanism of resveratrol on drug resistance in human bladder cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6111>

Wangping Li, Chunmei Li, Lijie Ma & Faguang Jin (2020). Resveratrol inhibits viability and induces apoptosis in small cell lung cancer H446 cell line via the PI3K/Akt/c-Myc pathway. doi: [10.3892/or.2020.7747](https://doi.org/10.3892/or.2020.7747)

Xuemei Li, Kezhong Zhang & Zihai Li (2011). Unfolded protein response in cancer: the physician's perspective. doi: [10.1186/1756-8722-4-8](https://doi.org/10.1186/1756-8722-4-8)

Yameng Fan, Jiaqiao Li, Yuxuan Yang, Xiaodan Zhao, Yamei Liu, Yude Jiang, Long Zhou, Yang Feng, Yan Yu & Yilong Cheng (2020). Resveratrol modulates apoptosis and autophagic death of human lung adenocarcinoma A549 cells via a p53-dependent pathway: Integrated bioinformatics analysis and experimental validation. doi: [10.3892/ijo.2020.5107](https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5107)

Yan Lin, Jingbin Zhu, Xiaojie Zhang, Jun Wang, Wei Xiao, Bo Li, Li Jin, Jie Lian, Li Zhou & Jicheng Liu (2016). Inhibition of Cardiomyocyte Hypertrophy by Resveratrol Associated with Improvement of Endoplasmic Reticulum Stress. doi: [10.1159/000447788](https://doi.org/10.1159/000447788)

Yong Li, Yanxia Yang, Xiaoping Liu, Yiwen Long & Yonghua Zheng (2019). PRMT5 Promotes Human Lung Cancer Cell Apoptosis via Resveratrol-Stimulated Akt/Gsk3 $\beta$  Signaling. doi: [10.1177/0963689719885083](https://doi.org/10.1177/0963689719885083)

Yuwen Wang, Songyun Zou, Zhuyun Zhao, Po Liu, Changneng Ke & Shi Xu (2020). New insights into the development and treatment of small cell lung cancer. doi: [10.1002/cbin.11359](https://doi.org/10.1002/cbin.11359)

Zhang X, Xu C, Yu C, Chen W. & Li Y. (2014). Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. World J Gastroenterol 21: 1768-1776

Zhenhua tavası, Hongyu Liu & Jun Chen (2022). Lung Cancer Stem-Like Cells and Drug Resistance. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2022.102.02.

## **Ekler**

Araştırmada kullanılan “Etik Kurul Onay Belgesi”, “Gönüllü Onam Formu”, “Olgu Rapor Formu” eklenmeli ve araştırmacının gerekli gördüğü diğerk belgeler bu bölümde belirtilmelidir.



## Teşekkür

Ege Üniversite Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladığım günden bu güne kadar benden desteğini hiç esirgemeyen her konuda elinden gelen yardımı yapan çok kıymetli danışman hocam **Sn. Doç.Dr. F. Zuhale EROĞLU** ve Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı **Sn. Prof.Dr. Cumhur GÜNDÜZ'e** sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans hayatım boyunca tanımaktan onur duyduğum ve yaptıkları çalışmalarda azim ve sabırlarına hayran olduğum, ihtiyacım olan her konuda yardım isteğimi geri çevirmeyip ellerinden gelen her yardımı en iyi şekilde yapan, hem arkadaşım hem yol gösterenim olan, Doktora Öğrencisi **Sn. Büşra BARA'ya**, Doktora Öğrencisi **Sn.Semahat ÇELİKTEN'e**, Doktora Öğrencisi **Sn.Ayşe ÇEKİN'e**

Yüksek lisansa başladığım günden beri hem tez çalışmamda hem de sosyal hayatımda her zaman yanımda olan laboratuvar yöntemlerindeki bilgilerinden tez yazmadaki deneyimlerine kadar her konuda elinden geleni sonuna kadar yapan çok değerli Doktora Öğrencisi **Sn. Ayşhan GULMALIYEVA'ya**, laboratuvar çalışmalarında hem yardımlarıyla hem de sunduğu önemli bilgilerle elim kolum olan kıymetli arkadaşlarım Yüksek Lisans Öğrencisi **Sn. Besne ÇELİK'e** ve Yüksek Lisans Öğrencisi **Sn. Hilal BAŞYEĞİT'e**

Hayatım boyunca hep yanımda olan attığım her adım ve aldığım her kararda beni sonsuz destekleyen ve sonuç ne olursa olsun hep arkamda duran, bugünlere gelebilmem için ellerinden gelen her fedakarlığı yapan ve eşsiz sevgilerini benden hiç esirgemeyen hayatın bana bahsettiği en büyük hediye olan **Canım Ailem'e**

Sonsuz minnet ve Teşekkürlerimi sunarım...

İzmir, 7.09.2023

Cansu ÇANKAYA

## **Özgeçmiş**

2015 yılında Zonguldak Bülent Ecevit Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünde başladığım lisan eğitimi hayatımı 2019 yılında bu bölümden mezun olarak bitirdim. 2020 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilimdalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.

E posta:

