

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

**CETUXİMABIN TEK BAŞINA ve EPİRUBİCİN ile BİRLİKTE PARENTAL ve
EPİRUBİCİN DİRENÇLİ KARACİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE
SİTOTOKSİK ve APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşe ERDOĞAN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2016

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

**CETUXİMABİN TEK BAŞINA ve EPİRUBİCİN ile BİRLİKTE PARENTAL ve
EPİRUBİCİN DİRENÇLİ KARACİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE
SİTOTOKSİK ve APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşe ERDOĞAN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 2014.03.0121.004 no'lu proje ile desteklenmiştir.)**

2016

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

**CETUXİMABİN TEK BAŞINA ve EPİRUBİCİN ile BİRLİKTE PARENTAL ve
EPİRUBİCİN DİRENÇLİ KARACİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE
SİTOTOKSİK ve APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşe ERDOĞAN

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

Bu tez .27./05./2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Aysun ÖZKAN

Prof.Dr. Kayahan FIŞKIN

Doç.Dr. Esra MANGUOĞLU

Doç.Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN

Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

ÖZET

CETUXIMABIN TEK BAŞINA ve EPİRUBICIN ile BİRLİKTE PARENTAL ve EPİRUBICIN DİRENÇLİ KARACİĞER KANSERİ HÜCRELERİNDE SİTOTOKSİK ve APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Ayşe ERDOĞAN

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman: Prof.Dr. Aysun ÖZKAN
Haziran 2016, 101 sayfa

Bu çalışmada, epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) hedeflendirilmiş bir monoklonal antikor olan cetuximabın, tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte parental karaciğer kanseri hücreleri (P-Hep G2) ve epirubicin-HCl dirençli karaciğer kanseri (R-Hep G2) hücreleri üzerine sitotoksik, antiproliferatif, hücre döngüsünü bloke edici, oksidatif stres yaratma, apoptotik etkisi ve etki mekanizmaları araştırılmıştır.

Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte hücreler üzerine sitotoksik etkisi Cell Titer-Blue^R Hücre Canlılığı ve Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivite testleri ile belirlenmiştir. Cetuximab ve epirubicin-HCl'nin IC₅₀ değerleri (hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonu) P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücrelerinde sırasıyla cetuximab için 1000 µg/ml ve 2279 µg/ml olarak hesaplanırken epirubicin-HCl için ise 0.80 µg/ml ve 0.95 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulanması hem P-Hep G2 hem de R-Hep G2 hücrelerinde sitotoksik etkiyi arttırmıştır. P-Hep G2 hücrelerinde en etkili sitotoksik etki gösteren kombinasyon IC₅₀ cetuximab + IC₄₀ epirubicin-HCl bulunurken, R-Hep G2 hücrelerinde ise IC₅₀ cetuximab + IC₅ epirubicin-HCl kombinasyonu bulunmuştur. Hücre membran bütünlüğünün bozulması sonucu salınan sitoplazmik bir enzim olan laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesindeki en fazla artış hem P-Hep G2 hem de R-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulanmasında görülmüştür. Cetuximab ve epirubicin-HCl birlikte uygulandığında glutatyon peroksidaz aktivitesinin kontrol grubu hücrelerine göre P-Hep G2 hücrelerinde 1.75 kat, R-Hep G2 hücrelerinde ise 2.3 kat arttığı gözlenmiştir. Apoptotik yolağın anahtar enzimlerinden biri olan kaspaz-3/7 aktivitesi 72 saatlik cetuximab uygulaması sonunda P-Hep G2 hücrelerinde kontrole göre 3 kat artarken cetuximab epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında yaklaşık olarak 4.7 kat artışın olduğu bulunmuştur. Cetuximab kaspaz-3/7 aktivitesinde R-Hep G2 hücrelerinde kontrole göre 1.5 kat artışa neden olurken epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında yaklaşık olarak 2.5 kat artışa neden olmuştur.

Antiproliferatif etkiyi ortaya koyan proliferasyon hücre nükleer antijeninin (PCNA) ve hücre döngüsünü durdurucu etkiye sahip olan siklin D1 mRNA ekspresyonlarının azalmasında P-Hep G2 hücrelerinde tek başına cetuximab uygulaması daha etkili olmuştur. R-Hep G2 hücrelerinde ise cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasının daha etkili olduğu görülmüştür. Pro-apoptotik bir gen olan Bax mRNA'sının ekspresyonu her iki uygulamada da hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre artmıştır. Cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasının tek başına cetuximab uygulamasına göre apoptozda daha

etkili olduğu bulunmuştur. Cetuximab epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında anti-apoptotik bir gen olan Bcl-2 ekspresyonu hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde tek başına cetuximab uygulamasına göre daha fazla azalmıştır. Dolayısıyla, hem tek başına cetuximab uygulaması hem de cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulaması her iki hücrede Bax/Bcl-2 oranında artışa neden olmuştur.

P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücrelerine cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasından elde edilen sonuçlar birlikte uygulamanın tek başına uygulamaya göre sitotoksik etkide ve apoptozun uyarılmasında daha etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, birlikte uygulama hücrelerin ilaç direnç özelliğine göre pro-apoptotik/anti-apoptotik genlerin ekspresyonları üzerinde farklı etki göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: Cetuximab, Epirubicin-HCl, Kombine uygulama, Apoptotik etki, Karaciğer kanseri

JÜRİ: Prof.Dr. Aysun ÖZKAN (Danışman)
Prof.Dr. Kayahan FIŞKIN
Doç.Dr. Esra MANGUOĞLU
Doç.Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN
Doç. Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

ABSTRACT

INVESTIGATION of CYTOTOXIC and APOPTOTIC EFFECTS of CETUXIMAB ALONE and with EPIRUBICIN on PARENTAL and EPIRUBICIN RESISTANT LIVER CANCER CELLS

Ayşe ERDOĞAN

Ph.D. Thesis in Biology

Supervisor: Prof.Dr. Aysun ÖZKAN

June 2016, 101 pages

In this study, cytotoxic, antiproliferative, cell cycle inhibitive, oxidative stress generation and apoptotic effects and effect mechanisms of cetuximab, which is a monoclonal antibody targeted to epidermal growth factor receptor (EGFR), alone and together with epirubicin-HCl on parental liver cancer cells (P-Hep G2), and epirubicin-HCl resistant liver cancer cells (R-Hep G2) were investigated.

Cytotoxic effects of cetuximab alone and together with epirubicin-HCl on cells were determined by Cell Titer-Blue^R Cell Viability and Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity tests. IC₅₀ values (concentration that kills 50% of cells) of cetuximab and epirubicin-HCl in P-Hep G2 and R-Hep G2 cells were calculated respectively for cetuximab 1000 mg/ml and 2279 mg/ml while they were calculated as 0.80 mg/ml and 0.95 mg/ml for epirubicin-HCl. Cetuximab with epirubicin-HCl treatment increased the cytotoxic effect on both P-Hep G2 and R-Hep G2 cells. While IC₅₀ cetuximab + IC₄₀ epirubicin-HCl was found to be the combination that showed the most effective cytotoxic effect on P-Hep G2 cells, on R-Hep G2 cells IC₅₀ cetuximab + IC₅ epirubicin-HCl combination was the most effective. The maximum increase in cytoplasmic enzyme lactate dehydrogenase (LDH) activity, which is a cytoplasmic enzyme released as a result of the disruption of the cell membrane integrity, was observed with cetuximab with epirubicin HCl treatment both in P-Hep G2 and R-Hep G2 cells. When cetuximab was treated together with epirubicin-HCl, glutathione peroxidase activity was observed to increase 1.75 times in P-Hep G2 cells while it increased 2.3 times in R-Hep G2 cells compared to the control group cells. At the end of 72 hours of cetuximab treatment to P-Hep G2 cells, caspase-3/7, which is one of the key enzymes of apoptotic pathway, activity increased 3 times in comparison to control group while the increase was found to be approximately 4.7 times in cetuximab treated together with epirubicin-HCl. Cetuximab caused an increase on caspase-3/7 activity 1.5 times in R-Hep G2 cells compared to the control group although when treated together with epirubicin-HCl the increase was found to be approximately 2.5 times compared to control group.

Cetuximab treatment by itself was more effective in P-Hep G2 cells in decreasing proliferating cell nuclear antigen (PCNA) revealing antiproliferative effect, and cyclin D1 mRNA expressions which have cell cycle inhibiting effect. As for R-Hep G2 cells, cetuximab with epirubicin HCl treatment was found to be more effective. mRNA expression of Bax, which is a pro-apoptotic gene, increased in both treatments to both P-Hep G2 cells and R-Hep G2 cells compared to the control group cells. In apoptosis, cetuximab with epirubicin HCl treatment has been found to be more effective compared

to cetuximab treatment by itself. The expression of Bcl-2 which is an anti-apoptotic gene when it is treated with cetuximab with epirubicin HCl, decreased more both in P-Hep G2 cells and R-Hep G2 cells compared to cetuximab treatment by itself. Therefore, both cetuximab treatments by itself and cetuximab with epirubicin-HCl treatment caused increases Bax/Bcl-2 ratio in both cells.

Results obtained from the treatment of cetuximab in combination with epirubicin-HCl to P-Hep G2 and R-Hep G2 cells showed that treatment of the combination was more effective in the cytotoxic effects and inducing apoptosis comparison to applying cetuximab by itself. Also, combination treatment showed different effects on pro-apoptotic/anti-apoptotic genes expression according to cells drug resistance properties.

KEYWORDS: Cetuximab, Epirubicin-HCl, Combined treatment, Apoptotic effects, Liver cancer

COMMITTEE: Prof.Dr. Aysun ÖZKAN (Supervisor)
Prof.Dr. Kayahan FIŞKIN
Assoc.Prof.Dr. Esra MANGUOĞLU
Assoc.Prof.Dr. Gizem DÖNMEZ YALÇIN
Assoc.Prof.Dr. Ayşe Gül MUTLU GÜLMEMİŞ

ÖNSÖZ

Hepatosellüler karsinom (HCC), primer karaciğer kanserlerinin en yaygın histolojik formudur. Hepatosellüler karsinom her yıl yaklaşık 435.000 yeni vakanın teşhis edildiği en sık rastlanan beşinci kanser türüdür. Bu veriler tüm kanser vakalarının %5.4'ünü oluşturmaktadır. Kanser türleri içerisinde ölüme sebep olmada dördüncüdür. HCC'nin kötü prognozu yüzünden ve klinikte ortaya çıkan sorunların çok çeşitli olmasından dolayı tedavi edilememektedir. HCC tedavisinde en sık kullanılan yöntem olan cerrahi sonrası hastalık %70 gibi yüksek bir oran ile 5 yıl içinde yeniden nüks edebilmektedir. Sağ kalım oranları karaciğer nakli ile artış göstermesine rağmen donör bulmadaki sıkıntılarda bunu sınırlamaktadır. Ayrıca, ileri evre hastalarına karaciğer nakli veya cerrahi müdahale genelde uygulanmamaktadır. HCC'li hastaların hayatta kalma oranlarının artırılması için ve kullanılan mevcut tedavi yöntemlerinin başarı oranlarının artırılması için yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi zorunludur.

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan en önemli metotlardan biri kemoterapidir. Kemoterapide kullanılan epirubicin-HCl gibi pek çok ilaca karşı geliştirilen direnç kemoterapinin amacına ulaşmasını engellemektedir. Bu yüzden in-vitro çalışmaları planlarken mutlaka parental hücrelerle birlikte ilaca dirençli hücrelerinde göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Son zamanlarda kanser tedavisinde başarı oranını azaltan ilaç direncinin üstesinden gelmek için farklı etki mekanizması olan ilaçların kombine kullanıldığı tedavi yöntemlerinin araştırılması oldukça ilgi çekmektedir. Ayrıca, moleküler onkolojideki önemli gelişmeler güncel terapötik yaklaşımlara yeni boyutlar kazandırarak 'hedeflenmiş kanser tedavisi' kavramının gündeme gelmesini sağlamıştır. Çeşitli antikör ve küçük molekül inhibitörlerinin oluşturduğu hedeflenmiş terapötikler ise 'seçici hedefleri' nedeniyle 'özgül-moleküler defekti' olan tümör hücrelerine yönelerek kanser hücresini öldürürken normal hücrelerin sağlıklı bir ortamda devamına imkân tanımaktadırlar. Bu nedenle 'terapötik indeksleri yüksek' olan hedeflenmiş tedaviler günümüzde oldukça dikkat çekmektedir. Fakat bir monoklonal antikör olan cetuximab gibi hedeflendirilmiş kemoterapötikler yüksek konsantrasyonlarda tek başına tedavide kullanıldığında deri toksisitesi gibi pek çok yan etkilere neden olabilmektedirler. Hedeflendirilmiş kemoterapötikler ile standart kemoterapi ajanlarının birlikte uygulamaları sonucunda kanser tedavisinde yeni stratejilerin ortaya çıkması sağlanabilir. Hedeflendirilmiş kemoterapötiklerin düşük dozlarda etkinliği artırılarak yan etkileri azaltılabilir ve tedavide istenen başarıya ulaşılabilir. Çalışmamızda parental ve epirubicin-HCl'e dirençli Hep G2 hücrelerine (insan karaciğer kanseri hücresi) cetuximab ve kardiyotoksik etkisi diğer antrasiklinlere göre daha az olan epirubicin-HCl birlikte uygulanmıştır.

Çalışmamızdan elde edilen sonuçların, parental ve ilaca dirençli hücrelerin cetuximabın tek ve epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasına verdikleri cevapların farklılığına dikkat çekerek tedavide yeni stratejilerin belirlenmesine yardımcı olmasını ve literatür bilgisine katkıda bulunmasını dilerim.

Bana bu çalışmada araştırma olanağı sağlayan ve çalışmalarım aşamasında önerileri ile beni yönlendirip destek olan danışman hocam Sayın Prof.Dr. Aysun Özkan'a (Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü) teşekkürlerimi sunarım. Bilgilerinden yararlandığım Prof.Dr. Kayahan Fışkın'a (Akdeniz Üniversitesi, Biyoloji Bölümü),

Doç.Dr. Mehmet Akif Kılıç'a (Akdeniz Üniversitesi, Biyoloji Bölümü) ve Doç.Dr. Esra Manguoğlu'na (Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi), çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Laboratuvarı çalışanlarına (Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi), doktora eğitimim boyunca 2211 Yurt İçi Doktora Burs Programından yararlandığım TÜBİTAK'a ve bana her konuda destek olan ve fedakarlıklarını esirgemeyen aileme-canım babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Projemi destekleyen (2014.03.0121.004 no'lu proje) Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkürlerimi sunuyorum.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURUMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI.....	2
2.1. Hepatosellüler Karsinom.....	2
2.1.1. Hepatosellüler karsinomun moleküler patogenezeine genel bakış.....	2
2.1.2. Genetik anormallikler.....	4
2.1.3. Standart HCC tedavileri.....	4
2.1.4. Karaciğer kanserinde bozulmuş olan sinyal yolları.....	6
2.1.5. HCC’de moleküler tedavilerin ortaya çıkışı.....	9
2.1.6. HCC’de kombinasyon tedaviler.....	9
2.2. Cetuximab (Erbix).....	10
2.2.1. Cetuximabın kullanımı ve yan etkileri.....	12
2.2.2. Cetuximabın antitümör aktivitesinin altında yatan mekanizmalar.....	12
2.2.2.1. Cetuximab tarafından EGFR sinyal iletiminin inhibisyonu.....	13
2.2.3. Cetuximab tedavisine cevapsız kalmanın olası mekanizmaları ve cetuximab kullanımında hasta seçimi.....	13
2.2.3.1. Cetuximaba cevapsız kalmada Kirsten Ras Sarcoma viral onkogen (KRAS) mutasyonunun potansiyel rolü.....	14
2.2.3.2. Cetuximab uygulamasına verilen cevapta etkili olan diğer genetik belirteçler.....	14
2.2.4. Cetuximab tedavisinde deri toksisitesi ve ekonomik sorunlar.....	15
2.3 Epirubicin-HCl.....	15
2.3.1. Epirubicin-HCl’nin kimyasal yapısı.....	16
2.3.2. Epirubicin-HCl’nin etki mekanizması, farmakokinetiği ve antineoplastik aktivitesi.....	16
2.4. Apoptoz.....	17
2.4.1. Apoptozun tanımlanması.....	17
2.4.2. Apoptozu uyaran sinyaller.....	17
2.4.3. Apoptozda hücre içi sinyal iletimi ve metabolik değişiklikler.....	18
2.4.4. Apoptozun moleküler düzenleyicileri.....	18
2.4.4.1. Kaspazlar.....	18
2.4.4.2. Bcl-2 ailesi.....	19
2.4.5. Apoptoz sürecinin değerlendirilmesi.....	20
2.4.5.1. Apoptoz sürecinin hücre içi veya hücre dışı uyarılarla tetiklenmesine göre değerlendirilmesi.....	20
2.4.5.1.1. Ekstrinsik yol (reseptör aracılığı ile apoptoz).....	21
2.4.5.1.2. İntrinsik yol (mitokondri aracılığı ile apoptoz).....	21
2.4.5.1.3. Endoplazmik retikulum aracılığı ile apoptoz.....	22
2.4.6. Apoptoz belirleme yöntemleri.....	23
2.4.7. Kanser ve apoptoz.....	24

2.5. Oksidatif Stres	24
2.5.1. Serbest radikaller	25
2.5.2. Reaktif oksijen radikalleri	25
2.5.3. Serbest radikallerin yol açtığı hasarlar	25
2.5.4. Antioksidan savunma sistemleri.....	26
2.5.4.1. Glutasyon peroksidaz (GPx)	27
2.6. Laktat Dehidrogenaz	28
2.7. Hücre Döngüsü.....	28
2.7.1. Siklin alt üniteleri ve CDK-siklin kompleksleri.....	29
2.7.2. Büyüme faktörleri ve D siklinler.....	30
2.8. Kanserde İlaç Direnç Mekanizmaları.....	31
3. MATERYAL ve METOT	34
3.1. Hepatoma G2 Hücrelerinin Çoğaltılması ve Dondurulması	34
3.2. Çalışmalarda Kullanılan Cetuximab ve Epirubicin-HCl.....	34
3.3. Sitotoksikite Ölçümleri	34
3.3.1. Hücre canlılığı testi	34
3.3.2. Laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite deneyi.....	35
3.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivitelerinin Ölçülmesi	36
3.5. Kaspaz 3/7 Aktivitelerinin Belirlenmesi	37
3.6. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	39
3.6.1. mRNA izolasyonu	39
3.6.2. cDNA sentezi	39
3.6.3. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)	39
3.6.4. Agaroz jel elektroforezi.....	40
3.7. İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR	41
4.1. Parental Hücrelerden İlaç Dirençli Hep G2 Hücrelerinin Oluşturulması	41
4.2. Cetuximabın Tek Başına ve Epirubicin-HCl ile Birlikte Parental Hep G2 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	41
4.2.1. Hücre canlılığı testi	41
4.2.2. Laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite ölçümü	45
4.3. Cetuximabın Tek Başına ve Epirubicin-HCl ile Birlikte İlaç Dirençli Hep G2 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi	47
4.3.1. Hücre canlılığı testi	47
4.3.2. İlaç dirençli Hep G2 hücrelerinde laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite ölçümü	50
4.4. Cetuximabın Tek Başına ve Epirubicin-HCl ile Birlikte Parental ve İlaç Dirençli Hep G2 Hücrelerinde Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Ölçülmesi	51
4.5. Parental ve İlaç Dirençli Hep G2 Hücrelerinde Cetuximabın Tek Başına ve Epirubicin-HCl ile Birlikte Kaspaz-3/7 Enzim Aktivitesine Etkisinin Ölçülmesi.....	54
4.6. Parental ve İlaç dirençli Hep G2 Hücrelerinde Cetuximabın Tek Başına ve Epirubicin-HCl ile Birlikte Prolifere Hücre Nükleer Antijeni (PCNA), Siklin D1, Bax ve Bcl-2 Genlerinin İfade Düzeylerine Etkisi	55

5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ	74
7. KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

α	Alfa
bp	Baz Çifti
β	Beta
dH ₂ O	Distile Su
CO ₂	Karbondioksit
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
kDa	Kilodalton
L	Litre
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
μ mol	Mikromol
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimol
ng	Nanogram
nm	Nanometre
nmol	Nanomol
K ₂ HPO ₄	Potasyum di Fosfat
KH ₂ PO ₄	Potasyum mono Fosfat
°C	Santigrat Derece
cm ²	Santimetrekare
%	Yüzde

Kısaltmalar

5-FU	5-Fluorouracil
ABC	ATP Bağlayan Kaset
AIF	Apoptoz Uyarıcı Faktör
APAF 1	Apoptotik Proteaz Aktivatör Faktör 1
APC	Antijen-Sunan Hücreler
AuNP	Altın Nanopartikülleri
Bcl-2	B-Hücre Lösemi 2
BCRP	Meme Kanseri Direnç Proteini
BSA	Bovine Serum Albumin
CAD	Kaspaz ile Aktive Olan DNaz
CAK	CDK Aktive Edici Kinaz
c-AMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CDC	Hücre Bölünme Döngüsü Kinazı
CDK	Siklin Bağımlı Kinaz Proteini
cDNA	Komplementer DNA
COX-2	Siklooksijenaz-2
CTL	Sitotoksik Lenfosit
DC	Dentritik Hücreler

DED	Ölüm Etkili Domain
DIABLO	Düşük pI 'da Doğrudan IAP'ye Bağlanan Protein
DISC	Ölüm İndüleyen Sinyal Kompleksi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleotid Trifosfat
EDTA	Tripsin-Etilendiamin Tetraasetik Asit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ESCC	Özofagus Skuamöz Karsinom
FADD	Fas İlişkili Ölüm Domaini
Fas L	Fas Ligandı
FOLFOX5	Fluorouracil, Leucovorin Ve Oxaliplatin
G6PD	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
GAPDH	Gliseraldehit 3-Fosfat Dehidrogenaz
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
GSSG	Oksitlenmiş Glutasyon
GST	Glutasyon-S-Transferaz
GTP	Guanozin Trifosfat
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HBV	Hepatit B Virüsü
HCC	Hepatosellüler Karsinom
HCV	Hepatit C Virüsü
Hep G2	Hepatoma G2
HGF	Hepatosit Büyüme Faktörü
HMG-CoA	Beta-Hidroksi-Beta-Metil-Glutaril-Koenzim A
HNSCC	Baş ve Boyun Skuamöz Hücreli Karsinom
HO ₂	Hidroperoksil
HOCl	Hipoklorik Asit
HPV	Human Papilloma Virüsü
IAP	Apoptoz İnhibitör Proteinleri
IC ₅	Hücrelerin %5'ini Öldüren Konsantrasyon
IC ₁₀	Hücrelerin %10'nunu Öldüren Konsantrasyon
IC ₂₀	Hücrelerin %20'sini Öldüren Konsantrasyon
IC ₃₀	Hücrelerin %30'unu Öldüren Konsantrasyon
IC ₄₀	Hücrelerin %40'ını Öldüren Konsantrasyon
IC ₅₀	Hücrelerin %50'sini Öldüren Konsantrasyon
ICAD	Kaspaz ile Aktive Olan DNaz İnhibitörü
IGF-2	İnsülin-Benzeri Büyüme Faktörü-2
KRAS	Kirsten Ras Sarcoma Viral Onkogen
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LOOH	Lipid Peroksit
LRP	Akciğer Direnç Proteini
mAb	Monoklonal Antikor
MAPK	Mitojen-Aktive Protein Kinaz
MAPKK	Mitojen-Aktive Protein Kinaz Kinaz
MDR	Çoklu İlaç Direnci

MDR1	Çoklu-İlaç Direnci Proteini
MEM	Minimum Essential Medium
Mn SOD	Mangan Süperoksit Dismutaz
mRNA	Mesajcı RNA
MRP	MDR-İlişkili Protein
mTOR	Rapamisinin Memeli Hedefi
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid'in İndirgenmiş Formu
NADP ⁺	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NADPH	Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NF-κB	Nuklear Faktör Kappa Beta
NK	Doğal Öldürücü Hücreler
NO [·]	Nitrik Oksit
NO ₂	Nitrojen Dioksit
NOX4	Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz 4
NSCLC	Küçük Olmayan Hücreli Akciğer Kanseri
O ₂ ^{-·}	Süperoksit Anyonu
OH [·]	Hidroksil Radikali
ONOO ⁻	Peroksinitrit
OSCC	Oral Skuamöz Hücre Karsinoması
PARP	ADP-Riboz Polimeraz
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
PCNA	Prolifere Hücre Nükleer Antijeni
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	Platelet Türevli Büyüme Faktörü
PDGFR	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü Reseptörü
P-gp	P-Glikoprotein
P-Hep G2	Parental Hep G2
PL-GPx	Fosfolipid Hidroperoksit Glutasyon Peroksidaz
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homolog
RFU	Relative Fluorescent Unit
R-Hep G2	Epirubicin-HCl Dirençli Hep G2
RNA	Ribonükleik Asit
RNT	Reaktif Nitrojen Türevleri
ROO [·]	Peroksil Radikali
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Se-GPx	Selenyuma Bağımlı GPx
SH	Standart Hata
SMAC	Mitokondriden Türemiş Kaspaz Aktivatörü
SOD	Süperoksit Dismutaz
TACE	Transarteryal Kemoembolizasyonu
TBE	Tris Base Edta
TERS	Telomeraz Ters Transkriptaz
TGF-β	Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta
TGF-α	Transforme Edici Büyüme Faktörü-Alfa
TK	Tirozin Kinaz

TKI	Tirozin Kinaz İnhibitörü
TKRs	Membranöz Tirozin Kinaz Reseptörleri
TNF	Tümör Nekrozis Faktör
TRADD	Trail Reseptör İlişkili Ölüm Domaini
UIRNP	U1 Ribonükleoprotein
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. HCC'nin moleküler patogenezinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 2.2. HCC için geliştirilmiş olan moleküler hedefli tedaviler	7
Şekil 2.3. EGFR yolu. EGFR'ye ligand bağlanması dimerizasyon ile sonuçlanır. Başarılı dimerizasyon hücre proliferasyonu ile sonuçlanan kaskadın başlamasına neden olur	10
Şekil 2.4. EGFR'nin (HER1) normal ekspresyonu (A) ve EGFR'nin aşırı ekspresyonu (B)	11
Şekil 2.5. Monoklonal antikor cetuximab	11
Şekil 2.6. Cetuximabın EGFR'ye bağlanarak dimerizasyonu ve aşağı yöndeki kaskadı engellemesi.....	11
Şekil 2.7. Epirubicin-HCl'nin kimyasal yapısı	16
Şekil 2.8. Kaspaz aktivasyonu	18
Şekil 2.9. Apoptozda oluşan erken ve geç morfolojik değişiklikler	20
Şekil 2.10. Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile tetiklenen apoptoz yolu	21
Şekil 2.11. Mitokondri aracılığı ile tetiklenen apoptoz yolu.....	22
Şekil 2.12. Endoplazmik retikulum aracılığı ile tetiklenen apoptoz yolu	23
Şekil 2.13. Her bir yöntemin, apoptoz sürecinde görev alan organellere göre dağılımı. 23	
Şekil 2.14. Serbest radikallerin hücre içi kaynakları	25
Şekil 2.15. Selenyuma bağımlı glutatyon peroksidazın tepkime mekanizması.....	27
Şekil 2.16. Fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidazın tepkime mekanizması	27
Şekil 2.17. Laktat dehidrogenazın tepkime mekanizması.....	28
Şekil 2.18. CDK aktivasyonu ve hedef proteinin fosforilasyonu	29
Şekil 2.19. CDK aktivitesinin moleküler organizasyonu.....	30
Şekil 3.1. DEVD dizisini içeren luminogenic substratının kaspaz- 3/7 bölünmesi	38
Şekil 4.1. P-Hep G2 hücrelerinde artan cetuximab konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı	42

Şekil 4.2. P-Hep G2 hücrelerinde artan epirubicin-HCl konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı.....	43
Şekil 4.3. Cetuximabın epirubicin-HCl (IC ₅ , IC ₁₀ , IC ₂₀ , IC ₃₀ , IC ₄₀) ile birlikte P-Hep G2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi	44
Şekil 4.4. NADH standart grafiği.....	45
Şekil 4.5. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte P-Hep G2 hücrelerinde LDH aktivitesi üzerine etkisi	46
Şekil 4.6. R-Hep G2 hücrelerinde artan cetuximab konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı.....	47
Şekil 4.7. R- Hep G2 hücrelerinde artan epirubicin-HCl konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı.....	48
Şekil 4.8. Cetuximabın epirubicin-HCl (IC ₅ , IC ₁₀ , IC ₂₀ , IC ₃₀ , IC ₄₀) ile birlikte R-Hep G2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi.....	50
Şekil 4.9. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte R-Hep G2 hücrelerinde LDH aktivitesi üzerine etkisi	51
Şekil 4.10. BSA standart grafiği	52
Şekil 4.11. P-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesine etkisi.....	52
Şekil 4.12. R-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesine etkisi.....	53
Şekil 4.13. P-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte kaspaz-3/7 enzim aktivitesine etkisi	54
Şekil 4.14. R-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte kaspaz-3/7 enzim aktivitesine etkisi	55
Şekil 4.15. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile GAPDH'ın mRNA ekspresyonu.....	56
Şekil 4.16. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile PCNA'nın mRNA ekspresyonu.....	57
Şekil 4.17. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile siklin D1'in mRNA ekspresyonu.....	57
Şekil 4.18. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile Bax'ın mRNA ekspresyonu	58
Şekil 4.19. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile Bcl-2'nin mRNA ekspresyonu.....	59
Şekil 4.20. Tüm hücrelerde karşılaştırmalı PCNA, siklin D1, Bax ve Bcl-2 mRNA	

ekspresyon seviyeleri 59



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Hepatosellüler karsinomada belirlenen anahtar moleküler anormallikler	5
Çizelge 2.2. Kanser tedavisinde klinik olarak geliştirilmiş moleküler hedefli ajanlar	8
Çizelge 2.3. Cetuximab bileşimi	12
Çizelge 2.4. Hücre Döngüsü evrelerine göre siklinler ve CDK partnerleri	29
Çizelge 3.1. RT-PCR’da kullanılan oligonukleotidler	40
Çizelge 4.1. Uygulanan epirubicin-HCl konsantrasyonları	41
Çizelge 4.2. Cetuximabın P-Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	42
Çizelge 4.3. Epirubicin-HCl’nin P-Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	44
Çizelge 4.4. Cetuximabın (IC ₅₀) epirubicin-HCl ile birlikte P-Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	45
Çizelge 4.5. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı P-Hep G2 hücrelerinde LDH enzim aktivite düzeyleri.....	46
Çizelge 4.6. Cetuximabın R-Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	48
Çizelge 4.7. Epirubicin-HCl’nin R-Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi	49
Çizelge 4.8. Cetuximabın (IC ₅₀) epirubicin-HCl ile birlikte R-Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi.....	50
Çizelge 4.9. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı R-Hep G2 hücrelerinde LDH enzim aktivite düzeyleri	51
Çizelge 4.10. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücrelerinde glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri.....	53
Çizelge 4.11. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücrelerinde kaspaz-3/7 enzim aktiviteleri.....	55

1. GİRİŞ

Hepatosellüler karsinoma (HCC) küresel bir sağlık sorunudur (Wen vd 2015, El Serag ve Mason 1999, Parkin vd 2005, Sherman 2005). Hastaların yaklaşık %40'ı potansiyel küratif tedavi (rezeksiyon, transplantasyon ya da yerel ablasyon) için uygunken %20'si de kemoembolizasyon için uygundur (Tang vd 2015, Llovet vd 2003, Llovet ve Bruix 2003, Bruix ve Sherman 2005). Standart bir sistemik terapinin olmadığı ileri vakalara küçük moleküllu multikinaz inhibitörü olan sorafenib uygulanması ile hastalığın tedavi edilmesinde olumlu ilerlemeler sağlanmıştır (Choi vd 2015, Llovet vd 2008). Bu durum, hiçbir etkili tedavinin olmadığı hastalarda sağ kalma süresini arttırarak hastalığın tedavisinde dönüm noktası olan bir gelişmedir. Sorafenib kullanılmasıyla karaciğer kanseri tedavisinde elde edilen ilerlemenin büyüklüğü, göğüs kanser tedavisinde trastuzumab, kolon kanseri tedavisinde bevacizumab ya da akciğer kanser tedavisinde erlotinib kullanımı ile sağlanan %25 ile %35'lik ölüm oranındaki azalmaya benzerdir (Hurwitz vd 2004, Romond 2005, Shepherd vd 2005).

Karaciğer kanseri için moleküler hedefli tedavilerin etkinliğini kanıtlayan bu sonuçlar hastanın yaşam süresini ve kalitesini arttırmak için cetuximab gibi epidermal büyüme faktörü reseptörüne (EGFR) hedeflendirilmiş moleküler ajanlarla yapılan araştırmaları tetiklemiş ve daha fazla önem kazandırmıştır. Ancak hedeflendirilmiş kemoterapötiklerin yüksek konsantrasyonlarda tek başına tedavide kullanıldığında deri toksisitesi gibi pek çok yan etkilere neden olabildikleri de bilinmektedir (Lim vd 2011, Van Cutsem vd 2009). Bu yüzden cetuximab gibi hedeflendirilmiş kemoterapötiklerin standart kemoterapi ajanları ile birlikte uygulamaları bu gibi olumsuz sonuçların azalmasında ya da ortadan kalkmasında bir çözüm olabileceğini akla getirmektedir. Doxorubicin ve epirubicin-HCl karaciğer kanseri tedavisinde kullanılan önemli konvansiyonel kemoterapi ilaçları arasında yer almaktadır. Bu ilaçların kullanımlarında karşımıza çıkan en önemli problem kümülâtif doz sınırlayıcı kardiotoksisitedir (Nasr vd 2014). Epirubicin-HCl, doxorubicine yakın eşdeğer antitümör etkiye sahip olup hemen hemen onun yarı süresinde elimine olarak daha az kardiotoksisiteye neden olduğu bilinmektedir (Han vd 2015, Simunek vd 2009, Berthiaume ve Wallace 2007). HCC'nin moleküler karmaşıklığı, kemoterapide istenen başarıya ulaşılamaması ve kanser hücrelerinin epirubicin-HCl'ye direnç geliştirmesi kombine tedavilere ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Dancey ve Chen 2006). Kanser hastalarında gelişen ilaç dirençliliği, tedavinin uzamasına ve yüksek doz ilaç kullanımına sebep olarak hastalarda görülen yan etkilerin artmasına neden olup tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır (Gao vd 2013). Dolayısıyla, mevcut ilaçların terapötik etkilerinin arttırılması için yapılacak çalışmalarda parental kanser hücreleri ile birlikte ilaca dirençli kanser hücrelerinin de göz önünde bulundurulduğu, parental kanser hücrelerini öldürürken ilaca dirençli kanser hücrelerini de öldürebilen yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir.

2. KURUMSAL BİLGİLER ve KAYNAK TARAMALARI

2.1. Hepatosellüler Karsinom

Hepatosellüler karsinom (HCC), primer karaciğer kanserlerinin en yaygın histolojik formudur. Karaciğer hücrelerinin malign transformasyonu sonucu gelişen nodül ya da kitle olarak tanımlanmaktadır. Belirti ve bulguları daha çok temelinde yatan kronik karaciğer hastalığına aittir. Belirtileri ülkeden ülkeye farklılıklar gösterebilmektedir. Örneğin Kuzey Afrika Bandilerinde zayıflık ve büyük bir kitle gibi belirtiler hâkimdir (Berman 1988). Diğer yandan Japonya ve ülkemizde hastalar daha çok siroza bağlı olarak ortaya çıkan belirtilerden yakınrlar. Buradaki hastalar tümör ileri boyutlara ulaşmadan sirozun komplikasyonlarından ölebilirler (Taşyaran 2003). Hepatosellüler karsinom her yıl yaklaşık 435.000 yeni vakanın teşhis edildiği en sık rastlanan beşinci kanser türüdür. Bu veriler tüm kanser vakalarının %5.4'ünü oluşturmaktadır (Haruyama vd 2015, Wang vd 2002). Kanser türleri arasında ölüme sebep olmada dördüncüdür (Verslype vd 2012, Parkin vd 1999, Pisani vd 1999). Asya ve Afrika'da ise yetişkinlerde kanser nedenli ölümlerde birinci sırada yer almaktadır (Chhaniwal vd 2015, Di Bisceglie vd 1988). HCC, viral enfeksiyon ve aflatoksin gibi dış faktörlerin en çok rol oynadığı kanser türlerindedir. Dolayısıyla, HCC'nin dağılımı bu etkenlerin dağılımına göre değişebilmektedir. Bu yüzden de önlenabilir kanserlerin başında gelmektedir.

Karaciğer karsinogenezine yol açan moleküler olaylar dizisi çok iyi bilinmemektedir. Sirozlu bir karaciğeri, kansere ilerleten genetik değişikliklerin birikimi kök hücrelerden ya da olgun hepatositlerden kaynaklanan çok aşamalı bir süreçtir. Hepatit C (HCV) ve hepatit B virüsü (HBV), genetik hasar oluşumunda kritik tehlikelerdir. Kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda, transforme edici büyüme faktörü-alfa (TGF- α) ve insülin-benzeri büyüme faktörü-2'de (IGF-2) meydana gelen artış hızlanmış olan hepatosit proliferasyonuna katkıda bulunur (Thorgeirsson ve Grisham 2002, Bruix vd 2004, Farazi ve DePinho 2006, Villanueva vd 2007). Deneysel çalışmalar HCV çekirdek proteininin, Wnt ligandı olarak davrandığını, Ras sinyalizasyonunu aktive ettiğini ve p53'ü inaktive ettiğini göstermiştir (Branda ve Wands 2006). Kronik HBV enfeksiyonunda, HBV'nin tesadüf olmayan bir şekilde deoksiribonükleik asite (DNA) entegre olması onkogen promotörlerinin aktive edilmesine, DNA'nın yeniden düzenlenmesine ve kromozomal kararsızlığa neden olduğu gösterilmiştir (Ferber vd 2003). Aynı zamanda, kronik inflamasyondan kaynaklanan oksidatif stres, genomik ve mitokondriyal DNA hasarına da neden olmaktadır (Hussain vd 2007). Genetik anormallikler (allelık delesyonlar) ve epigenetik değişiklikler (anormal metilasyon) preneoplastik aşamalarda bulunurlar. Telomeraz aktivitesinin giderek artması kontrolsüz hücre çoğaltmasına izin verir. Sonuç olarak, yaşam ve çoğalma ile ilişkili yolların normalden daha fazla aktive edilmesi, malign fenotipi uyarmaktadır.

2.1.1. Hepatosellüler karsinomun moleküler patogenezeine genel bakış

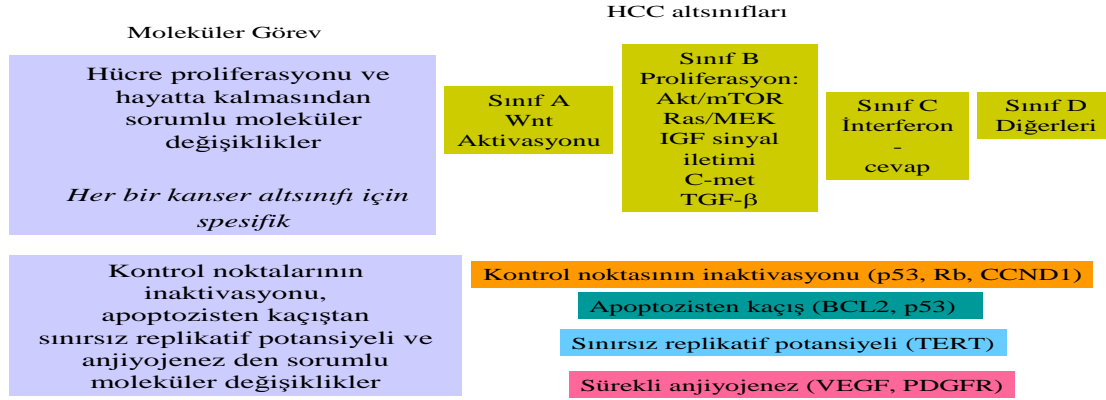
HCC'nin moleküler patogenezi oldukça karmaşıktır (Farazi ve DePinho 2006). Vakalarının %80'inde tümör normal karaciğerden, anormal-nonsirotik karaciğerden ve sirotik karaciğerden farklı çevresel risk faktörlerinin bir sonucu olarak ortaya çıkar

(Llovet vd 2003, Bruix ve Sherman 2005). Bunların her biri farklı genetik ve epigenetik değişiklikleri, kromozomal anormallikleri, gen mutasyonlarını ve değişen moleküler yolları içerirler.

HCC'nin moleküler patogeneze bakıldığında bütün karaciğer kanserlerinde evrensel olan bazı bozuklukların olduğu görülmektedir (Şekil 2.1). Bunlardan ilki, vakaların yarısında görülen TP53 nokta mutasyonundan ya da heterozigozite kaybından kaynaklanan hücre döngüsünün düzenlenmesindeki bozukluklar, p16 ya da retinoblastoma genlerinin susturulması veya siklin D1'in aşırı ekspresyonudur (Thorgeirsson ve Grisham 2002, Bruix vd 2004, Farazi ve DePinho 2006, Villanueva vd 2007). İkinci olarak da erken dönemde hepatokarsinogenez de bulunan vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF), platelet türevli büyüme faktörünün (PDGF) ya da anjiyopietin-2'nin otokrin/parakrin salgılanmasından ya da VEGFA geninin yüksek seviyede amplifiye olmasından kaynaklanan anormal anjiyogenezdir. Üçüncü olarak da intrinsik veya ekstrinsik apoptotik yolların kontrolündeki bozukluklardan dolayı apoptozdan kaçmadır. Sonuç olarak, sınırsız replikatif potansiyel sağlayan telomeraz ters transkriptazın (TERT) tekrar aktif hale gelmesidir.

Karaciğer kanserinin ilerlemesinde en önemli olan mekanizma, hücre çoğalmasıdır. HCC'de bundan sorumlu olan ana bir yol yoktur. Fakat hücrenin çoğalmasından ve hayatta kalmasından sorumlu gen kümeleri ile yapılan çalışmalarla HCC'de önemli olan moleküler sınıfların gen ekspresyon çalışmaları sonuçlanmıştır (Lee vd 2006, Boyault vd 2007, Chiang vd 2008). Moleküler sınıflardan birinin özelliği *CTNNB1*'deki yüksek sıklıktaki mutasyonlar ile Wnt sinyal yolunun aktivasyonudur. *CTNNB1* ekson 3'deki mutasyonlar ya da delesyonlar β -kateninin nükleer translokasyonuna ve hedef genlerin trans aktivasyonuna neden olan β -katenin proteininin ubiquitinasyonunu önler. Diğer bir moleküler sınıf, yüksek proliferasyon, kromozomal kararsızlık ve RAS/mitojen ile aktive edilen mitojen-aktive protein kinaz (MAPKK), insülin-benzeri büyüme faktörü (IGF), c-met ya da Akt/rapamisininin memeli hedefi (mTOR) sinyalizasyonlarının aktivasyonu ile ilişkilidir. Üçüncü moleküler sınıf interferon sinyalizasyonu ile ilgilidir (Breuhahn vd 2004). Nükleer faktör- κ B sinyal iletiminin, Janus kinaz sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörünün (Jak-Stat), transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF- β) ve Hedgehog sinyal iletiminin aktive edilmesinin HCC'deki rolü çok net bilinmemektedir.

Nm23'ün-H1'in, osteopontinin (SPP1), ARHC'nin (Rho C), matriks metaloproteaz 9'un ve matris metaloproteaz 14'ün ya da TGF- β aracılı genlerin kontrolünün bozulması gibi hücre yayılmasından, invazivliğinden ve metastazından sorumlu olan diğer moleküler mekanizmalar belirlenmiştir (Thorgeirsson ve Grisham 2002, Bruix vd 2004, Farazi ve DePinho 2006, Villanueva vd 2007). Buna paralel olarak HCC'nin oluşumunda ve yayılmasında tümör mikro çevresinin önemine işaret eden diğer bir olay da; bitişik karaciğer dokusundaki yüksek oranlarda meydana gelen interlökin gen ekspresyonu ve damar invazyonu, metastazın bir işareti olarak ilişkilendirilmiştir (Budhu vd 2006).



Şekil 2.1. HCC'nin moleküler patogenezinin şematik gösterimi (Farazi ve DePinho 2006, Thorgeirsson ve Grisham 2002, Bruix vd 2004, Villanueva vd 2007, Hanahan ve Weinberg 2000)

2.1.2. Genetik anormallikler

Tek nükleotid polimorfizm testleri ile bunlara tamamlayıcı olarak DNA mikroarray'leri ve protein kütle spektrometrisi gibi yüksek verimli teknolojilerin gelişimi karaciğer kanserine olan moleküler yaklaşımları değiştirdi. Gen ekspresyonundaki değişiklikler, DNA amplifikasyonu/delesyonu, somatik mutasyon ve epigenetik değişiklikler en yaygın olan moleküler anormalliklerdir (Çizelge 2.1).

2.1.3. Standart HCC tedavileri

Tarama programlarındaki ve teşhis araçlarındaki son gelişmeler, şüpheli küçük nodüllerin tanımlanmasına izin vermesine rağmen HCC hastalarının sadece %30-40'ı küratif tedaviler için uygundur (Llovet vd 2003). Rezeksiyon ve karaciğer nakli ile iyi seçilmiş hastalarda sağkalım oranı %70 iken radyofrekans lokal ablasyonu ile bu oran %50 olmuştur (Chhaniwal vd 2015, Llovet vd 2003, Llovet ve Bruix 2003). Bu tedavilerin hastalığın doğal seyrini değiştirdiği varsayılmaktadır. 3 yılda hastaların yarısında tümörün yeniden nüks etmesi standart adjuvan tedavinin saptanması için güçlü bir gerekçe sağlar (Liang vd 2014, Llovet vd 2005).

Cerrahi yöntemlerle tümörün çıkartılmadığı HCC'li hastalarda son 25 yıl içerisinde birçok antitümör ajan değerlendirilmiştir. Bu hastalar arasından üç grup tanımlanmıştır; orta basamakta olan hastalar (ortalama yaşam süresi 16 ay), ilerlemiş basamaktaki hastalar (ortalama yaşam süresi 6-7 ay) ve hastalığın son basamağındaki hastalar (ortalama yaşam süresi <3 ay) (Llovet vd 2003). Bu sonuçlar şimdiye kadar HCC'de bildirilen en kapsamlı kontrollü denemelerle doğrulanmıştır. Vitamin D benzeri bir bileşik olan seocalcitol plaseboya karşı 746 hastada test edilerek değerlendirilmiştir. Orta evredeki 186 hastanın ortalama sağkalımı yaklaşık olarak 16 ay civarında iken ilerlemiş evredeki 376 hastada bu oran 5.6 aydır (Beaugrand vd 2005).

Çizelge 2.1. Hepatosellüler karsinomada belirlenen anahtar moleküler anormallikler
(Villanueva vd 2007)

Görev	Gen	Gen Ekspresyonu	Mutasyonlar/ Kopya Sayısında Değişiklikler	Anormal Metilasyon
Büyüme Faktörleri ve reseptörleri	<i>IGF-II</i>	Artmış	%25/%60	%85
	<i>IGFR-II (M6PR)</i>	Azalmış		
	<i>EGF</i>	Artmış	%0	
	<i>EGFR</i>			
	<i>TGF-α</i>	Artmış	%11 (%3-%42)	
	<i>K-RAS</i>	Artmış		
	<i>RASSF1</i>	-	%12 (%0-%35)	
	<i>PIK3CA</i>	Azalmış		
	<i>PTEN</i>	-	%0-%11	
<i>HGF/c-MET</i>	Azalmış			
Proliferasyon ve farklılaşma	<i>β-katenin</i>	Artmış	%17 (%0-%44); %58 hepatoblastoma	Hiper:%46 Hipo:%77
	<i>E- kaderin</i>	Azalmış	Amplifikasyon (%5)	
	<i>c-myc</i>	Artmış		
	<i>APC</i>	Azalmış		
	<i>VEGFA</i>	Artmış		
Anjiyogenez	<i>VEGFR-2</i>	Artmış		
	<i>Angiopoietin-2</i>	Artmış		
Metastaz	<i>MMP-14</i>	Artmış	%15	Amplifikasyon (%7)
	<i>MMP-9</i>	Artmış		
	<i>Topoizomeraaz 2A</i>	Artmış		
	<i>Osteopontin</i>	Artmış		
	<i>Rb</i>	Artmış		
	<i>Siklin D1</i>	Azalmış		
Hücre döngüsü	<i>p53</i>	Azalmış	%27 (%0-%67)	Hiper:%56
	<i>p16</i>	Azalmış	%13	
	<i>p27kip</i>	Azalmış		
	<i>Survivin</i>	Artmış		

Transarteriyel kemoembolizasyonu (TACE), intra-arteriyel ve sistemik kemoterapiyi, hormonal tedaviyi, immunomodulatorleri ve iç ve dış radyoterapiyi değerlendiren birçok kontrollü klinik deneme vardır (Llovet ve Bruix 2003, Lopez vd 2006). Gelfoam, doxorubicin ve cisplatin, kontrol ve suboptimal tedaviler ile karşılaştırıldığında sağkalım avantajı göstermiştir (Llovet ve Bruix 2003). Sonuç olarak, Amerikan kılavuzlarında transarteriyel kemoembolizasyon, Barcelona Klinik Karaciğer Kanseri sınıflamasına göre orta evre kanser hastaları için standart tedavi olarak kabul edilmektedir (Llovet vd 2008). Bu tedaviden sonra 20 aylık ortalama bir sağkalım beklenmektedir. Bu alandaki araştırmalar, ilk cevabın etkinliğinin artırılması için kombine tedavilerin ya da yeni tedavi stratejilerinin yararlılığının değerlendirilmesine odaklanmalıdır.

2006 yılında, bütün HCC popülasyonunun %40-70'ini temsil eden ileri aşamadaki hastalar için ilk basamak tedavide hiçbir ilaç etkili olmamıştır. Kemoterapiyi içeren birçok sistemik tedavi (doxorubicin, epirubicin-HCl, cisplatin gibi), hormonal bileşikler (anti-estrogen, anti-androjenler, oktreotid), immünoterapi (interferon), bir timidilat sentaz inhibitörü olan nolatrexed ve bir vitamin D olan antiproliferatif molekül seocalcitol ve tübülün inhibitörü (T-67) gibi bileşikler etkisiz ya da negatif sonuçlar göstermiştir (Llovet ve Bruix 2003, Lopez vd 2006).

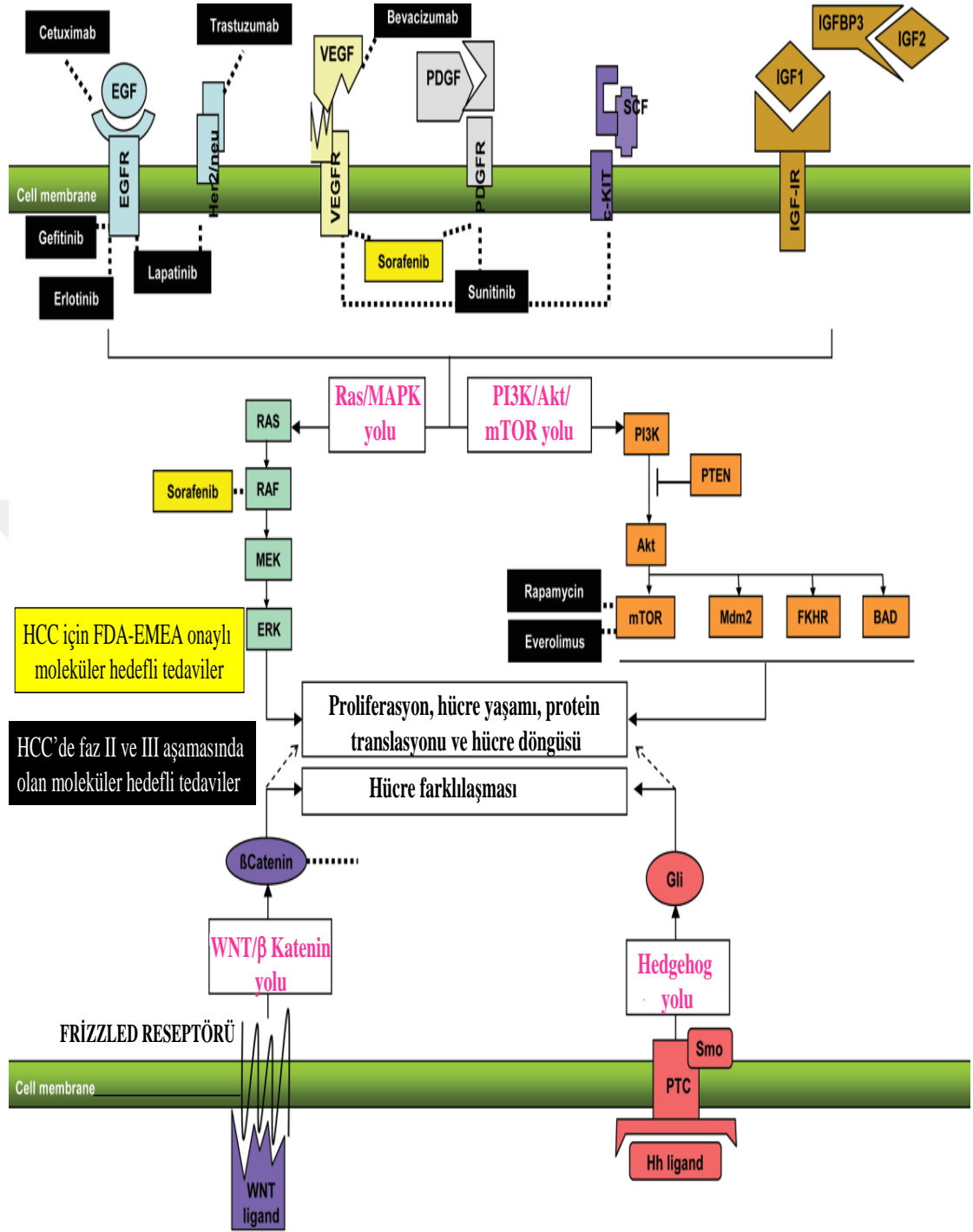
2.1.4. Karaciğer kanserinde bozulmuş olan sinyal yolları

Yapılan çalışmalarla açıklanan moleküler anormallikler, karaciğer kanser tedavisi için ana hedeflerin protein kinazlar olduğunu göstermiştir (Villanueva vd 2007, Roberts ve Gores 2005). Yakın zamanda bütün kinaz gruplarının açıklanması yeni onkoloji ilaçlarının keşfini kolaylaştırmıştır. HCC patogenezi ile ilişkili olan sinyal iletim yolları ve kaskadları; Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR)-RAS-MAPKK, c-MET, IGF, Akt/mTOR, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörüdür (PDGFR) (Şekil 2.2). Bu yollar için geliştirilmiş moleküler hedefli tedaviler Çizelge 2.2’de özetlenmiştir. Hepatokarsinogenezin içerdiği Jak-STAT, TGF- β ve Hedgehog gibi diğer yolların hepatokarsinogenezle olan ilişkilerini ve bu yollarda yer alan olası terapötik hedefleri belirlemek için daha fazla ilgiye ve çalışmaya ihtiyaç vardır.

Büyüme faktörü reseptörü sinyal iletimi yollarından EGFR-Ras-MAPKK yolu birçok kanser türünde dikkat çekmiş ve incelenmiştir. Büyüme faktörü reseptör ligandları arasından epidermal büyüme faktörü (EGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve VEGF, RAS/Mitojen-Aktiveli Protein Kinaz (MAPK) sinyal yolunu aktive ederler. Bunlar hücre çoğalması için gerekli temel unsurlar olan *c-fos* ve *c-jun* gibi AP1 ailesinin genlerinin transkripsiyonunu uyarırlar (Robinson vd 2000). EGFR, ligandın bağlanması ile tirozin kinaz aktivitesinin uyarıldığı ve buna bağlı olarak sinyal iletiminin başlatıldığı dört ilişkili reseptörün (HER2/Neu, ErbB3 ve ErbB4) bulunduğu ailenin bir üyesidir. EGFR’nin fonksiyon kazanması, klasik olarak nokta mutasyonlarının, amplifikasyonun veya ligand-reseptör etkileşiminde artışın bir sonucu olarak ortaya çıkar (Baselga ve Arteaga 2005).

İnceleme altındaki çoğu madde, membranöz tirozin kinaz reseptörlerini (TKRs) bloke etmektedir (Şekil 2.2). EGFR sinyal yolunun etkili bir şekilde bloke edilmesi, EGFR’ye (cetuximab) ya da ErbB2/HER2/neu’ya (trastuzumab) karşı monoklonal antikorların kullanımı ile başarılabilir. Baş ve boyun kanseri (Bonner vd 2006) ve kolorektal kanser tedavisi (Jonker vd 2007) için cetuximab ve HER2’yi aşırı ekspres eden metastatik meme kanseri için trastuzumab (Romond vd 2005) Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç idaresi tarafından onaylanmıştır. Bunlara alternatif olarak sinyal yollarının aktivasyonu, küçük hücreli dışı akciğer kanserinde EGFR’ye karşı erlotinib (Shepherd vd 2005) ya da göğüs kanserinde HER2 ve EGFR’ye karşı lapatinib (Geyer vd 2006) gibi küçük moleküller tarafından da ayrıca başarılı bir şekilde inhibe edilebilmektedir.

HCC’de Ras/MAPK yolunun aktivasyonu, anormal biçimde olan yukarı yöndeki sinyallerin (EGFR sinyal iletimi, IGF sinyal iletimi) ya da NORE1A gibi tümör süpresör genlerin anormal metilasyonları ile inaktivasyonlarının sonucu olabilir (Calvisi vd 2006). Raf ve Ras mutasyonları HCC’de nadir bulgulardır. Sorafenib dışında nanomolar konsantrasyonlarda B-Raf’ı inhibe etme aktivitesi olan Ras/MAPK sinyal yolunu bloke eden güçlü ilaçlar halen araştırma aşamasındadır (Wilhelm vd 2006).



Şekil 2.2. HCC için geliştirilmiş olan moleküler hedefli tedaviler (Villanueva vd 2008)

Çizelge 2.2. Kanser tedavisinde klinik olarak geliştirilmiş moleküler hedefli ajanlar (Llovet ve Bruix 2008)

Kanser Hücre Fonksiyonu	Hedef	Ajan (Çeşit)	
Sinyal iletilicileri Büyüme faktör reseptörleri	EGFR	Gefitinib (küçük molekül tirozin kinaz inhibitörleri (TKI)), Erlotinib (TKI), Cetuximab (monoklonal antikor (mAb)), Lapatinib (TKI)	
	HER2		
	PDGFR	Transtuzumab (mAb), Lapatinib (TKI)	
	FLT3	Imatinib (TKI), Sunitinib (TKI), Sorafenib (TKI)	
	IGFR1	Lestaurinib (TKI), PKC 412 (TKI), sunitinib	
	c-MET	IMC-A12 (mAb)	
	c-Kit	SU11274, JNJ-38877605, ARQ197	
		Imatinib, dasatinib	
	İntrasellüler sinyal iletimi	RAS	Farnesil transferaz inhibitörü tipifamib
		RAF	Sorafenib
MEK		Vandetanib, AZD6244	
mTOR		Temsirolimus, everolimus, rapamycin	
Anjiyogenez			
Büyüme faktörleri	VEGF	Bevacizumab (mAb)	
Büyüme faktör reseptörleri	VEGFR (1-3)	Sorafenib, sunitinib, Brivanib, cediranib, Valatanib, IMC1121B (mAb)	
	PDGFR	Sorafenib, imatinib, sunitinib	
Apoptozis İntrinsik yol	BCL2	GX15-070, oblimersen	
Ekstrinsik yol	Apo2L/TRAIL	Mapatumumab, Apomab, AMG-655, rhApo/TRAIL	
Protein çevrimi	Proteazom	Bortezomib	
Kromatin yeniden düzenlenmesi	HDAC	SAHA	
	DNA metiltransferaz decitabine		
Hücre döngüsü	CDKs	Flavopiridol (CDKI)	
Göç ve invazyon	SRC	Dasatinib, XL228	

2.1.5. HCC'de moleküler tedavilerin ortaya çıkışı

Moleküler hedefli tedaviler, kanserin tedavi edilmesinde ve yönetilmesine ümit vermektedir. Son yıllarda kırktan fazla moleküler hedefli tedavi test edilmiş (Çizelge 2.2) ve bunların ondan fazlası meme, kolorektal, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, böbrek, baş ve boyun kanseri olan hastaların sağkalımını arttırmıştır (Romond vd 2005, Hurwitz vd 2004, Shepherd vd 2005, Bonner vd 2006, Jonker vd 2007, Geyer vd 2006, Miller vd 2007). Bu durum aynı zamanda HCC içinde geçerlidir.

Çeşitli moleküler tedaviler faz II çalışmalarında test edilmiştir. Çalışmaların çoğu son yıllarda yapılmış ve hedeflenmiş protein kinazlar onkolojide önemli ilaç hedefleri olmuşlardır (Cohen 2002). Ajanlar, ana hedeflerine göre gruplandırılmışlardır. Bunlar, (1) Anti-EGFR ajanlar: erlotinib, gefitinib, lapatinib ve cetuximab (2) Antianjiyotik ajanlar: bevacizumab, sorafenib, sunitinib, vatalanib, cediranib ve kombinasyonları (3) mTOR inhibitörleri: everolimus, temsirolimus (4) Diğer ajanlar: c-met inhibitörleri, IGFR1 inhibitörleri ve Wnt inhibitörleridir.

EGFR ve HER2/neu'yu hedefleyen anti-EGFR ajan çeşitleri Çizelge 2.2'de verilmiştir. Tirozin kinaz inhibitörleri olan EGFR'yi hedefleyen erlotinib ve gefitinib ile hem EGFR'yi hem de HER2/neu'yu hedefleyen lapatinib HCC'de test edilmiştir. Ayrıca EGFR'yi hedefleyen monoklonal antikor olan cetuximab da değerlendirilmiştir.

Erlotinib, hem prelinik hem de klinik çalışmalarda aktivite göstermiştir. Orta/ileri evredeki 38 HCC hastasını (%39'u ekstrahepatik metastazlı hasta) içeren çalışmada, hastalara günlük 150 mg erlotinib uygulanmıştır. Hastalardan düşük bir cevap oranı elde edilerek %32'sinde 6 ay progresyonsuz sağkalım sağlandığı gösterilmiştir (Philip vd 2005). İlacın aktivitesi ile açıklanan ortalama sağkalım 13 aydır. Ayrıca hedef popülasyon, klasik ileri evre HCC popülasyonundan farklıdır (hastaların %42'si karaciğer hastalıklarına sahip değildir). 40 hasta içeren ikinci bir çalışmada ortalama sağkalımın 25 hafta olduğu gösterilmiştir (Thomas vd 2007). Gefitinib, deneysel modellerde HCC gelişimini önlemiştir. Fakat 31 hastada yapılan bir çalışmada ortalama sağkalımın 6.5 ay olduğu ve ilacın bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (O'Dwyer vd 2006). HER2/neu'nun aşırı ekspresyonunun ve EGFR mutasyonlarının HCC'de nadir olmasına rağmen ikili olarak reseptör (EGFR ve HER2) bloke eden lapatinib, HCC'nin deneysel modellerinde ve ön klinik denemelerinde test edilmektedir.

Prelinik çalışmalarla EGFR'yi hedefleyen kimerik monoklonal antikor olan cetuximabın hücre dizilerinde antiproliferatif etkiye ve bazı pro-apoptotik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. İki farklı çalışmada, cetuximab tek ajan olarak test edilmiştir. Hiçbirinden beklenen cevaplar alınmamıştır (Zhu vd 2007, Gruenwald vd 2007). Çalışmanın bir tanesinde 32 hastada ortalama ilerleme zamanı olarak 2 ay, ikinci çalışmada ise ortalama sağkalım 9.6 ay olarak belirtilmiştir.

2.1.6. HCC'de kombinasyon tedaviler

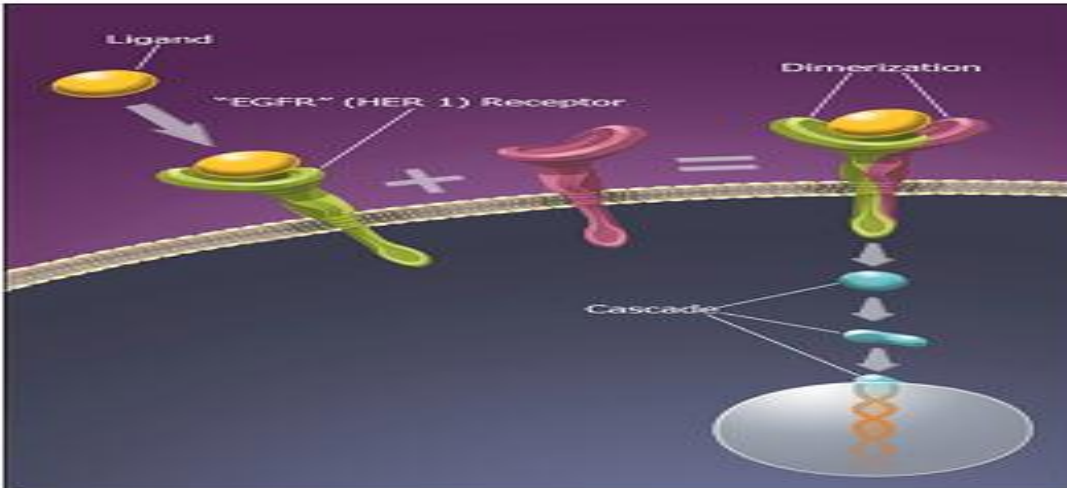
Hedeflendirilmiş ilaç kombinasyonlarının sorafenib ile yapılan daha önceki çalışmalardan elde edilen faydalı sonuçları geliştirmesi beklenmektedir (Dancey ve

Chen 2006). HCC’de aktive edilmiş tamamlayıcı yolları engellemek kombinasyon tedavilerinin amacıdır. Bu durum EGFR, MET ve insülin-benzeri büyüme faktörü reseptörü (IGFR) inhibitörleri gibi hücre proliferasyonu bloke ediciler ve anti-antiangiyojenik ajanlar ile ilgilidir. Hücre içi sinyali ortadan kaldıran birbirini tamamlayan tedaviler olarak RAS veya mTOR inhibitörleri ile hücre proliferasyon inhibitörlerinin kombine kullanılması alternatif bir stratejidir. Benzer şekilde, pro-apoptotik ajanlar ile hücre proliferasyon inhibitörlerinin kombine kullanımları sinerjistik etki gösterebilir.

Moleküler tedavilere verilen yanıttan ve gösterilen dirençten sorumlu biyobelirteçlerin kombine tedaviler için belirlenmesi gerekmektedir. Diğer solid tümörlerde açıklanan birçok direnç mekanizması aynı zamanda HCC içinde geçerli olabilir. Örneğin, EGFR inhibitörlerine direnç, aşağı yöndeki onkogenlerdeki (RAS) ya da tümör süpresörlerdeki (PTEN) mutasyon veya MET’in amplifikasyonu ile ilişkilidir. Direnç mekanizmalarının belirlenmesi ile ilaç kombinasyon çalışmaları daha başarılı olabilecektir. Bazı kombinasyon çalışmaları bilimsel ses getirmesine rağmen, toksisite ana sınırlayıcı faktördür ve faz III girişimlerine başlamadan önce faz I/II çalışmalarından güvenilir sonuçların elde edilmesi zorunludur (Llovet vd 2008).

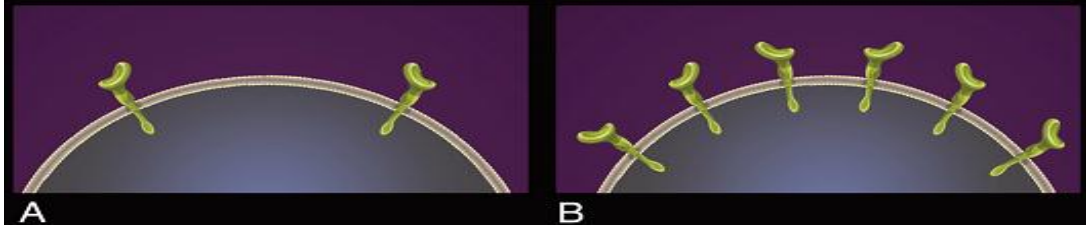
2.2. Cetuximab (Erbix)

Metastaz, kanser hastaları arasında önemli bir ölüm nedenidir. Tümör metastazını sınırlayabilen veya önleyebilen herhangi bir yaklaşım hastalığın tedavisinin yönetilmesinde yüksek bir değere sahip olacaktır. Kanser hücrelerinin büyümesinde ve metastazında kritik olan kanser spesifik moleküllerin hedeflenmesi, kanser tedavisi için umut verici bir yaklaşımdır. Son birkaç yılda kanser gelişiminin hücresel, moleküler ve genetik temellerinin aydınlatılmasında önemli ilerlemeler kaydedildi. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) sinyal iletiminin kanserde tanımlanması (Şekil 2.3), antikanser tedavi yaklaşımlarında önemli bir devrim yarattı (Harari 2004).

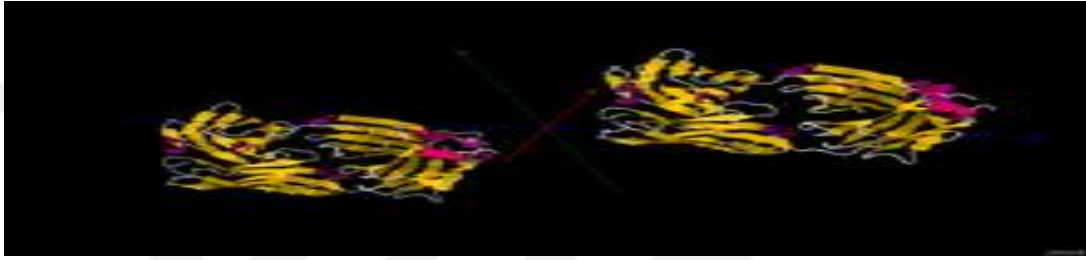


Şekil 2.3. EGFR yolu. EGFR’ye ligand bağlanması dimerizasyon ile sonuçlanır. Başarılı dimerizasyon hücre proliferasyonu ile sonuçlanan kaskadın başlamasına neden olur

EGFR sinyal iletimi (Şekil 2.4), şu anda onkolojide son derece umut verici bir moleküler hedef olarak kabul edilmektedir (Harari vd 2007).

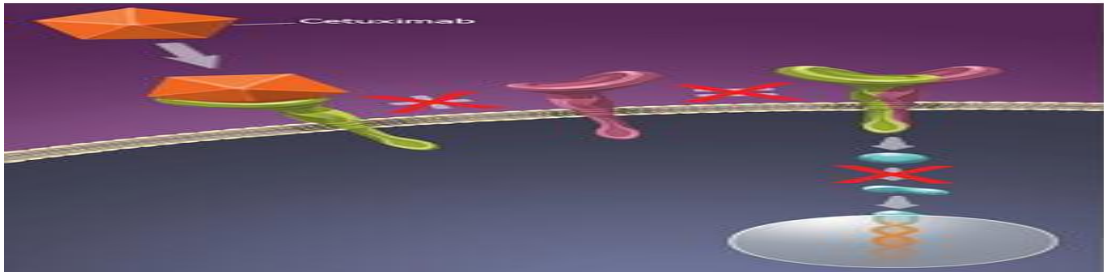


Şekil 2.4. EGFR'nin (HER1) normal ekspresyonu (A) ve EGFR'nin aşırı ekspresyonu (B)



Şekil 2.5. Monoklonal antikor cetuximab

Cetuximab (C225-03, IMC-C225, C225, ch225 olarak da adlandırılır) (Şekil 2.5) EGFR'ye bağlanarak ve EGFR sinyal iletimini bloke ederek aşağı yönde hücre içi sinyalleri inhibe eden bir monoklonal antikordur (mAb) (Şekil 2.6). Ayrıca, kanser hücrelerine saldırmak ve öldürmek için sitotoksik T hücrelerini güçlendirebilen antikor bağımlı hücresel sitotoksisiteyi ve kompleman bağımlı sitotoksisite reaksiyonlarını da uyarabilmektedir. Tümör antijen-spesifik bir monoklonal antikor olan cetuximab, EGFR eksprese eden metastatik kolorektal kanseri tedavisinin yanı sıra, baş ve boyun kanseri içinde 2004 yılında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi tarafından onaylanmıştır (Van Cutsem vd 2009, Lim vd 2011). Ancak tüm hastalar bu ajana tatmin edici yanıtlar vermemişlerdir (Cunningham vd 2004, De Roock vd 2010a, Linardou vd 2011). İleriki zamanlarda yapılacak araştırmalarla ortaya konacak olan güvenilir klinik, moleküler belirteçlerin cetuximaba en iyi cevap verecek hastaların belirlenmesinde büyük değeri olacaktır.



Şekil 2.6. Cetuximabın EGFR'ye bağlanarak dimerizasyonu ve aşağı yöndeki kaskadı engellemesi

Cetuximab, kolorektal kanseri, skuamöz hücreli baş boyun kanseri, nazofarenks kanseri, pankreas kanseri, yumurtalık kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri gibi çeşitli tipteki insan kanserlerinin tedavisi için Merck KGaA ve ImClone Systems Incorporated/Bristol-Myers Squibb tarafından ortak olarak geliştirilmiştir. İlaç, intravenöz infüzyon için tasarlanmış olup, steril sıvı formülasyonundadır (şişe başına 100 mg cetuximab). Formüle edilmiş cetuximabın içeriği, bileşenlerin işlevleri ve bileşenlerin kalite standartları Çizelge 2.3’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Cetuximab bileşimi

Bileşen	Şişe başına miktar	Miktar	Fonksiyon	Kalite standardı
Cetuximab, kimerik antikor	100 mg	2 mg/ml	Aktif bileşen	Kurum içinde tanımlanmış
Sodyum klorür	424 mg	8.48 mg/ml	İzotonik ajan	Ph. Eur.
Sodyum dihidrogen fosfat dihidrat	20 mg	0.40 mg/ml	Tampon	Ph. Eur.
Disodyum fosfat dihidrat	66 mg	1.32 mg/ml	Tampon	Ph. Eur.
Enjeksiyon için su	50 ml	1 ml	Seyreltici	Ph. Eur.

2.2.1. Cetuximabın kullanımı ve yan etkileri

Cetuximab sadece reçete ile temin edilebilen, genellikle H1 antagonisti ile 400 mg/m²’lik dozda daha sonraki haftalarda 250 mg/m²’lik dozda intravenöz uygulanan bir ilaçtır. Cetuximabın intravenöz uygulanmasının çeşitli yan etkileri vardır. En ciddi olanları, infüzyon reaksiyonları, kardiyopulmoner duraklama, dermatolojik toksisite ve radyasyon dermatit sepsis, böbrek yetmezliği, interstisyel akciğer hastalığı ile akciğer embolisidir (Wong 2005, Blick ve Scott 2007, Martinelli vd 2009, Koukourakis vd 2010, Birnbaum vd 2010).

2.2.2. Cetuximabın antitümör aktivitesinin altında yatan mekanizmalar

Cetuximab, iyi tanımlanmış ve şu anda çeşitli kanserlerin klinik tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır. Oldukça hedefe özgü bir antikordur. İyi bir toleransı vardır ve tümör hücrelerinde apoptozu uyurabilir (Wu vd 2008, Blumenschein vd 2011). Bu ilaç, birçok mekanizmanın aracılık ettiği intrinsik antitümör etki göstermektedir. Bunlar, immün efektör hücreler gerektiren ve gerektirmeyen mekanizmalar olarak iki kategoriye ayrılabilir (Campoli vd 2010). Tümör antijen-spesifik monoklonal antikorların kendilerine özgü reseptörleri inhibe ettikleri ve hedeflenen tümör hücrelerinde in vitro bağışıklık hücrelerini etkilemeden apoptozu uyardıkları gösterilmiştir. Bununla birlikte, antikor bağımlı hücrel sitotoksiteyi uyaran ve T lenfosit-spesifik immün reaksiyonları aktive eden tümör antijen-spesifik monoklonal antikorlar aynı zamanda anti-tümör fonksiyonda da önemli bir rol oynarlar.

Cetuximab aynı zamanda EGFR sinyal iletimini bloke ederek radyasyon sitotoksitesini de arttırabilmektedir (Bonner vd 2006). Cetuximab, hücre döngüsünde faz spesifiktir ve hücreleri hücre döngüsünün G1 fazında tutmaktadır (Baselga 2001).

2.2.2.1. Cetuximab tarafından EGFR sinyal iletiminin inhibisyonu

EGFR, tirozin kinaz reseptör proteininin bir bölümünü oluşturan bir transmembran glikoproteindir. EGFR ailesi, EGFR/HER1/ErbB-1, HER2/ErbB-2/neu, HER3/ErbB-3 ve HER4/ErbB-4 transmembran reseptörlerini içerir (Lurje ve Lenz 2009). Her bir EGFR ailesinin üyeleri, ekstrasellüler ligand bağlama, hidrofobik transmembran ve intrasellüler intrinsik tirozin kinaz domainlerinden (kinaz aktivitesi eksik olan ErbB-3 hariç) oluşmaktadır (Yarden 2001).

EGFR, EGF, TGF- α , heparin-bağlayıcı EGF, amfiregülin, epiregulin, betaselülin ve neuregulin G2b olmak üzere yedi farklı liganda sahiptir (Watanabe vd 1994, Toyoda vd 1997, Wells 1999). Bu ligandlar EGFR'ye bağlanırlar ve reseptör homodimerlerinin ve/veya heterodimerlerinin oluşumuna neden olan ErbB reseptörlerinin bir araya gelmelerini başlatırlar (Yarden 2001, Wiley 2003). Tirozin kinaz domaini, sitoplazma içindeki EGFR'nin C-terminal kuyruğundaki protein fosforillenmesi ile daha sonra aktive edilir (Qu 2002, Cohen 2003). Bu süreç, fosforilenmiş reseptör-ligand oluşumunun endositozu ile sonlandırılabilen (Harari 2004, Yarden 2001) bir intrasellüler sinyal iletim kaskadını başlatır (Carpenter ve Cohen 1990). EGFR sinyal iletiminin aktivasyonu, mitogenezi, apoptozu, protein sekresyonunu, değişmiş hücre motilitesini, hücre farklılaşmasını ve hücre farklılaşmamasını içeren çeşitli aşağı yöndeki sinyal iletimlerini tetikleyebilir (Wells 1999). Büyüme faktörleri ve reseptörleri ile olan etkileşimlerinin bloke edilmesi, aşağı yönde sinyal iletimini ve bunların fizyolojik fonksiyonlarını etkiler. EGFR-spesifik monoklonal antikoları, EGFR ligandları ile rekabet ederler ve reseptör tirozin kinaz aktivasyonunu önlemek için reseptörün ekstrasellüler domainine bağlanarak EGFR-aracılı intrasellüler sinyal iletimini zayıflatırlar (Marshall 2006). Tüm epitelyal ve mezenkimal hücreler EGFR eksprese etmekle beraber miktarları değişebilmektedir (Wells 1999). EGFR bozukluğu ya da aşırı ekspresyonu insan hastalıklarında oldukça çok rastlanmaktadır (Nicholson vd 2001, Arteaga 2002). Baş ve boyun kanserlerinin birçok vakasında ve kolorektal kanser vakalarının yaklaşık %50'sinde EGFR aşırı eksprese edilmektedir (Mendelsohn 2001, Mendelsohn ve Baselga 2003). Cetuximab, EGFR sinyal iletimini baskılamak için spesifik ve rekabetçi bir şekilde EGFR'ye bağlanır (Kim vd 2001). Cetuximab doza bağımlı bir şekilde bazı tümör hücre dizilerinin proliferasyonunu inhibe ettiği (Goldstein vd 1995, Mutsaers vd 2009) ve apoptozu uyardığı gösterilmiştir (Prewett vd 1996, Fan vd 1997).

2.2.3. Cetuximab tedavisine cevapsız kalmanın olası mekanizmaları ve cetuximab kullanımında hasta seçimi

Cetuximab ile tedavi edilen bazı hastalarda progresyonsuz sağkalım ve genel sağkalımda artış olduğu gösterilmiştir. Ancak, tümör antijen-spesifik monoklonal antikor temelli tedavilerin ortalama etki oranı sadece %30'dur (Reichert vd 2005, Campoli vd 2010). Cetuximab ile tedavi edilmiş hastaların neden sınırlı bir yüzdesinin klinik olarak cevap verdiği ile ilgili olarak çok az şey bilinmektedir. Cetuximab tedavisi ile ilgili toksisite ve maliyet gibi nedenler cetuximab tedavisinden en iyi şekilde yararlanacak hastaların etkili bir şekilde seçilme yollarını belirlenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Hastaların, cetuximab tabanlı tedaviye cevap vermemelerinin

altında yatan mekanizmalar, hedeflendirilmiş ilacın klinik öneminden dolayı genişçe araştırılmaktadır.

2.2.3.1. Cetuximaba cevapsız kalmada Kirsten Ras Sarcoma viral onkogen (KRAS) mutasyonunun potansiyel rolü

EGFR ekspresyonu, anti-EGFR tabanlı tedavilere hem yanıt vereni hem de vermeyenleri tespit etmeye yardımcı olabilir. Bununla birlikte, kolorektal kanser ve metastatik kolorektal kanser nükseden hastalar arasında EGFR ekspresyonunun pozitif mi ya da negatif mi olup olmadığını belirlemede mevcut yöntemler başarısız olmasına rağmen klinik yarar bu hastalarda zaten gözlenmiştir (Yarom vd 2010). Hasta seçim belirteçleri, cetuximab tedavisine yanıt olasılığını artırmak için açıkça gereklidir. Kirsten Ras Sarcoma viral onkogen (KRAS), EGFR gibi tirozin kinaz reseptörlerinin aşağı yöndeki bir sinyal ileticisidir. Cetuximab, KRAS'ın aracılık ettiği bu sinyalleri içeren EGFR sinyal kaskadını bloke eder. EGFR'nin uyarılması ile yabancı tip KRAS kısa bir süre için etkin olur. Sinyal yolunun aşağı yönünde yer alan sıkı bir şekilde kontrol edilen RAF/MAPK/ekstrasellüler sinyal ilişkili kinaz daha sonra aktive olur. Mutasyona uğramış KRAS proteini sürekli aktif hale gelerek kaskadı EGFR'nin yukarı yöndeki sinyal iletiminden bağımsız yapar. Bu şekilde, cetuximab ile EGFR'nin bloke edilmesi aşağı yöndeki olayları etkilemeyebilir. KRAS geninde bulunan mutasyonların protein aktivitesinin sürekli olmasına neden olmaları yaklaşık olarak bütün kolorektal kanserlerin %30-%50'sinde bulunmuştur (Khambata-Ford vd 2007, Bokemeyer vd 2008, Van Cutsem vd 2008, Amado vd 2008). Bu doğrultuda KRAS, EGFR'nin aşağı yöndeki sinyal yolunda bir düğüm oluşturur. KRAS mutasyonlarının kolorektal, karaciğer ve akciğer kanserlerinde yaygın olduğu çok iyi bilinmektedir. Bunlar, cetuximab gibi EGFR hedefleme ajanlarının antitümör aktivitesini belirlemede kullanılan moleküler biyolojik belirteçler olarak iyi bir şekilde tanınmaktadır.

KRAS mutasyonu, metastatik kolorektal kanserli 540 hastanın %35.6'sında belirlenmiştir (Van Cutsem vd 2008). Yabancı tip KRAS taşıyan hastalar için folinik asit, fluorourasil ve irinotekan tedavisine cetuximab eklenmesi sadece folinik asit, fluorourasil ve irinotekan tedavisine göre daha uzun progresyonsuz sağkalım ya da daha yüksek yanıt oranı sağlamıştır. Buna karşın cetuximab, KRAS mutasyonlu hastalar arasında folinik asit, fluorourasil ve irinotekanın tek başına uygulanması ile karşılaştırıldığında progresyonsuz sağkalım ve yanıt oranında önemli bir gelişme gösterememiştir.

KRAS mutasyonlu hastalarda cetuximaba tüm yanıt oranı yabancı tip KRAS taşıyan hastalara göre daha düşük olduğu gösterilmiştir. Ortalama progresyonsuz sağkalım yabancı tip KRAS taşıyan hastalara göre KRAS mutasyonlu hastalarda açık bir şekilde daha kısadır. Benzer şekilde ortalama tüm sağkalım yabancı tip KRAS taşıyan hastalara göre KRAS mutasyonlu hastalarda belirgin bir şekilde daha kısadır.

2.2.3.2. Cetuximab uygulamasına verilen cevapta etkili olan diğer genetik belirteçler

KRAS mutasyonlarından dolayı cetuximaba cevap vermeyen hastaların yüzdesi %35'dir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, cetuximaba yanıt oranı seçilmemiş

hastalarda %24.4, yabancı tip KRAS taşıyan hastalarda %36.3 ve yabancı tip KRAS, NRAS, BRAF ve PIK3CA (ekzon 20) taşıyan hastalarda %41.2 olduğu gösterilmiştir (De Roock vd 2010a). Cetuximabdan en etkili şekilde yararlanacak hastaların belirlenmesi HER-3, c-met, IGF1R, p.G13D ve TP53 mutasyonlarının varlığının belirlenmesinin yanı sıra amfiregülin ve epiregulin düzeylerinde belirlenmesi gibi biyolojik seçim belirteçlerin geliştirilmesi ile mümkün olabilecektir (Oden-Gangloff vd 2009, De Roock 2010b, Hawkes ve Cunningham 2010, Scartozzi vd 2011, Inno vd 2011). Diğer olası biyolojik belirteçler fosfataz ve tensin homolog (PTEN) ekspresyonunun kaybı, EGFR gen kopya sayısındaki değişiklikler (Hawkes ve Cunningham 2010) ve EGFR promotör hipermetilasyonunu içermektedir (Scartozzi vd 2011). Cetuximaba cevapsız kalmaya neden olan olası immün kaçış mekanizmaları da bulunmaktadır. Bütün bu vurgulanan belirteçler, KRAS analizi ile kombinasyonlarında daha iyi bir öngörü oluşmasını sağlamaktadır. Bu öngörünün oluşmasını sağlayan faktörlerin çoğu hala klinik öncesi test aşamasındadır, ama hasta seçiminde umut verici uygulamalara sahiptirler.

2.2.4. Cetuximab tedavisinde deri toksisitesi ve ekonomik sorunlar

Epidermal bazal keratinositlerin düzenlenmesindeki EGFR fonksiyonu, cetuximab tarafından bloke edilmeden etkilenir. Bu da karakteristik papülopüstüler kızarıklığa neden olur. Birçok klinik çalışma, cetuximab temelli tedavinin klinik yararı kızarıklığın bu tipinin oluş sıklığı ve şiddeti ile yakından ilişkili olduğunu göstermektedir (Van Cutsem vd 2009). Cilt toksisitesi olmayan hastalar ile karşılaştırıldığında, bundan acı çekenlerin ortalama yaşam süresinin dikkate değer biçimde daha uzun olduğu gözlenmiştir (Cunningham vd 2004).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada akne benzeri kızarıklığın ilk ortaya çıkması ile toplam sağkalım arasındaki ilişki analiz edilmiştir. Akne benzeri kızarıklığa sahip hastalar buna sahip olmaya hastalara göre daha uzun ortalama toplam sağkalım göstermişlerdir. Daha hafif akne benzeri kızarıklıklara sahip hastalarda ortalama toplam sağkalım daha kısadır (Lim vd 2011). Ancak, şiddetli deri kızarıklığı ile tümör cevabı arasındaki biyolojik mekanizma henüz belirsizdir.

Cetuximab, hasta başına 8 haftalık tedavi başına 30.000 dolara yaklaşan maliyeti ile pahalı bir tedavidir (Holmer 2004). Bu durum sağlık uzmanları ve ekonomistler tarafından değerlendirildiğinde ilacın maliyet-etkinliği hakkında birçok soru oluşmaktadır. 2008 yılında beş Avrupa ülkesinde yapılan bir ekonomik analizde lokal ileri baş ve boyun kanseri için cetuximab radyasyon tedavisi ile kombine edildiğinde cetuximab ile tedavi maliyetinin düşürüldüğü gösterilmiştir.

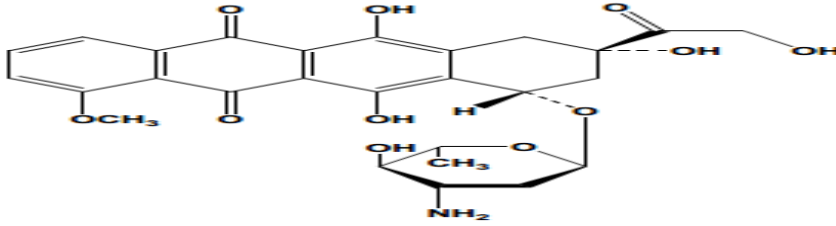
2.3 Epirubicin-HCl

Epirubicin-HCl (4'epidoxorubicin) bir doxorubicin antrasiklin türevidir. Doxorubicinin 4' pozisyonundaki hidroksil grubunun epimerizasyonu ile karakterize edilir. Etki mekanizması doxorubicine benzerdir ve antitümör aktivitesinin doxorubicin ile karşılaştırılabilir. Epirubicin-HCl, doxorubicinden daha iyi bir terapötik endekse sahiptir. Benzer dozlarda daha az hematolojik ya da kardiyak toksisiteye sahiptir. Epirubicin-HCl, birçok çeşitli tümörlerde kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Klinik

çalışmalar, en uygun uygulama zamanını tanımlamak ve kombine kemoterapötik uygulamalardaki rolünü değerlendirmek için devam etmektedir.

2.3.1. Epirubicin-HCl'nin kimyasal yapısı

Epirubicin-HCl'nin kimyasal adı, (8S-cis)-10-[(3-amino-2, 3, 6-trideoksi-a-L-arabino-hekso piranosil) oksil] -7, 8, 9, 10-tetrahidro-6, 8,11-trihidroksi-8-(hidroksiasetil)-1-metoksi-5,12-naftasendion dur (Şekil 2.7). Yapısal formülü doxorubicinden C-4' pozisyonundaki hidroksil grubunun (eksensel yerine ekvatoryal) konfigürasyonu ile farklıdır. Moleküler formülü $C_{27}H_{29}NO_{11}$ ve molekül ağırlığı 579.98 g/mol'dür (Hopkins 1983). Epirubicin-HCl, 10 mg ya da 50 mg 4' epidoxorubicin hidroklorür içeren şişelerde kırmızı-turuncu kristal şeklinde temin edilmektedir. Enjeksiyon için steril su içinde ya da steril tuzlu su içinde konsantrasyonu 2 mg/ml olacak şekilde sulandırılır. Epirubicin-HCl sulandırılmadan önce buzdolabında bekletilmelidir. Sulandırılmış solüsyonlar oda sıcaklığında 24 saat stabildir ve gün ışığına maruz bırakılmaktan korunmalıdır. Epirubicin-HCl solüsyonu gün ışığında 25°C'de 20 saat bırakıldığında başlangıçtaki konsantrasyonunun %57'si azalmıştır. Dondurulmuş sulu solüsyonları çözüldükten sonra epirubicin-HCl aktivitesinde %12'lik bir kaybın olduğu bildirilmiştir (Twelves vd 1992).



Şekil 2.7. Epirubicin-HCl'nin kimyasal yapısı (Ulakoglu ve Altun 2004)

2.3.2. Epirubicin-HCl'nin etki mekanizması, farmakokinetiği ve antineoplastik aktivitesi

Epirubicin-HCl'nin sitotoksik etkisi doxorubicinin etkilerine benzerdir. İlaç, nükleotid baz çiftleri arasına girerek DNA ile kompleks oluşturur ve bu da nükleik asit (DNA ve RNA) ve protein sentezinin inhibisyonu ile sonuçlanır. Ayrıca epirubicin-HCl, DNA-topoizomeraz II kompleksini stabilize edip topoizomeraz II'nin katalizlediği ligasyon reaksiyonlarını önleyerek topoizomeraz II aktivitesini inhibe eder. Bu da topoizomeraz II tarafından çift iplikli DNA kırılmasını tetikler. Epirubicin-HCl, aynı zamanda, çift iplikli DNA'nın enzimatik ayrılmasını önleyerek ve replikasyon ve transkripsiyonu engelleyerek, DNA helikaz aktivitesini inhibe eder (Mays vd 2010, Perry 2008). Ayrıca, epirubicin-HCl sitotoksik serbest radikaller üreterek oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarında da yer almaktadır. Yapılan çalışmalarla da, meme (MCF-7), karaciğer (Hep G2) ve akciğer (H1299) kanseri hücrelerinde epirubicin-HCl reaktif oksijen türleri oluşturarak SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz aktivitelerinin artışına neden olduğu gösterilmiştir (Ozkan vd 2004, Ozkan ve Fışkın 2004, Ozkan 2007). Antrasiklinler, aynı zamanda hücre zarının bütünlüğünü ve aktivitesini etkileyebilirler (Plumbridge vd 1978, Young vd 1981). En fazla hücre

ölümünü, hücre döngüsünün S fazında oluştururlar. Ancak, yüksek konsantrasyonların etkileri erken G2'nin yanı sıra M aşamasında da görülmüştür (Hill ve Whelan 1982).

Epirubicin-HCl'nin farmakokinetiği doxorubicine benzer niteliktedir. Epirubicin-HCl, doxorubicin gibi öncelikli olarak karaciğer ve safra sistemi tarafından elimine edilmektedir. Doxorubicin için eliminasyon yarılanma ömrü 40 ile 70 saat olmasına karşılık epirubicin-HCl'nin yarılanma ömrü ise 30 ile 40 saattir (Natale vd 1983). Epirubicin-HCl'nin plazmadan atılması karaciğer metastazlı ya da anormal karaciğer fonksiyonlarına sahip hastalarda önemli bir biçimde azalmıştır. Bu hastalarda %50 dozaj azalmasının olduğu gösterilmiştir (Camaggi vd 1982).

Hepatomalı 12 hasta epirubicin-HCl ile tedavi edildiğinde hastalarda 3., 8. ve 44. haftalarda bölgesel gerileme olduğu tespit edilmiştir (Muggia vd 1984). Sistemli bir şekilde epirubicin-HCl uygulanmış 21 hasta arasındaki tüm cevap oranı %14'dür (Kolaric vd 1983, Robustelli Della Cuna vd 1983, Muggia vd 1984). Sistemli bir şekilde doxorubicin uygulanmış karaciğer kanserli hastaların cevap oranı ise %57'dir. Birçok çalışma 20 hastadan daha az olan gruplarda yapılmıştır. Cevap oranının %20'den az olduğu, Amerika'da yapılan üç çalışma ile gösterilmiştir (Macdonald vd 1982).

Çalışmamızda epirubicin-HCl'yi tercih etmemizdeki en önemli neden doxorubicine ve diğer antrasiklinlere göre daha az kardiyotoksisiteye neden olmasıdır.

2.4. Apoptoz

2.4.1. Apoptozun tanımlanması

Apoptoz, apo-TOE-sis kelimelerinden köken almakta olup eski Yunancada "sonbaharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir. Hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır (Touchette ve Fogle 1991). Programlanmış hücre ölümü terimi olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır.

Apoptoz terimi 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından programlanmış hücre ölümünü tanımlamak için kullanıldı. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır (Kerr vd 1972).

1993 yılında Cohen yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozu seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri aktifleştirerek hücreleri apoptoza yönlendirdiğini bildirmiştir (Cohen 1993a). Böylece apoptozun genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır (Cohen 1993b).

2.4.2. Apoptozu uyaran sinyaller

a) Hücre dışı: Hormonlar, büyüme faktörleri

b) Hücre içi: İyonize radyasyon, viral infeksiyon, serbest radikallerden dolayı meydana gelen oksidatif hasar (Anonim 3).

2.4.3. Apoptozda hücre içi sinyal iletimi ve metabolik değişiklikler

Hücre içi sinyal iletiminde yaygın olarak kullanılan kalsiyum (Ca^{++}) apoptozda da rol oynar. Hücre içindeki kalsiyum iyonlarının miktarındaki artış hücreyi apoptoza götürmektedir (Geoffey ve Robert 2004). Sitoplazmadaki kalsiyum iyonu miktarındaki hafif artış, c-myc, c-fos, ısı şok proteinlerini harekete geçirir ve hücrenin apoptoza gitmesine neden olur. Kalsiyum, adenilat siklazları aktive ve inhibe etme yeteneğine sahiptir. Siklik adenozin monofosfat (c-AMP) ve protein kinazlar üzerinden sinyal iletimini etkiler (Bellamy vd 1995). Sitoplazmada artan kalsiyum inaktif durumdaki kalsiyum bağımlı proteazları ve nükleazları aktive ederek sitoplazmik proteinlerin parçalanmasına ve apoptoza özgü internükleozomal DNA kırıklarına neden olur (Gerschenson ve Rotello 1993). Kalsiyum iyonu, inaktif durumdaki endonükleaz, proteaz, transglutamaz, fosfolipaz gibi latent enzimleri aktive ederek apoptoza neden olur (Earnshaw 1995).

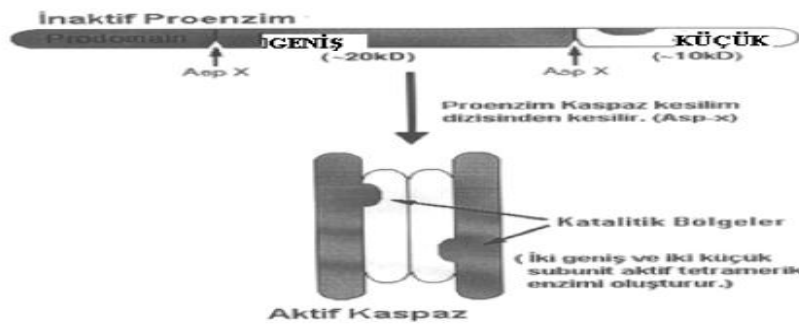
2.4.4. Apoptozun moleküler düzenleyicileri

Apoptozun her basamağı birçok proteinin birlikte çalışmasını gerektirir. Bu proteinler, kaspazlar, Bcl-2 ailesi, p53 ve TNF ailesidir (Indrajit ve Binu 2006).

2.4.4.1. Kaspazlar

Kaspazlar, sistein proteinazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağına kırarlar. Çoğu apoptozda görevli 14 farklı kaspaz tanımlanmıştır. Kaspazlar, tek polipeptid zinciri halinde sentez edilirler ve üç tane bölgeleri vardır. Bunlar efektör ölüm (death effector domain: DED), kaspaz toplama (caspase recruitment domain: CARD) ve ölüm bölgeleridir (death domain: DD) (Indrajit ve Binu 2006).

Tüm kaspazlar hücre içinde inaktif olarak bulunurlar ve proteolitik işlemlerle kırılarak aktif olurlar. İnaktif kaspazların aktivasyonu, granzim B aracılığıyla, sitotoksik T hücre granüllerinde bulunan aspartata özgü serin proteinazlar aracılığıyla veya aktif olan kaspaz proteininin inaktif olan kaspaz ile etkileşimi sonucu gerçekleşebilir (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Kaspaz aktivasyonu (Yılmaz ve Pençe 2002)

Kaspazlar, yapısal özelliklerine ve fonksiyonlarına göre şu üç grupta sınıflandırılırlar; inflamatuvar kaspazlar olarak adlandırılan grup I kaspazlar (kaspaz 1, kaspaz 4, kaspaz 5), başlatıcı kaspazlar olarak bilinen grup II kaspazlar (kaspaz 2, kaspaz 8, kaspaz 9, kaspaz 10) ve efektör kaspazlar olarak adlandırılan grup III kaspazlar (kaspaz 3, kaspaz 6, kaspaz 7) (Indrajit ve Binu 2006). Ölüm reseptörleri aracılığıyla tetiklenen apoptotik sinyal, kaspaz 8 veya kaspaz 10 gibi başlatıcı kaspazların aktivasyonunu sağlarken mitokondriyal apoptotik sinyaller kaspaz 9'u aktif hale getirir. Daha sonra bu kaspazlar diğer kaspazları aktifleştirerek proteolitik bir kaskada neden olurlar. Bu kaskad sonunda efektör kaspazlar olan kaspaz 3, 6 veya 7 aktive olur. Bu aktivasyon, nükleaz inhibitörü, hücre iskeleti ve önemli hücre proteinlerinde bölünmeye yol açarak DNA'da parçalanmaya ve tipik morfolojik değişikliklere neden olur (Indrajit ve Binu 2006).

Yaşayan hücrelerde kaspaz aktivasyonu apoptoz inhibitör proteinleri (IAP) adı verilen hücresel proteinler aracılığıyla kontrol altında tutulurlar (Salvesen ve Duckett 2002). İnsanlarda altı tane IAP tanımlanmıştır; NAIP, c-IAP1 (HIAP2), c-IAP2 (HIAP-1), XIAP, survivin ve BRUCE'dir (Deveraux ve Reed 1999).

2.4.4.2. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 proteinleri apoptoz regülasyonunda, hücre yüzeyi ile hücre içi ölüm sinyalleri arasında denetim noktası olarak, apoptozom oluşum safhasında ve kaspaz kaskadının aktivasyonunda önemli rol oynar (Sato vd 1994, Burlacu 2003).

Bcl-2 ailesi iki düzineden daha fazla üyeye sahiptir ve birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri apoptozu tetikleyici (en iyi bilinenler: bax, bid, bcl-Xs, bad, bim, bak, bok, PUMA, NOXA), diğeri ise apoptozu baskılayıcı (en iyi bilinenler: bcl-2, bcl-X1, Mcl-1) etkiye sahiptir. Bcl-2 ailesinin üyeleri BH1, BH2, BH3, BH4 bölgelerinden en az birini içerirler (Anonim 4).

Apoptozu tetikleyen üyeler kendi aralarında; BH1, BH2, BH3 bölgelerinden her üçünü bulduranlar (Bax, Bak) ve sadece BH3 içerenler (bid, bad, bim, PUMA, NOXA) olmak üzere ikiye ayrılırlar. Apoptozu baskılayan üyelerin hepsi bölgelerin dördüne sahiptirler. Ölüm sinyali olmadığı zaman Bcl-2 proteinleri hücre içinde ayrı kompartımanlarda bulunurlar. Ölüm sinyali alındığı zaman, apoptozu uyaran üyeler değişime uğrarlar, daha sonra mitokondrinin dış membranına entegre olurlar ve mitokondriden apoptozu başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin salıverilmesine neden olurlar. Bu olaylar gerçekleşirken apoptozu baskılayan üyeler ise inaktif durumdadırlar (Griffiths vd 1999).

Apoptozun diğeri önemli moleküler düzenleyicileri p53 ve tümör nekrozis faktör (TNF)'dür. p53, apoptozu tetikleyen birçok farklı gen ürününün sentezini artıran transkripsiyon faktörüdür. p53'ün sentezlerini arttırdığı apoptozu tetikleyen gen ürünleri, hücre döngü gelişim inhibitörleri, p53 aktivitesini kontrol eden düzenleyiciler, oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stres mediatörleri, ölüm reseptör sinyal yolunun komponentleri ve bcl-2 ailesinin apoptozu tetikleyen proteinleridir. p53 aynı zamanda transkripsiyondan bağımsız olarak da apoptozu tetikleyebilir. p53, hücrede bir şekilde DNA hasarı olduğu zaman hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre döngüsünü

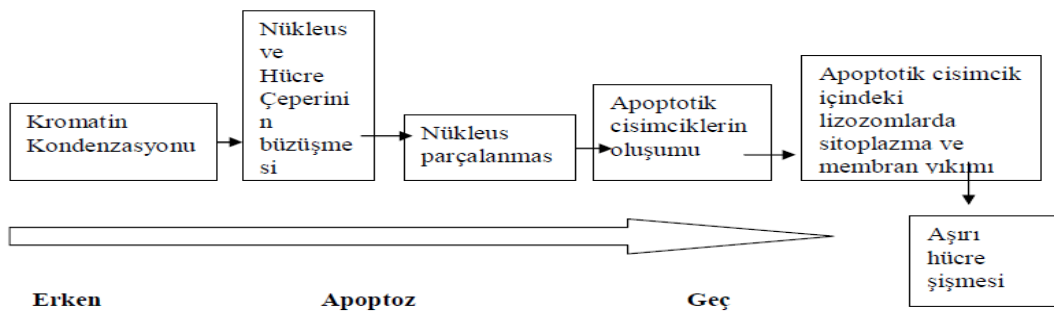
G1 fazında durdurur ve hücreye DNA tamiri için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse Bax'ın sentezini arttırarak apoptozu tetikler (Erster ve Moll 2005). Wild tip p53'e sahip hücreler ile mutant p53'e sahip hücrelerin cetuximaba karşı farklı duyarlılığa sahip oldukları yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Huether vd 2005).

Tümör Nekrozis Faktör (TNF), bir sitokindir ve apoptoz, hücre proliferasyonu, immünomodülasyon, inflamasyon, alerji ve otoimmün hastalıklara aracılık eder. TNF, transmembran proteini olarak sentez edilir. TNF'nin membrana entegre formu (mem-TNF) proteolitik bölünme ile çözünür (soluble) TNF halini alır. TNF, biyolojik fonksiyonlarını iki farklı reseptör aracılığıyla gerçekleştirir, tip 1 (TNF-R1) ve tip 2 (TNF-R2). Hücrenin ölüm sinyalinin aktarımı, TNF-R1'in sitoplazmik ölüm bölgesi aracılığıyla gerçekleşir. Bu durum kaspaz 8 aktivasyonuna veya mitokondri bağımlı döngünün aktivasyonuna, sonuç olarak da apoptoza neden olur (Aggarwal 2000).

2.4.5. Apoptoz sürecinin değerlendirilmesi

Apoptoz süreci, hücre ölümüne neden olan uyarı ile başlar ve enerji bağımlı kaskad ile sona erer. Bu süreç, 4 faz halinde özetlenebilir:

1. Erken veya başlangıç fazı: Apoptoz, apoptotik cevaba neden olan uyarı ile başlar. Apoptotik cevap, hücre dışı bir sinyalin hücre yüzey reseptörlerini uarmasıyla tetiklenebileceği gibi, ilaçlar, radyasyon veya toksinlerin neden olduğu hücre içi uyarılar ile de tetiklenebilir.
2. Sinyal transferi fazı: Sinyal veya metabolik durumun algılanması ve bu algılanan sinyal veya metabolik durumun hücre ölüm efektör sistemine iletilmesi.
3. Efektör faz: Kaspaz sisteminin aktivasyonu (Chowdhury vd 2006).
4. Hücre ölümünden sonraki faz: Hücrelerin kromatin veya DNA'larının sindirimini ve ölen hücrelerin fagositik hücreler tarafından tanınarak yok edilmelerini içerir (Chowdhury vd 2006) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Apoptozda oluşan erken ve geç morfolojik değişiklikler (Huerta vd 2007)

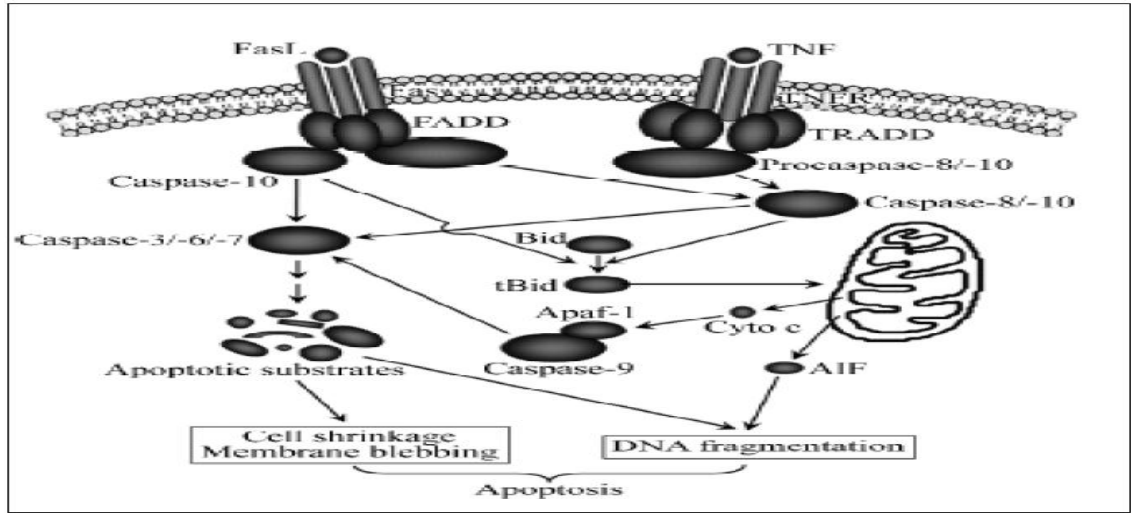
2.4.5.1. Apoptoz sürecinin hücre içi veya hücre dışı uyaranlarla tetiklenmesine göre değerlendirilmesi

Hücreler, hücre içi veya hücre dışı çevrede meydana gelen büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, HIV, kemoterapi, radyasyon, yüksek doz glikokortikoid,

Fas ve TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu ve oksidatif stres gibi hücre ölüm uyarıları ile tetiklenerek iki ayrı yol ile apoptoza giderler. Bu ana yollardan birisi ekstrinsik yol; hücre dışı ölüm uyarıları ile tetiklenen reseptör aracılı apoptoz, diğeri ise intrinsik yol; hücre içi uyarılar ile tetiklenen mitokondri aracılı apoptozdur (Anonim 4).

2.4.5.1.1. Ekstrinsik yol (reseptör aracılığı ile apoptoz)

Ekstrinsik yolda apoptoz, hücre ölüm reseptörleri olan Fas ve TNF-R1'in kendi ligandları ile etkileşime girmesi sonucu başlar. Fas ligandı (Fas L), sitotoksik T lenfositlerde ve doğal öldürücü (natural killer) hücrelerde bulunur. TNF-R1'in ligasyonu, TNF-R1'e TNF'nin bağlanması ile gerçekleşir (Hung ve Chow 2004). Fas ve TNF-R1 kendi ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olurlar. Fas reseptörü, birbirine komşu iki Fas ligandının birbirleriyle bağlanması sonucu trimer kompleks halinden hexamer kompleks haline dönüşür. Daha sonra, Fas reseptörü kendisinin intrasitoplazmik ölüm bölgesi olan Fas ilişkili ölüm domaini (FADD) ile TNF-R1 ise kendi intrasitoplazmik ölüm bölgesi olan Trail Reseptör İlişkili Ölüm Domaini (TRADD) ile etkileşime girer. Böylece ölüme sebep olan sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Bu kompleks, prokaspaz 8'in efektör ölüm bölgesi (DED) ile birleşerek prokaspaz 8'in aktif formu olan kaspaz 8'in oluşumuna neden olur (Şekil 2.10). Kaspaz 8, ya prokaspaz 3'ü aktive ederek hücre ölümüne sebep olur ya da Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bid'in c-terminal bölgesini keserek aktif formu olan tBid'in oluşmasına ve böylece apoptozun intrinsik yola doğru ilerlemesine neden olur. Hücreler, bu iki yoldan birisine daha fazla yatkındırlar. Tip 1 hücreler (lenfositler), kaspaz 3 aktivasyon yolunu tercih ederken Tip 2 hücreler (hepatositler), intrinsik yola doğru ilerlemeyi tercih ederler (Hung ve Chow 2004).

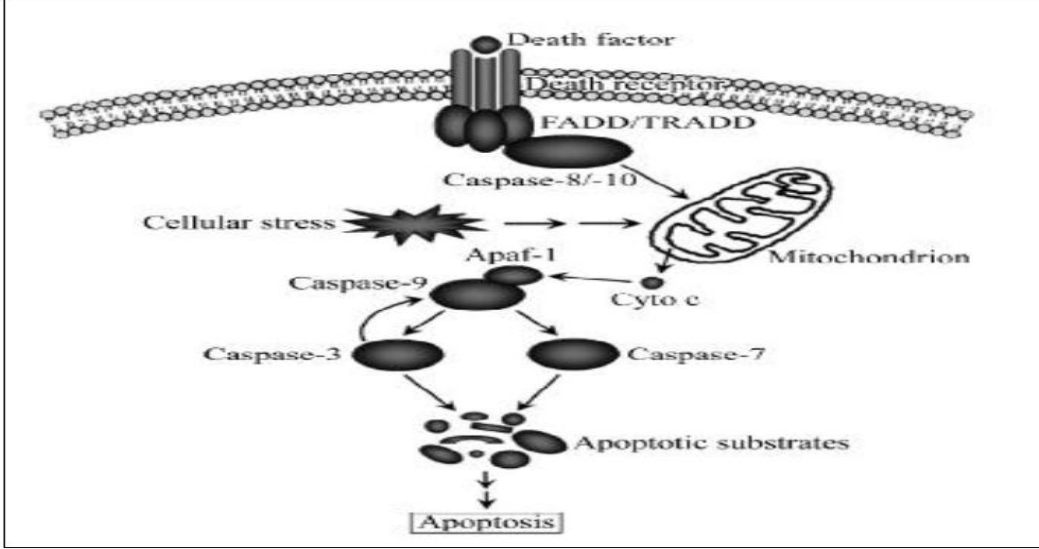


Şekil 2.10. Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile tetiklenen apoptoz yolu (Fan vd 2005)

2.4.5.1.2. İntrinsik yol (mitokondri aracılığı ile apoptoz)

Sitotoksik ilaçlar, oksidatif stres, iyonize radyasyon, DNA hasarı, büyüme faktör eksikliği gibi nedenlerle oluşabilen ölüm sinyali, Bcl-2 ailesinin sadece BH3 bölgesini içeren üyeleri (bid, bad, bim, PUMA, NOXA) tarafından mitokondriye taşınır. İntrinsik

yolun en önemli bölümü, mitokondri dış membran geçirgenliğinde oluşan artıştır (Barnes 2004). Bu artış mitokondriden apoptozun aktivasyonuna neden olan başta sitokrom-c olmak üzere Smac/diablo (mitokondriden türemiş kaspaz aktivatörü/düşük pI'da doğrudan IAP'ye bağlanan protein), apoptoz uyarıcı faktör (AIF) ve endonükleaz G gibi maddelerin salınımına neden olur. Sitokrom-c, apoptotik proteaz aktivatör faktör 1 (Apaf-1) ve pro-kaspaz 9'a bağlanarak apoptozom adı verilen oligomerik Apaf-1 kompleksinin (Apaf-1 + sitokrom-c + ATP + Prokaspaz 9) oluşumunu sağlar (Şekil 2.11). Aktifleşen kaspaz 9, pro-kaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktif hale getirir.



Şekil 2.11. Mitokondri aracılığı ile tetiklenen apoptoz yolu (Fan vd 2005)

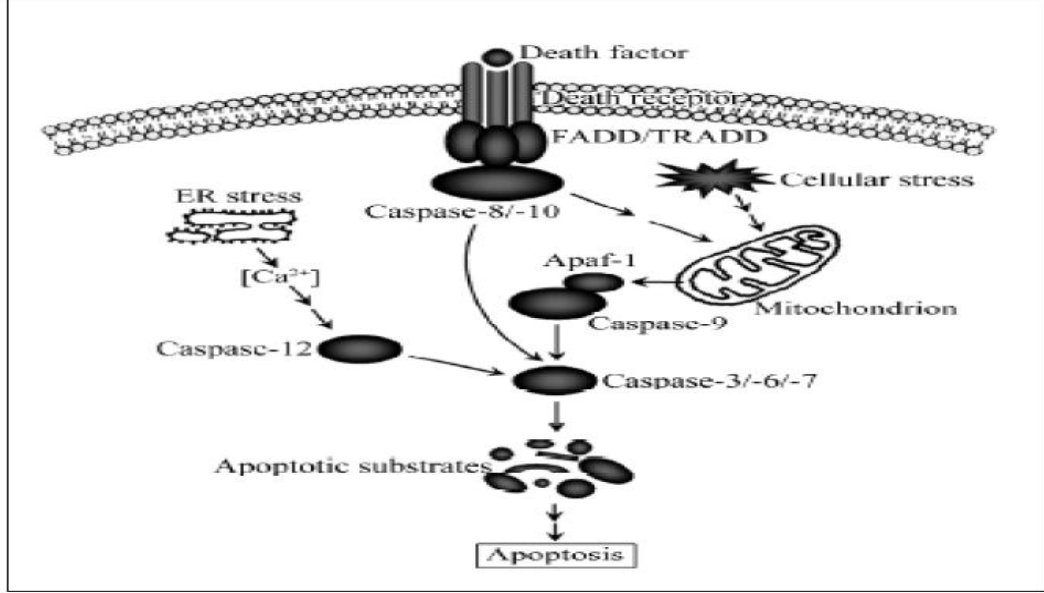
Böylece kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir. CAD, apoptozun karakteristik bulgularından olan kromatin yoğunlaşmasına ve oligonükleozomal DNA parçalanmasına neden olur. Ayrıca aktif kaspaz 3, ilgili proteinleri (hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimerazı (PARP)) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin oluşmasını da sağlar.

Smac/diablo kaspazlara bağlanarak kaspaz inhibisyonuna yol açan IAP'nin yerini değiştirerek kaspaz aktivasyonunu sağlarlar. AIF doğrudan nükleusa giderek kromatin yoğunlaşmasını başlatır ve endonükleaz G kaspaz aktivasyonundan bağımsız olarak nükleustaki parçalanmaya katılır (Kuhn vd 1976).

2.4.5.1.3. Endoplazmik retikulum aracılığı ile apoptoz

Endoplazmik retikulum, hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanması içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir. Hücre içi kalsiyum seviyeleri yükseldiğinde, endoplazmik retikulum membranında lokalize olan prokaspaz-12 aktifleşir ve sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek kaspaz kaskadını aktive eder (Şekil 2.12). Kaspazların etkilediği hedef noktalar; DNA hasarının tamirinden sorumlu poli ADP riboz polimeraz, DNA-bağımlı

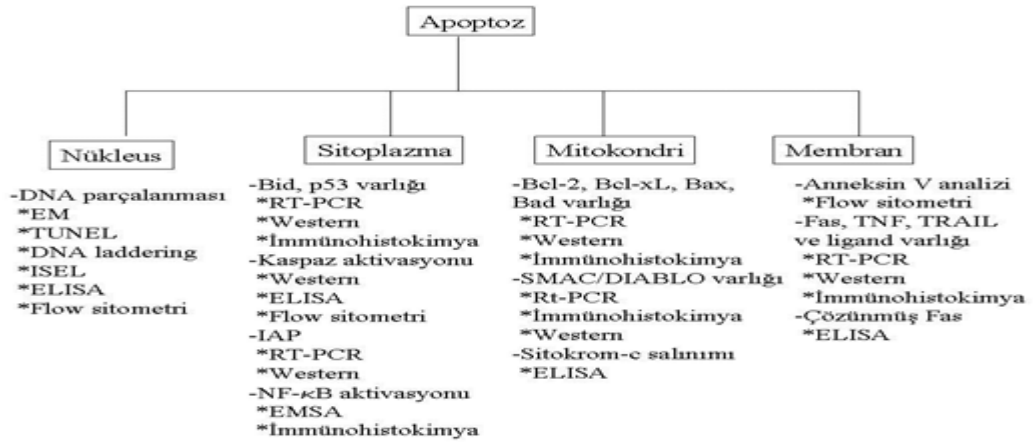
protein kinaz, nükleus membranının integritesini sağlayan laminler ve U1 ribonükleoprotein (U1RNP), DNA'nın parçalanmasına yol açan nükleazları inhibe eden DNA fragmentasyon faktörü 45 adlı protein, hücre içi kolesterol homeostazından sorumlu bir integral protein olan sterol düzenleyici element bağlayıcı protein, bir tümör baskılayıcı gen olan retinoblastom geni ve hücre iskelet proteinlerinden Fodrin olarak özetlenebilir (Yüksel vd 2008).



Şekil 2.12. Endoplazmik retikulum aracılığı ile tetiklenen apoptoz yolu (Fan vd 2005)

2.4.6. Apoptoz belirleme yöntemleri

Apoptoza giden hücreleri saptama yöntemleri, bakılan kriterlere ve duyarlılığına bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Günümüzde kullanılan ve organellere göre dağılımı yapılan yöntemler Şekil 2.13'de özetlenmiştir.



Şekil 2.13. Her bir yöntemin, apoptoz sürecinde görev alan organellere göre dağılımı (Öktem vd 2001)

2.4.7. Kanser ve apoptoz

Malign hastalıklar, kontrolsüz aşırı hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının olduğu hastalıklar olarak tanımlanır. Ancak aşırı çoğalmanın yanında azalmış apoptotik ölüm hızının da malignite gelişiminde rol oynadığı görülmüştür. Fizyolojik ömrünü tamamladığı halde çeşitli nedenlerle apoptoza gidemeyen hücreler malign hücrelere dönüşme potansiyeline sahiptir (Stratton vd 2009).

Kansere neden olan bazı virüsler enfekte ettikleri hücrelerde fizyolojik olarak apoptozu engellerler. Bu şekilde davranan iki tip Human papilloma virüsü (HPV)'nin serviks kanseri oluşturdukları saptanmıştır. HPV virüslerinden biri E6 adında protein üreterek apoptozu başlatan p53'e bağlanır ve apoptozu inaktive eder. Epstein-Barr Virüsü de Bcl-2'ye benzer bir protein salgılar veya salgıladığı bir proteinle hücrenin Bcl-2 protein üretimini arttırılmasını uyarır. İki olay da hücreyi apoptoza karşı daha dirençli kılar. Bu şekilde çoğalmaya devam eden hücre kanser hücresi haline gelir. Kanseri hücreleri virüsler olmadan da apoptozu engelleyebilirler. B-hücre lösemilerinin ve lenfomaların bazı tiplerinde Bcl-2 proteini yüksek seviyede eksprese edilir. Bu apoptoz uyarılarını bloke eder. Apaf-1'i kodlayan genin ekspresyonu engellendiği için malign melanomlu hastalar apoptoza karşı direnç gösterirler. Bazı kanser hücreleri sitotoksik T8 hücrelerinin Fas Ligand kısımlarını bağlayan bir molekül salgılayarak T-hücrelerinin apoptoz mekanizmalarını başlatmalarına izin vermezler. Dolayısıyla bozulan bu mekanizma kanser hücrelerinin fizyolojik olarak apoptozunu engeller (Lowe ve Lin 2000).

2.5. Oksidatif Stres

Serbest radikaller organizmalarda sürekli olarak oluşturulan ve antioksidan savunma sistemi tarafından düzenli olarak ortadan kaldırılan moleküllerdir. Bu mekanizmada serbest radikallerin oluşumu ile bunların antioksidan sistem tarafından ortadan kaldırılması arasında bir denge söz konusudur ki bu dengeye oksidatif denge adı verilir. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerin olumsuz etkilerinden zarar görmez. Antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kalması veya serbest radikal oluşumunun artması nedeniyle oksidatif dengenin serbest radikaller yönüne kayması durumunda oksidatif stres meydana gelir (Serafini ve Del Rio 2004, Hermes-Lima vd 2001).

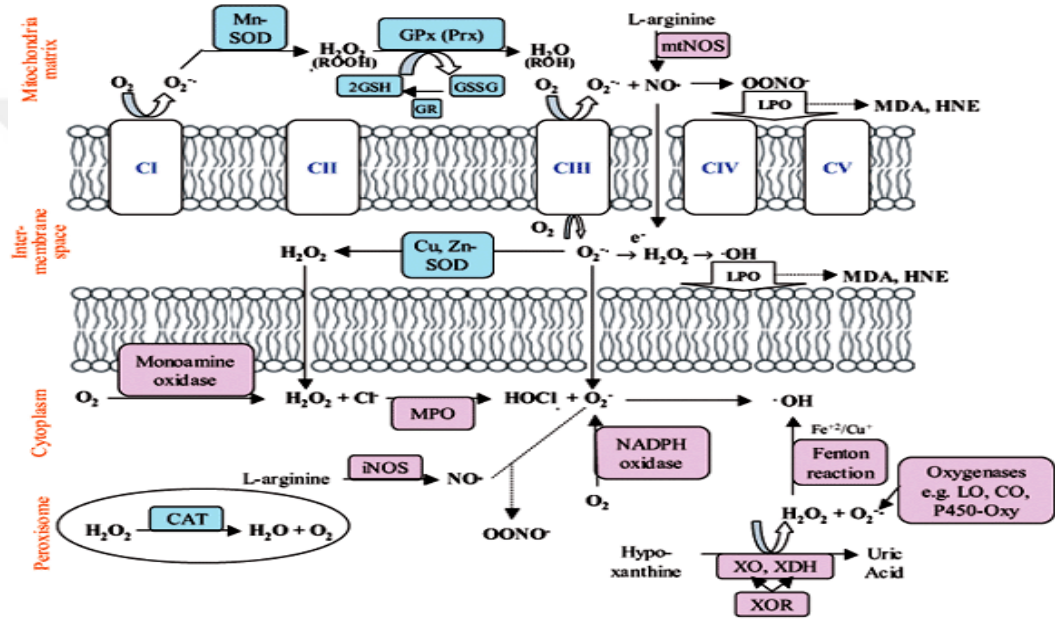
Az miktarda serbest radikal oluşumu bazı durumlarda, örneğin bakterilerin nötrofiller tarafından oksijen radikalleri ile öldürülmesi gibi, organizmaya yararlı olabilir. Bunun yanında fazla miktarda serbest radikal oluşumu sonucu oluşan oksidatif stres ile hücrede DNA, proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve enzimlerin zarar görmesine yol açabilir (Song 2004, Nordberg ve Arner 2001).

Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS) olan süperoksit anyonu (O_2^-), hidrosil radikali (OH \cdot), peroksil radikali (ROO \cdot) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerini oluştururlar (Babior 2000).

2.5.1. Serbest radikaller

Atomların çekirdeklerini çevreleyen ve içinde elektronların bulunduğu boşluklara orbital adı verilmektedir. Her bir orbitalde spinleri birbirine ters yönde olan iki elektron bulunur. Bu elektronlara eşlenmemiş veya ortaklanmamış elektronlar denir (Halliwell 1984).

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran reaktif atom veya moleküllerdir (Mercan 2004). Bu elektronlar üst kısımlarına konulan nokta ile ifade edilirler (Akkuş 1995). Serbest radikallerin reaktivitesi karşı spin yönünün bir elektron kazanma isteğinden dolayı oluşur (Deaton ve Marlin 2003) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Serbest radikallerin hücre içi kaynakları (Altuğ 2009)

2.5.2. Reaktif oksijen radikalleri

Reaktif radikallerden fizyolojik olaylarda ve oksidatif strese en fazla rol alanı reaktif oksijen radikalleridir. Bu grupta süperoksit ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil (OH^{\cdot}), hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet O_2 , hipoklorik asit ($HOCl$), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$), hidroperoksil (HO_2^{\cdot}), lipid peroksit ($LOOH$), nitrik oksit (NO^{\cdot}) ve nitrojen dioksit (NO_2^{\cdot}) bulunmaktadır (McCord 2000).

2.5.3. Serbest radikallerin yol açtığı hasarlar

Serbest radikaller, genelde iç ve dış etkenlere bağlı olarak üretimindeki artış ve antioksidan sistemin yetersizliğine bağlı olarak başta membran lipidleri olmak üzere, proteinler, karbonhidratlar ve DNA'ya önemli zararlar verebilmektedirler. Bu zararlar hücrenin cinsine, maruz kalınan strese ve şiddetine bağlı olarak (Vaca vd 1987,

Freeman ve Crapo 1982), toksik, mutajenik veya karsinojenik olabilir (Nordberg ve Arner 2001).

2.5.4. Antioksidan savunma sistemleri

Normal fizyolojik şartlarda, hücreler oluşan serbest radikal ürünlerinin belirli bir düzeyin altında tutulması ve dolayısıyla onların neden olduğu oksidatif hasarların engellenmesi için enzimatik ve non-enzimatik yapılardan oluşan antioksidan savunma sistemlerine sahiptirler. Hücreler bu sayede serbest radikallerden ve lipit peroksidasyonundan korunurlar (Thomas 1995, Gutteridge ve Halliwell 2000, Mates 2000, Urso ve Clarkson 2003, Deaton ve Marlin 2003, Valavanidis vd 2006).

Özellikle enzimatik savunma sistemleri reaktif oksijen türevleri, reaktif nitrojen türevleri (RNT) ve bunların ara ürünlerini ortadan kaldırma, nötralize etme ya da süpürme yeteneğine sahip molekülleri içerirler (Mruk vd 2002).

Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler (Winston 1991, Murray vd 1993, Hermes-Lima vd 2001);

- 1- Serbest radikal oluşumunun engellenmesi
 - a- Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırarak
 - b- Oksijeni uzaklaştırarak veya konsantrasyonunu azaltarak
 - c- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırarak
- 2- Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi
 - a- Toplayıcı etki: ROS'ları etkileyerek onları tutmaya ve daha az reaktif başka moleküllere çevirmeye yönelik etki (enzimler).
 - b- Bastırıcı etki: ROS'lar ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olan etki (flavinoidler, vitaminler).
 - c- Onarıcı etki
 - d- Zincir kırıcı etki: ROS'ları ve zincirleme reaksiyon başlatacak olan diğer maddeleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki (hemoglobin, seroplazmin, mineraller, vitaminler).

Çeşitli özellikteki serbest radikaller için hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Hidrofilik özellikteki antioksidanlar sitozol ve ekstrasellüler sıvılarda, lipofilik özelliktekiler ise membranda ve lipoproteinlerde yer almaktadırlar (Blokhina vd 2003).

Antioksidanlar enzimatik ve non-enzimatik olarak sınıflandırılırlar. Hüresel seviyede etkili olan enzimatik sistemler içinde birincil olan antioksidan enzimler arasında süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon proksidaz (GPx) yer alır. Bu birincil savunma enzimlerinden başka dolaylı olarak antioksidan sistem içinde yer alan glutatyon redüktaz (GR) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimleri de vardır ve bunlara ikincil antioksidan enzimler denilmektedir. Non-enzimatik antioksidan savunma sistemleri ise başlıca glutatyon (GSH), vitamin A, C, E, melatonin, albümin, bilirubin, ürik asit vb. den meydana gelmektedir (Halliwell ve Gutteridge 1999, Aydın vd 2001).

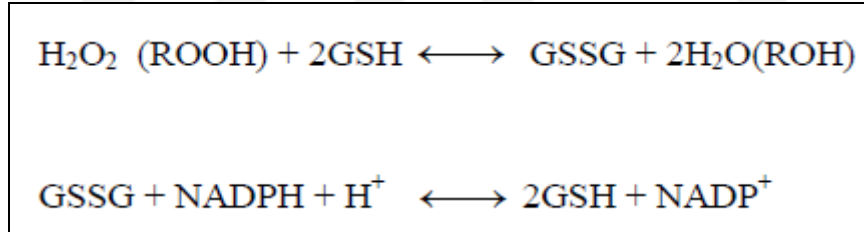
2.5.4.1. Glutasyon peroksidaz (GPx)

Glutasyon peroksidaz enzimi ilk kez Mills tarafından 1957 yılında hayvan eritrositlerinden izole edilmiş bir enzimdir (Arteel ve Sies 2001). Genellikle yüksek yapılı bitkilerde ve bakterilerde bulunmamakla birlikte bazı alg ve mantarlarda bulunduğu bildirilmiştir (Mills 1957, Halliwell ve Gutteridge 1999).

Glutasyon peroksidaz, elektron kaynağı olarak glutasyonu kullanarak hidrojen peroksit ve organik hiperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir. Mitokondri, sitozol ve hücre membranlarında bulunur (Deaton ve Marlin 2003).

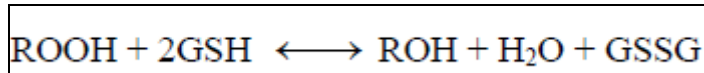
Bu enzimin iki ana tipi tanımlanmıştır. Bunlardan biri aktif bölgesinde selenosistein formunda kovalent bağlı selenyum içeren selenyuma bağımlı GPx'dir (Se-GPx). Se-GPx, organik hidroperoksitler ve H₂O₂'e karşı aktiftir. Diğeri ise glutasyon -S-transferaz olarak adlandırılan, katalizleme işlemi için selenyuma bağımlı olmayan H₂O₂'ye karşı ihmal edilebilir bir aktivite gösteren, daha çok organik hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumlu olan tiptir (Guemori vd 1991, Halliwell ve Gutteridge 1999, Cnubben vd 2001).

Se-GPx, her ünite aktif bölgesinde selenosistein formunda Se atomu içeren dört protein alt ünitesinden oluşur ve molekül ağırlığı yaklaşık 85 kDa'dur. Se-GPx'ler, H₂O₂'de dahil çeşitli hidroperoksitlerin yıkımını, glutasyonun (GSH) oksidasyonu yoluyla katalizler. Okside glutasyon (GSSG) ise glutasyon redüktaz yardımıyla tekrar GSH'a indirgenir (Halliwell ve Gutteridge 1999, Aydın vd 2001) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Selenyuma bağımlı glutasyon peroksidazın tepkime mekanizması

Selenyuma bağımlı peroksidazların bir diğeri formu da fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz (PL-GPx) dır. Molekül ağırlığı yaklaşık olarak 20 kDa olan enzim bir selenyum atomu içerir ve fosfolipid hidroperoksitleri alkollere indirgeyerek membran bağımlı en önemli antioksidan olan E vitamini eksikliğinde membranı peroksidasyona karşı korur (Halliwell ve Gutteridge 1999) (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidazın tepkime mekanizması

GPx enzim aktivitesinin tayininde en fazla tercih edilen yöntemlerin esası substrat olarak H₂O₂, kümen hidroperoksit ve tersiyer butil hidroperoksitin kullanıldığı ortamda GSH'ın oksidasyonu sonucu oluşan GSSG'nin glutasyon redüktaz ve nikotinamid

adenin dinükleotid fosfatın (NADPH) varlığında indirgenmiş forma dönüşmesine ve bu dönüşüm esnasında NADPH'nin oksidasyonunun spektrofotometrik ve flourometrik ölçümüne dayanır. Enzim aktivitesi dakikada okside olan NADPH üzerinden hesaplanır. Ayrıca reaksiyon esnasında hidroperoksitlerin ve GSH'nin tüketimi esas alınarak yapılan tayinlerde mevcuttur (Lawrence ve Burk 1976, Paglia ve Valentine 1967, Flohe ve Gunzler 1984).

2.6. Laktat Dehidrogenaz

Laktat dehidrogenaz (LDH), laktat ve pirüvatın birbirine dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Bu enzimin katalizlediği reaksiyonlarda koenzim olarak nikotinamid adenin dinükleotide (NAD⁺) gereksinim duyulur (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Laktat dehidrogenazın tepkime mekanizması

Glikolitik yolun bu önemli enzimi, vücudun bütün hücrelerinin sitoplazmasında bulunur. Kalp, karaciğer, kas, akciğer ve kan hücrelerinde en yüksek konsantrasyonda bulunduğundan, klinik uygulamada özellikle bu organların hastalıkları ile ilişkili araştırmalar sırasında kullanılır. Total aktivite yüksekliği, bu doku veya organlardan birinde hastalık bulunma olasılığını düşündürür. Ancak yüksekliğe sebep olan kaynağın belirlenmesi amacıyla, diğer bazı enzim aktivitelerinin ölçümü ve izoenzim dağılımının belirlenmesi de dahil olmak üzere ilave incelemelere ihtiyaç duyulabilir.

Laktat dehidrogenaz enzimi plazma membranı hasara uğradığında hızla hücre kültür ortamına salınmaktadır (Meissner vd 2004). Ölü ya da plazma membranı hasara uğramış hücrelerin sayısının artışı kültür süpernatantında LDH aktivitesinin artışına neden olmaktadır.

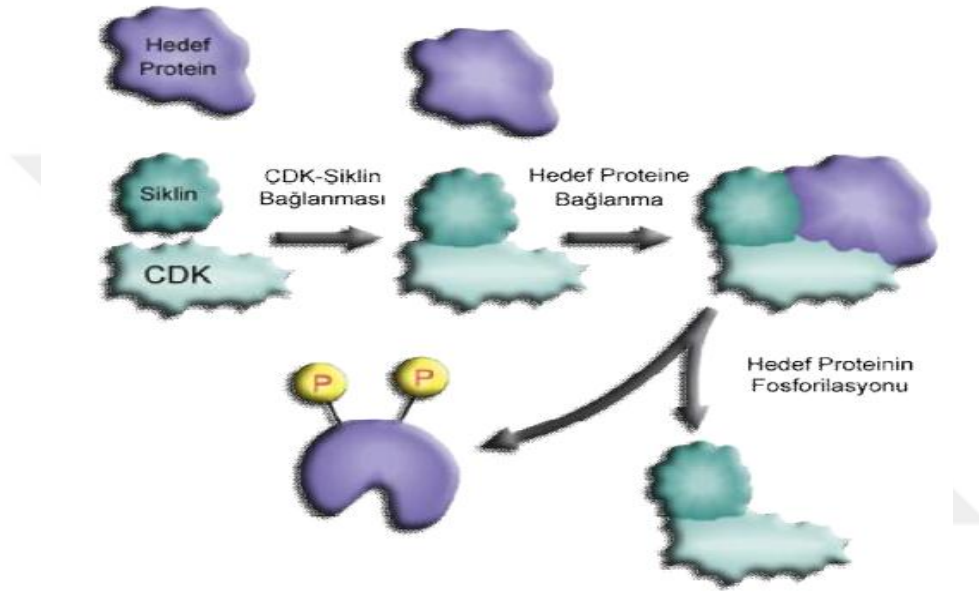
2.7. Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü prolifer olmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen ve bir dizi geçici biyokimyasal aktivitelerin ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir. Hücre döngüsü, proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi temel hücre fonksiyonları düzenlediğinden büyüme ve doku yenilenmeleri ile yakın ilişki içinde bulunmaktadır. İşte tüm bu düzenleme fonksiyonlarının hücre döngüsü içinde yer alışı organizmadaki hemen her tür fizyolojik veya patolojik durumda hücre döngüsünün nedenli kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir (El-Deiry vd 1993).

Hücre döngüsünün tümü belirgin bir evreler dizisi olmaktan çok bir süreklilik durumudur. Fakat kolaylık açısından döngünün alt kategorizasyonu yapılmıştır. Kısaca hücre döngüsü interfaz ve mitoz olarak ikiye ayrılabilir. İnterfaz sırasıyla G1, G0, S ve G2 evresine ayrılabilceği gibi mitoz da profaz, metafaz, anafaz ve telofazdan şeklinde alt kategorize edilebilmektedir.

2.7.1. Siklin alt üniteleri ve CDK-siklin kompleksleri

Hücre döngüsü, çoklu protein kinaz kompleksleri tarafından katalizlenen protein fosforilasyonu aracılığıyla kontrol edilir. Bir hücre bölünme döngüsü (CDC) kinazı, bir siklinle çalıştığında buna siklin bağımlı kinaz proteini (CDK) denir. CDK'lar kendi başlarına bulduklarında inaktiftirler ancak siklinlerle etkileşime girerek aktifleşirler ve böylece aktif siklin-CDK kompleksleri meydana getirebilirler (Çizelge 2.4). Bu aktif kompleks hedef proteinleri fosforile ederek döngünün devamlılığını sağlar. CDK-siklin protein kompleksinde CDK'lar katalitik alt üniteler iken siklinler regüle edici alt üniteler şeklinde görev yapar (Alberts vd 2002) (Şekil 2.18).



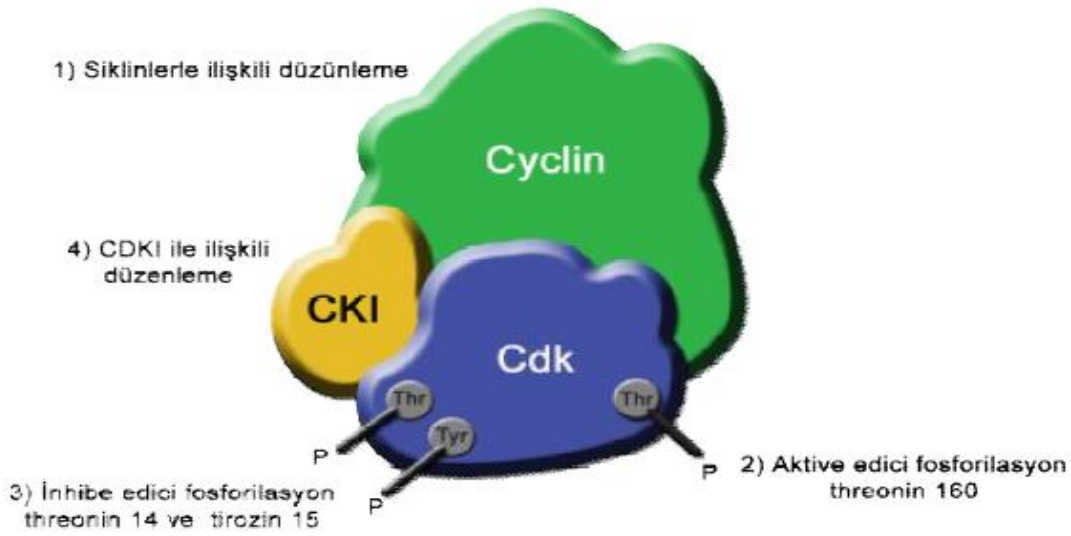
Şekil 2.18. CDK aktivasyonu ve hedef proteinin fosforilasyonu (Arı 2008)

Hücre döngüsünün ilerlemesi esnasında CDK aktivitesi en az 4 moleküler mekanizmayla düzenlenir. Düzenlemenin ilk basamağı CDK'ların kendi siklinleriyle eşleşmesidir. İkinci regülasyon CDK/siklin kompleksinde CDK'nın 160. pozisyonu civarında fosforile edilmesidir. CDK'ların fosforilasyonla aktivasyonu "CDK aktive edici kinaz" (CAK) ile katalizlenir. Bu katalizörün esası da yine bir CDK kompleksidir (CDK7/siklin-H).

Çizelge 2.4. Hücre Döngüsü evrelerine göre siklinler ve CDK partnerleri

Siklin-CDK Kompleks	Siklin	CDK Partner
G1-Cdk	Siklin D	Cdk4, Cdk6
G1/S-Cdk	Siklin E	Cdk2
S-Cdk	Siklin A	Cdk2
M-Cdk	Siklin B	Cdk1

CDK7/siklin-H kompleksi aynı zamanda RNA polimeraz II ile yapılan transkripsiyonda ve DNA tamirinde de görev yapar. Üçüncü regülasyon ise CDK proteinlerinin amino ucundaki threonin ve tirozin ile gerçekleşen inhibisyonudur. Özellikle CDK1 ve CDK2, threonin 14 ve tirozin 15'in fosforlanması ile inhibe edilir. Daha sonra CDK25 fosfataz ile defosforile edildiğinde aktif hale gelir. Son regülasyon ise CDK/siklin komplekslerine inhibitör proteinlerinin bağlanmasıyla gerçekleştirilir (Şekil 2.19). Ayrıca inhibitörlerde bir CDK inhibitör ailesi oluşturur. Örneğin p16 CDK inhibitör proteini CDK4-CDK6/siklin D kompleksine bağlanarak hücreyi özellikle G1 evresinde inhibe eder (Alberts vd 2002).



Şekil 2.19. CDK aktivitesinin moleküler organizasyonu (Arı 2008)

2.7.2. Büyüme faktörleri ve D siklinler

Dinlenme fazındaki (G0) bir hücre, büyüme faktörleri tarafından tekrar hücre döngüsüne dahil edilebilir. Büyüme faktörü sinyalleri ile hücre döngüsü arasındaki kritik ilişki D-siklinler ile düzenlenir. D tipi siklinler çabuk yıkılabildiğinden, büyüme faktörleri ortamdaki uzaklaştığında hücre içi derişimleri hızla düşer böylece büyüme faktörleri G1 evresinde olduğu müddetçe Cdk4/Siklin-D kompleksi, hücre döngüsünün, G1-S kontrol noktasından geçmesini sağlar. Eğer bu kısıtlama noktasından önce büyüme faktörleri ortadan kalkarsa hücrede siklin D düzeyi birden düşer ve hücre döngüsü G0'da sessiz, stabil kalır. Siklin-D'nin düzensiz ekspresyonu lenfoma ve göğüs kanserleri gibi çeşitli kanserlerin gelişimine katkıda bulunur. Ayrıca Cdk4/siklin D kompleksine bağlanan Cdk inhibitörlerine ait mutasyonlar, kanser hücrelerinde çokça rastlanmaktadır.

2.8. Kanserde İlaç Direnç Mekanizmaları

Sitotoksik kanser ajanlarına karşı direnç, insan kanserlerinin klinik tedavisinde en büyük engellerden biridir. Tümörler, ilaç taşıyan proteinlerde artış olduğunda, ilaç-hedef etkileşimlerinde değişiklik olduğunda ve apoptoz yeteneğinin azalmasına sebep olacak moleküler değişikliklere maruz kaldıklarında kemoterapiye direnç gösterirler. Bununla birlikte bu değişiklikler, tümörlerde bulunan dirençli hücrelerin ilaç muamelesinden sonra neden hayatta kaldığını ve sonunda ilaç direnci oluşturduklarını açıklamak için yeterli değildir.

Sitotoksik etkenlere karşı tümör hücrelerinin geliştirdiği birçok ilaç direnç mekanizması bulunur. P-glikoprotein (P-gp) ya da çoklu-ilaç direnci proteini (MDR1) (Gottesman ve Pastan 1993), MDR-ilişkili protein (MRP) (Cole vd 1992), meme kanseri direnç proteini (BCRP) (Litman vd 2000) ve akciğer direnç proteini (LRP) (Scheffer vd 2000) gibi ilaç taşıma proteinlerinin aracılık ettiği mekanizma bunlardan ilkidir. Bir diğeri ise tümör hücrelerinde sitotoksik etkenler ve radyasyon tarafından indüklenen apoptoza karşı geliştirilen dirençle ilgilidir. (Sellers ve Fisher 1999). Bu mekanizma B-hücre lösemi 2 (Bcl-2), Bcl-XL, A1/Bfl1 gibi antiapoptotik proteinlerin artışı ve p53 proteinindeki mutasyonları kapsar. Transkripsiyon faktörü nuklear faktör kappa Beta'nın (NF-κB) artan aktivitesi, sitotoksik etkenlere ve tümör nekroz faktöre (TNF) cevaben tümör hücrelerinin kemoterapiye direnç kazanmalarını sağlayan en önemli mekanizma olarak belirtilmiştir (Wang vd 1996).

Bazı durumlarda etkili bir kemoterapi ve hızlı iyileşme için farklı hücre hedefleri olan, farklı hücre içi mekanizmaya sahip birden çok ilaç kullanılır. Sıklıkla direnç mekanizması bu çoğu farklı yapısal ve fonksiyonel özelliklere sahip, birbiriyle bağlantısız ilaçlara karşı birlikte direnç gösterir. Bu fenomen 'çoklu ilaç direnci' (MDR) olarak tanımlanır (Gottesman vd 1994). Bu direnç hücre içinde ilaç birikimini sınırlandıran, membran lipitlerini etkileyen, ilaçları hücre dışına atışı hızlandıran değişikliklerle sonuçlanır (Liu vd 2001). Bu değişikliklerin çoğu antikanser ilacının aktive ettiği apoptozu (Lowe vd 1993), DNA hasar tamirini, ilaç detoksifikasyon mekanizmalarını (Synold vd 2001) ve hücre döngüsündeki değişiklikleri bloke eder. MDR fenotipi MDR1 geninin indüksiyonuyla ilişkilidir ve bu indüksiyon P-glikoprotein (P-gp) artışıyla sonuçlanır. P-gp, ATP bağlayan kaset (ABC)-tip transporter ailesinin 170 kD'luk bir üyesidir ve enerji bağımlı membran akış pompası olarak fonksiyon yapar. Sitoplazmik konsantrasyonlarını belirli bir seviyede tutmak için geniş çeşitlilikte yapısal olarak ilişiksiz ksenobiyotikleri taşır (Fardel vd 1996). Antrasiklinler, vinka alkaloidler, epipodofilotoksinler gibi çeşitli büyüklükteki heterosiklik bileşimleri hücre dışına taşıma yeteneğine sahiptir. P-glikoprotein, ince ve kalın bağırsak, karaciğer, pankreas, böbrek, ovaryum ve testis, hematopoietik sistem ve çocukluk çağı kanserlerini de içeren pek çok insan kanser hücrelerinde artış gösterir. P-gp gibi MRP'de (MDR bağlantılı protein) kemoterapötik ilaçları hücre dışına taşır.

MRP ailesi yedi üyelidir (Borst vd 2000). MRP1 ve MRP2 antrasiklinler, vinka alkaloidlerin hücre dışına taşınmasını sağlarlar. Bununla birlikte sadece MRP1 metotreksata taşır. MRP2 ise platin tuzlarını taşır. MRP4 proteinlerinin artışı metotreksata karşı hücre birikimini artırır, oysa MRP5 ekspresyonu merkaptopürin ve thioguanin gibi nükleotid analoglarına karşı direnç sağlar. BCRP'nin

artışı metotreksat, doksorubisin, topotecana direnç ile sonuçlanırken paklitaksel ve vinblastin gibi mikrotübül inhibitörlerine direnç oluşturmaz (Litman vd 2000).

Kemoterapi ve radyoterapinin gerçekleştirdiği tümör hücrelerinin ölümü büyük ölçüde apoptozun aktivasyonu ile gerçekleştiği için, apoptozun inhibisyonu antitümör tedavisine karşı tümör hücrelerini dirençli hale getirir (Solary vd 2000). Kemoterapi ve radyoterapiye karşı, tümör hücreleri hayatta kalmak için gerekli proteinlerin üretimini attırır. Bu proteinler apoptozu baskılayarak hücrelerin ölümden kaçmasını sağlarlar (Wang vd 1996).

Mitokondride gelişen bir dizi hücrel olayla başlayan apoptotik yolak Bcl-2 ailesinin üyeleri tarafından düzenlenir (Martinou ve Gren 2001). Bcl-2 ailesi proteinlerinin fonksiyonu pro-apoptotik ya da anti-apoptotik olabilir. Bcl-2 ailesinin, Bcl-XL ve A1/BFL 1 gibi anti-apoptotik üyeleri pro-apoptotik faktörlerin salınımını mitokondriden bloke edebilir (Degterev vd 2001). Bcl-2 ve onun homologu Bcl-XL anti-apoptotik olarak fonksiyon yapabilir ve kalsinörin, Raf1, GTPase ve Ras gibi proteinlerle etkileşebilirler (Adams ve Cory 1998). Onların etkileşiminden doğan sinyal transdüksiyonu NF-AT, p53-BP2 ve NF-κB gibi pek çok antiapoptotik transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu düzenler. Yüksek seviyedeki Bcl-2 ekspresyonu birçok insan tümöründe gözlenen bir durumdur ve Bcl-2 ekspresyon seviyesi agresif malign tümör gelişimi ile ilişkilidir. Bcl-2'nin TNF-α'nın indüklediği apoptozu bloke ettiği gösterilmiştir, Bcl-2 fonksiyonlarının baskılanması apoptozu başlatır (Gazitt vd 2001). Siklofosamid, metotreksat, antrasiklin, sitarabin, paklitaksel, ve kortikosteroid gibi çeşitli kemoterapötik ilaçlara kanser hücrelerinin direnç geliştirmesinde NF-κB, Bcl-2 ve Bcl-XL'nin katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Wuchter vd 1999).

Günümüzde kemoterapide istenen başarıya ulaşılamaması ve kanser hücrelerinin epirubicin-HCl gibi kemoterapötiklere direnç geliştirmesi kombine tedavilere ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Tümör hücreleri bir veya birden fazla kemoterapötik ajana karşı çeşitli mekanizmalarla direnç geliştirebilir ve klinikte tespit edilemediği erken dönemde dirençli hücreler tümör içerisinde var olabilir. Bu yüzden kanser tedavisinde uygulanacak stratejileri belirlerken tümörün içinde bulunan ilaca dirençli hücrelerin ve tümörün yakın çevresinde bulunan sağlıklı hücrelerin göz önünde bulundurulması gerekli olan bir durumdur. Tedavinin etkinliğini arttırmak için kullanılan ilaç dozları ise hastalarda görülen yan etkilerin artmasına neden olurken, ilaç dirençliliği nedeniyle zaman ve ilaç kaybı olmakta ve hastaların tedavisi daha da zorlaşmaktadır. Dolayısıyla, mevcut ilaçların terapötik etkilerinin artırılması için yapılacak çalışmalarda parental kanser hücreleri ile birlikte ilaca dirençli kanser hücrelerinin de göz önünde bulundurulduğu, parental kanser hücrelerini öldürürken ilaca dirençli kanser hücrelerini de öldürebilen yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin gerektiğini düşünmekteyiz. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik dozlarının kanser hücreleri arasında bulunan ilaca dirençli hücreleri de öldürebilecek özelliğe sahip olması günümüzde arzu edilen bir tedavi şeklidir. Karaciğer kanser tedavisinde kemoterapötik ajan olarak kullanılan cetuximab ve epirubicin-HCl'nin parental ve epirubicin-HCl (ilaca) dirençli insan karaciğer kanseri hücrelerine (Hep G2) birlikte uygulandığında neden oldukları değişiklikleri ortaya koyan ve etkileri karşılaştıran herhangi bir literatür bilgisine rastlanmamıştır. Bu yüzden, çalışmamızda cetuximab tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte uygulanmıştır. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte parental ve

ilaca dirençli hücrelerdeki etki mekanizmaları değişik açılardan değerlendirilerek tedavide yeni stratejilerin belirlenmesine ışık tutulmaya çalışılmıştır.

Bu tezin amacı, hedeflendirilmiş bir kemoterapötik olan cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte pek çok maddenin ve karsinojenik etkili bileşenlerin biyotransformasyonunun gerçekleştiği insan karaciğer kanseri (P-Hep G2) ve epirubicin-HCl dirençli karaciğer kanseri (R-Hep G2) hücrelerinde sitotoksik, antiproliferatif, hücre döngüsünü bloke edici etkisini, oksidatif stres yaratma etkisini ve apoptotik etkisini araştırmaktır. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte antiproliferatif etkisini ortaya koymak için DNA polimeraz bileşenlerinden olan ve replikasyonda görev alan proliferatif hücre nükleer antijeninin (PCNA) mRNA ekspresyonu araştırılmıştır. Hücre döngüsü üzerine etkisini ortaya koymak için ise hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişinde aktive olan siklin D1 mRNA ekspresyonu araştırılmıştır. Apoptotik etkiyi ortaya koymak içinde pro-apoptotik bir gen olan Bax ile anti-apoptotik bir gen olan Bcl-2 mRNA oranlarındaki (Bax/Bcl-2) değişikliklerin belirlenmesinin yanı sıra apoptozun hem intrinsik hem de ekstrinsik mekanizmasında aktive olan kaspaz 3 enziminin aktivasyonunda ki değişiklikler de ortaya konmuştur. Oksidatif stres yaratma etkisini ortaya koymak için ise redükte glutasyonu okside ederek oksidatif hasara karşı hücreleri koruyan glutasyon peroksidaz aktivitesindeki değişiklikler araştırılmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Hepatoma G2 Hücrelerinin Çoğaltılması ve Dondurulması

Çalışmada kullanılan Hepatoma G2 (insan karaciğer kanseri hücresi) hücre dizisi Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.

Hepatoma G2 hücreleri (Hep G2), 200 mM L-Glutamin, %10 fetal bovin serum ve %1 antibiyotik-antimikotik karışımı içeren steril Minimum Essential Medium (MEM) besiyerinde 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe 25 cm² ve 75 cm²'lik flasklarda kültüre edilerek çoğaltılmıştır. Hücreler hücre yoğunluğuna göre 2-3 günde bir beslenmiş ve çok yoğunlaşan hücrelerin tripsinizasyon işlemi, Tripsin-Etilendiamin Tetraasetik Asit (EDTA) çözeltisi kullanılarak yapılmıştır. Hücreler yapıştıkları flasktan kaldırılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonu steril bir tüpe alınarak 1000 x g'de 6 dakika çevrilmiştir. Supernatant kısmı steril bir şekilde uzaklaştırılmış ve elde edilen pellet steril MEM ile süspansiyon edilirdikten sonra flasklara bölünmüş ve çoğaltılmaya devam edilmiştir. Çoğaltılan hücrelerin bir kısmı daha sonra kullanılmak üzere 1.5 ml hücre dondurma çözeltisi (%10 gliserol, %50 serum ve %40 serum içermeyen besiyeri) içinde cryo tüpe alınmış ve -80°C'de saklanmıştır.

Epirubicin-HCl dirençli kanser hücreleri, parental kanser hücrelerinin basamak, basamak artan konsantrasyonlarda ilaca (Epirubicin-HCl) maruz bırakılmasıyla elde edilmiştir. Parental hücrelere ilaç uygulaması sonucu elde edilen ilaca dirençli hücreler deneylerde kullanılmadan önce en az dört pasaj ilaç olmayan ortamda üretilmiştir (Jansson vd 1999, Kars vd 2006, Ozkan 2007).

3.2. Çalışmalarda Kullanılan Cetuximab ve Epirubicin-HCl

Çalışmalar süresince kullanılan cetuximab, MerckSerono firması tarafından Erbitux ticari adı ile üretilen cam şişede 5 mg/ml'lik sıvı halinde Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi Dâhiliye/Onkoloji Kliniğinden sağlanmıştır.

Epirubicin-HCl ise Calbiochem firması tarafından üretilen cam şişede 5 mg'lık toz halinde satın alınıp steril şartlarda hazırlanmıştır.

3.3. Sitotoksikite Ölçümleri

3.3.1. Hücre canlılığı testi

Parental Hep G2 (P-Hep G2) ve epirubicin-HCl dirençli Hep G2 (R-Hep G2) hücreleri tripsinize edilerek yapışmış oldukları flaskın yüzeyinden kaldırılmıştır. Hücrelerin, kuyucuklu plaklara (96 well plate) aktarılması sırasında hücreleri saymak için Tripkan mavisi (1/1 oranında) testi uygulanmıştır. Canlı hücrelerin boyayı almayıp, ölü hücrelerin boyayı alması esasına dayanan yöntemde canlı ve ölü hücreler hemositometre lamı kullanılarak ml'deki hücre sayısı hesaplanmıştır. 96 kuyucuklu plaklara (96 well plate), her kuyuya 1×10⁴ hücre olacak şekilde 200 µl hücre süspansiyonu dağıtılmıştır. 24 saat 37°C'de inkübasyon sonrası kuyucuklarda kullanılan

besiyerleri atılarak yenilenmiştir. Cetuximab ve epirubicin-HCl besiyeri ile seyreltilip, sırasıyla konsantrasyonları 100-4500 µg/ml ve 0.005-25 µg/ml'ye ayarlanarak içerisinde hücre bulunan kuyucuklara eklenmiştir. Kontrol grupları olarak, hiç bir şeyle muamele edilmemiş hücreler kullanılmıştır. Ayrıca, hücre içermeyen ancak MEM içeren kuyucuklarda kullanılmıştır. Her bir kontrol grubu için beş tekrar kullanılmıştır. Hücreler 37°C'de inkübatörde 72 saat inkübe edilmişlerdir. İnkübasyon sonrasında hücrelerin canlılığı Cell Titer-Blue^R Cell viability assay kiti ile ölçülmüştür.

Bu metodun esası, canlı hücrelerin resozurini, floresan bir ürün olan resorufine çevirme yeteneğine dayanır. Ölü hücreler ise metabolik kapasitelerini çok çabuk kaybetmelerinden dolayı floresan sinyali oluşturan ürün üretmezler.

Hücrelerin canlılığı 72 saatlik inkübasyondan sonra her bir kuyuya Cell Titer-Blue^R Cell viability assay kitinden 20 µl/200 µl besiyeri eklenerek 1 saat 37°C'de bekletilerek, hücrelerin resozurini resorufine redüksiyonunun 560 nm'de eksitasyon ve 590 nm'de emisyon değerlerinin floresan spektrofotometrede (PerkinElmer LS 55) ölçülmesiyle hesaplanmıştır (Gloeckner vd 2001). Yaşayan hücre yüzdesi, sadece hücre içeren kontrol grubunun ortalama absorbans değerinin farklı cetuximab ve epirubicin-HCl konsantrasyonlarıyla inkübe edilen hücrelerin ortalama absorbans değerleri ile karşılaştırılmasıyla hesaplanmıştır. Sonuçlar % canlı hücre olarak ifade edilmiştir. Cetuximabın IC₅₀ (hücrelerin %50'sini öldüren) ve epirubicin-HCl'nin IC₅, IC₁₀, IC₂₀, IC₃₀, IC₄₀ ve IC₅₀ konsantrasyonları hesaplanmıştır.

Ayrıca cetuximab (IC₅₀), epirubicin-HCl'nin IC₅, IC₁₀, IC₂₀, IC₃₀ ve IC₄₀ (<IC₅₀) konsantrasyonları ile birlikte hücrelere uygulanarak en etkili kombinasyon konsantrasyonları hücre canlılığına bakılarak bulunmuştur. Hiç bir şeyle muamele edilmemiş hücreler ve hücre besiyeri içeren kuyucuklar kontrol grubu olarak beş tekrarlı çalışılmıştır. Ayrıca, her bir farklı kombinasyon konsantrasyonu için de beş tekrar yapılmıştır. Bundan sonraki çalışmalara en etkili sitotoksik etki gösteren kombinasyondaki (cetuximab + epirubicin-HCl) konsantrasyonlar kullanılarak devam edilmiştir.

3.3.2. Laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite deneyi

Laktat dehidrogenaz (LDH) enzim aktivitesi, Sigma-Aldrich tarafından üretilen 'Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit'inde (MAK066) belirtilen yöntem ile belirlenmiştir. Lactate Dehydrogenase Activity Assay Kit'inin içeriğini, LDH deney tamponu (50 ml), LDH substrat mix (1vl), nikotinamid adenin dinükleotid'in indirgenmiş formundan (NADH) oluşan standart (0.5 µmol-1 vl) ve LDH pozitif kontrolü (20 µl-1 vl) oluşturmaktadır.

Cetuximab tek başına (IC₅₀ konsantrasyonu) ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte (en etkili sitotoksik etki gösteren konsantrasyon kombinasyonu) hücrelere 72 saat boyunca uygulanarak LDH enzim aktivitesindeki değişiklikler belirlenmiştir. Hiç bir şeyle muamele edilmemiş kontrol grubu hücrelerdeki ve cetuximabın tek başına ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı hücrelerdeki LDH enzim aktivite ölçümleri beş tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

Konsantrasyonları, 0 (blank), 2.5, 5, 7.5, 10, ve 12.5 nmol/kuyucuk olarak hazırlanan NADH standartlarının her biri kuyucuklara 50 µl LDH deney tamponunun içerisinde eklenmiştir. 1×10^6 hücre 500 µl soğuk LDH deney tamponunun içerisinde hızlıca homojenize edilmiş ve 4°C'de 10,000 x g'de 15 dakika santrifüj edilerek çözünmeyen hücresel kalıntılar ortamdaki uzaklaştırılmıştır. 2-50 µl her bir örnekten alınarak 96 kuyucuklu plaklara konulmuştur. Her bir kuyucukta toplam hacim LDH deney tamponu ile 50 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir kuyucuğa 50 µl master reaksiyon karışımı (48 µl LDH deney tamponu + 2 µl LDH substrat karışımı) eklenerek, her bir kuyucuk pipetleme ile karıştırılmıştır. 3 dakika sonra 450 nm'de ilk ölçümler yapılmıştır. 37°C'de 96 kuyucuklu plaklar inkübe edilerek, her 5 dakikada bir 450 nm'de ölçümler yapılmaya devam edilmiştir. İnkübasyonlar sırasında 96 kuyucuklu plakların ışıktan korunmasına dikkat edilmiştir. Ölçümlere, örneklerin absorbans değerlerinin en yüksek standardın (12.5 nmol/kuyucuk) absorbans değerinden daha yüksek oluncaya kadar devam edilmiştir. LDH aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{LDH Aktivitesi} = \frac{\text{İlk ve son ölçüm arasında meydana gelen NADH miktarı (nmol)} \times \text{Örnek Dilüsyon Faktörü}}{\text{Reaksiyon Zamanı} \times \text{Örnek hacmi (ml)}}$$

3.4. Glutasyon Peroksidaz Aktivitelerinin Ölçülmesi

P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücreleri cetuximaba tek başına (IC₅₀ konsantrasyonu) ve ayrıca en etkili sitotoksik etki gösteren kombinasyon konsantrasyonuna 72 saat maruz bırakılmıştır. 72 saat sonunda glutasyon peroksidaz aktivitesindeki değişikliklere bakılarak cetuximabın tek başına ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte oksidatif stres yaratma etkileri ortaya konmuştur. Hiç bir şeyle muamele edilmemiş kontrol grubu hücrelerdeki ve cetuximabın tek başına ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı hücrelerdeki glutasyon peroksidaz enzim aktivite ölçümleri beş tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

Deneylerde kullanılacak olan supernatantın hazırlanması için P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücreleri yeterli yoğunluğuna ulaştıktan sonra tripsinize edilerek flasktan ayrılmış ve santrifüj edilmişlerdir. Elde edilen pelletlerin tümü birleştirilmiş ve her bir flaska 150.000 hücre olacak şekilde dağıtılmıştır. Hücreler 24 saat 37°C'de, %5 CO₂ ve %95 nemlendirilmiş hava içeren karbondioksit inkübatöründe inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücrelerinin bir kısmı kontrol olarak ayrılmış, bir kısmına ise sadece cetuximab ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte (en etkili sitotoksik etki gösteren kombinasyon konsantrasyonları) uygulanarak 72 saat 37°C'de inkübe edilmişlerdir. Tek başına cetuximab ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte uygulama yapıldıktan 72 saat sonra ilaç uygulanan ve kontrol flasklarındaki hücreler tripsinlenerek alınmıştır. 600 x g'de çevrilerek elde edilen pellet PBS (fosfat tamponlu tuz, pH 7) çözeltisi ile 3 kez yıkanmıştır. 300 µl tampon (100 mM K₂HPO₄ ve 100 mM KH₂PO₄ çözeltisi pH 7), 1180 µl distile su ve 20 µl proteaz inhibitor kokteyl karıştırılarak homojenizasyon tamponu hazırlanmıştır. En son yıkamadan kalan pellet, homojenizasyon tamponuyla seyreltilerek ependorf tüplerine aktarılmıştır. Branson Sonifier 250 marka ultrasonik parçalayıcıda 3x15'er saniye buz içerisinde homojenize edildikten sonra 32,000 x g'de 45 dakika 4°C da santrifüj edilmiştir. Protein kaynağı olarak kullanılacak olan supernatant, ependorf tüplerine bölünerek -80°C de

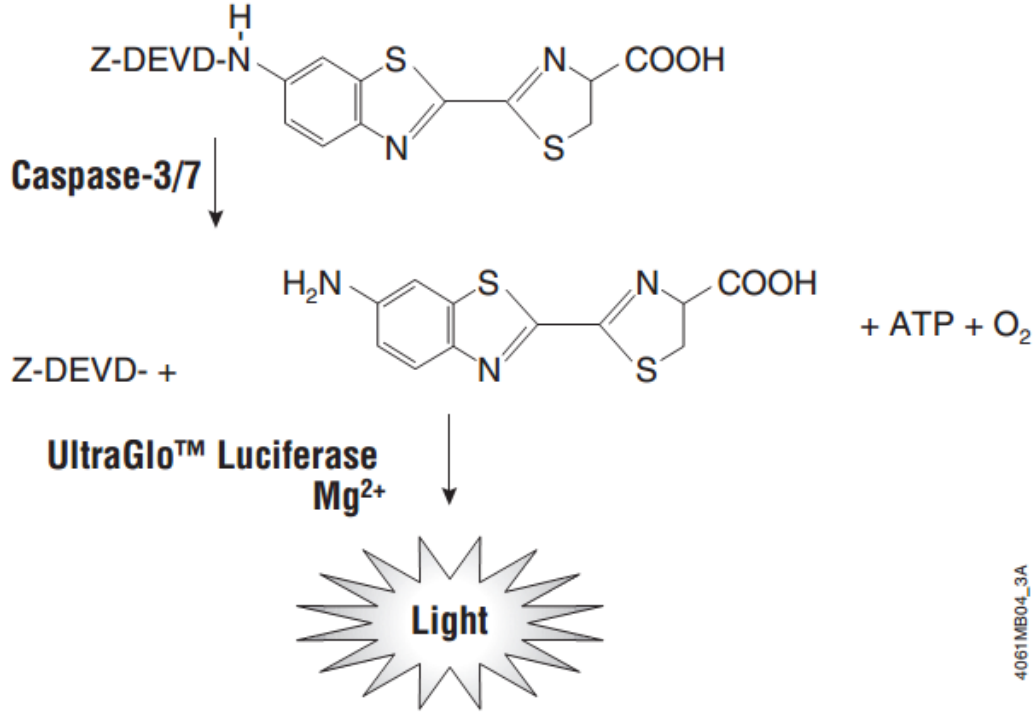
saklanmıştır. Protein miktarı tayini Bradford yöntemine göre yapılmıştır (Bradford 1976). Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue (Coomassie parlak mavisi) G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Coomassie brilliant blue G-250 boyasının farklı konsantrasyonlardaki protein çözeltilerindeki değişik şiddette mavi renk ortaya koymasından yararlanılarak geliştirilmiştir. İlgilenilen proteinin konsantrasyonu, konsantrasyonu bilinen standart protein ile çizilen absorbans-konsantrasyon grafiği üzerinden hesaplanmıştır. Protein standardı için 0, 0.005, 0.01, 0.015, 0.02 mg/ml konsantrasyonlarında Bovine Serum Albumin (BSA) çözeltisi kullanılmıştır. Protein standart grafiği hazırlandıktan sonra örnekler 1:75 oranında seyreltilerek, 20 µl örnek üzerine 200 µl renklendirme reaktifi ilave edilmiştir. On dakikalık bir inkübasyondan sonra 595 nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Standart grafikten yararlanılarak örneklerin protein miktarları belirlenmiştir.

Glutasyon peroksidaz aktivite deneyi, t-butyl-hidroperoksidin substrat olarak kullanıldığı Flohe ve Gunzler’in (1984) yöntemine göre yapılmıştır. Metodun temel prensibi, 50 mM potasyum fosfat (pH 7.0), 1 mM glutasyon (GSH), 0.12 mM t-bütül-hidroperoksit, 0.15 mM nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) ve 0.24 units glutasyon redüktaz (GR) içeren reaksiyon karışımında NADPH miktarının 340 nm’de ölçülmesi esasına dayanır. Bir unit enzim aktivitesi, dakikada bir µmol glutasyonun (GSH) oksidasyonu ile sonuçlanır. 20 µl hücre supernatantı, 20 µl GSH, 20 µl GR, 20 µl NADPH, 20 µl t-butyl-hidroperoksit ve 100 µl sodyum fosfat tamponu (PB)-EDTA (0.5 ml 0.1 M EDTA + 50 ml 0.1 M PB, pH 7.0) 96 kuyucuklu plaklara eklenmiştir. Kuyucuklara konan maddeler pipetleme yapılarak iyice karıştırıldıktan sonra 30°C’de 5 dakika bekletilerek 340 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümler yapılmıştır. Glutasyon peroksidaz aktivite düzeyleri units/mg protein olarak verilmiştir.

$$\text{GPx Spesifik Aktivitesi (U/mg protein)} = \frac{\text{GPx Aktivitesi}}{\text{Protein Miktarı}}$$

3.5. Kaspaz 3/7 Aktivitelerinin Belirlenmesi

Kaspaz 3/7 enzim aktivitesi, Promega tarafından üretilen ‘ApoTox-Glo™ Triplex Assay’ kitinde belirtilen yöntem ile belirlenmiştir. Kit, kaspaz aktivitesi, lusiferaz aktivitesi ve hücre lizisi için optimize edilmiş olan reaktifte tetrapeptid sekans DEVD’yi (Asp-Glu-Val-Asp) içererek luminogenic kaspaz 3/7 substratı sağlayıp Caspase-Glo® Assay teknolojisini kullanır. Caspase-Glo® 3/7 reaktifinin eklenmesi ile hücre lizisi meydana gelir. Substratın kaspaz tarafından bölünmesini lusiferaz tarafından üretilen “parıldama şeklinde” lüminesans sinyal oluşumu izler (Şekil 3.1). Meydana gelen lüminesans mevcut kaspaz aktivitesi miktarı ile orantılıdır.



Şekil 3.1. DEVD dizisini içeren luminogenic substratının kaspaz- 3/7 bölünmesi

Kaspaz 3/7 aktivite ölçümü için ‘ApoTox-Glo™ Triplex Assay’ kitinin içeriğini kaspase-Glo® 3/7 tamponu (10 ml) ve bir şişe kaspase-Glo® 3/7 substratı (liyofilize) oluşturmaktadır.

Kaspase-Glo® 3/7 tamponu, kaspase-Glo® 3/7 substratı içeren şişeye aktarılmıştır. Şişe birkaç kez ters düz yapılarak substratların tamamen çözülmesi sağlanmıştır ve böylece Kaspase-Glo® 3/7 reaktifi oluşturulmuştur.

96 kuyucuklu plaklara (96 well plate), her kuyuya 1×10^4 hücre olacak şekilde 100 μ l hücre süspansiyonu dağıtılmıştır. 24 saat 37°C’da inkübasyon sonrası kuyucuklarda kullanılan besiyerleri atılarak, cetuximab tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte hücrelere uygulanmıştır. Tek başına cetuximabın ve ayrıca cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı hücreler ile sadece besiyerinin uygulandığı kontrol grubu hücreleri 72 saat inkübe edilmişlerdir. 72 saatin sonunda 100 μ l Kaspase-Glo® 3/7 reaktifi eklenmiş ve 30 saniye kadar pipetasyon yapılmıştır. Bir saat oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Bir saatin sonunda, apoptozun belirteci olan kaspaz aktivasyonu, luminesans ölçülerek belirlenmiştir (Cummings ve Schnellmann 2002). Deneyler beş tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.6. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

3.6.1. mRNA izolasyonu

Cetuximab tek başına (IC₅₀ konsantrasyonu) ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte (en etkili sitotoksik etki gösteren konsantrasyon kombinasyonu) hücrelere 72 saat uygulandıktan sonra mesajcı RNA (mRNA), 'RNeasy Mini Kit'i (Qiagen) kullanılarak üretici firma önerilerine göre izole edilmiştir. Buna göre ilaç uygulaması yapılan ve sadece besiyeri uygulanmış kontrol grubu hücreleri tripsinlenerek alınmıştır. Örneklerin üzerine hücreleri parçalamak için 'guanidin tiyosiyanat içeren RTL' tamponundan 350 µl eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra hücreler bir dakika vortekslenerek homojenize edilmişlerdir. Homojenize edilmiş lizata 350 µl %70'lik etanol eklenmiştir ve pipetlenerek iyice karışması sağlanmıştır. Bu aşamada santrifüj kullanılmamasına dikkat edilmiştir. 2 ml'lik toplama tüplerine yerleştirilmiş RNeasy Mini spin kolumlarına bir önceki aşamadaki karışımdan 700 µl konulup santrifüjde 11,000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Aynı RNeasy Mini spin kolumlarına 700 µl etanol içeren 'RW1' tamponu eklenip santrifüjde 11,000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. 500 µl 'RPE' konulup santrifüjde 11,000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir. Tekrar 500 µl RPE konulup santrifüjde 11,000 rpm'de 2 dakika herhangi bir solüsyon artığı kalmayana kadar santrifüj edilmiştir. RNeasy Mini spin kolumları 1.5 ml'lik eppendorf tüplerine yerleştirilmiştir. Üzerine 30 µl RNA'se-free su ilave edilip santrifüjde 11,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir ve bu basamak tekrarlanmıştır. Elde edilen mRNA örnekleri -30°C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.2. cDNA sentezi

Saklanan mRNA örnekleri 'Titan One Tube RT-PCR System kit (Roche Applied Science) ile komplementer DNA (cDNA) haline getirilmiştir. Kitin ana bileşeni olan reverse transkriptaz *E. coli.*'de eksprese edilen bir rekombinant ters transkriptazdır. Enzim, DNA polimeraz aktivitesine ve RNA-DNA hibritlerinde RNA'yı degrade eden RNase H aktivitesine sahiptir (Blaney vd 2005).

Random hexamer primer, deoksinükleotid trifosfat (dNTP) karışımı ve DTT 'den 2 µl, RT-PCR reaction buffer, RNase inhibitor ve reverz transkriptazdan 0.5 µl, MgCl₂'den 4 µl ve H₂O'dan 1 µl eklenerek cDNA reaksiyon karışımı buzda tutularak hazırlanmıştır. Daha sonra üzerine her mRNA örneğinden 9 µl pipetlenmiştir. 20°C'de 10 dakika, 42°C'de 45 dakika, 99°C'de 3 dakikada bekletilecek şekilde thermal cyclerda cDNA reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA örnekleri -30°C'de muhafaza edilmiştir.

3.6.3. Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR)

cDNA'daki hedef diziye bağlanan primer, Taq DNA Polimeraz için hedef haline gelir ve böylece 30 döngü sonunda milyonlarca cDNA meydana gelir. Bu cDNA'lar kullanılarak proliferasyon hücre nükleer antijeni (PCNA), siklin D1, Bax ve Bcl-2 genlerinin ifade düzeylerindeki farklılıklar belirlenmiştir. Referans olarak gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonlarında (PCR), 2 µl cDNA kalıp olarak kullanılmıştır. PCR reaksiyon karışımı, Taq buffer (2.5 µl), MgCl₂ (2 µl), dNTP (1 µl), reverse ve forward primerler (2 µl), Taq polimeraz (0.5 µl)

ve dH₂O (11 µl), kullanılarak hazırlanmıştır. PCR karışım tamponunda denatürasyon 94°C'de 1 dakika, primerin bağlanması (annealing) GAPDH ve Bax genleri için 55°C'de 1 dakika, siklin D1 geni için 58°C'de 1 dakika, PCNA geni için 59°C'de 1 dakika ve uzama (extension) 72°C'de 2 dakika olacak şekilde 30 döngü halinde gerçekleştirilmiştir. Bcl-2 geni için touchdown PCR kullanılmıştır. İlk önce 73°C tutulmuş ve her döngüde 1°C azaltılarak (10 döngü) 63°C'ye düşürülmüştür. 63°C'den sonra ise 25 döngü yapılarak PCR tamamlanmıştır. PCR'da kullanılan spesifik primerlerin dizileri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. RT-PCR'da kullanılan oligonukleotidler

Gen Adı	F-Primer Dizisi (5'-3')	R-Primer Dizisi (5'-3')	Alındığı kaynak
PCNA	CGCGCAGAGGGTT GGTAGTT	AAGCCTTCGGAGCGC AGAGT	Huang vd 2003
Bcl-2	TGCACCTGACGCC CT TCAC	AGACAGCCAGGAGA AATCAAACAG	Huang vd 2003
Bax	ACCAAGAAGCTGA GCGAGTGTC	ACAAAGATGGTCACG GTCTGCC	Huang vd 2003
GAPDH	TTCATTGACCTCAA CTACAT	GAGGGGCCATCCACA GTCTT	Huang vd 2003
Siklin D1	CCG TCC ATG CGG AAG ATC	ATG GCC AGC GGG AAG AC	Bijwaard vd 2001

3.6.4. Agaroz jel elektroforezi

PCR ürünlerini görüntülemek için %2.5'lik agaroz jel hazırlanmıştır. 1.25 gr tartılarak 1X Tris Base EDTA (TBE) tampon çözeltisi ile tamamlanarak mikrodalgada 350 W, 4 dakika kaynatılarak agarozun tamamen erimesi sağlanmıştır. Homojen bir görünüm elde edildikten sonra hazırlanan jel tarakları ve sınırları belli olan jel tabağına dökülerek soğumaya bırakılmıştır. Tamamen soğuduktan sonra her PCR ürününden 5 µl alınarak jelde bulunan kuyucuklara yüklenmiştir. DNA'nın büyüklüğünü gösteren 100 bp DNA ladderleri ise boş kuyucuklara yüklenerek 120 V sabit akımda 30 dakika, Bcl-2 PCR ürünleri ise 50 dakika yürütülmüştür. Sonrasında UV translüminatör ile görünür hale geldikten sonra resmi çekilmiştir. PCR bantlarının yoğunluğu ile kontrol grubu bantlarının yoğunluğu Adobe Photoshop CS4 programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre gen ekspresyonlarındaki değişiklikler ortaya konmuştur (McDaniel ve Pillai 2002, Kiefer vd 2015, Dondossola vd 2016).

3.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi Minitap Release 13,0 programı ile yapılmıştır. Gruplar arası karşılaştırma için ANOVA-GLM (General Linear Model) yöntemi kullanılmıştır. Farkların önem seviyesini belirtmek için ise Tukey Çoklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır (Anonim 2).

4. BULGULAR

4.1. Parental Hücrelerden İlaça Dirençli Hep G2 Hücrelerinin Oluşturulması

Epirubicin-HCl dirençli Hep G2 hücreleri (R-Hep G2), parental Hep G2 (P-Hep G2) hücrelerinin basamak, basamak artan konsantrasyonlar da ilaca (Epirubicin-HCl) maruz bırakılmasıyla elde edilmiştir (Jansson vd 1999, Kars vd 2006, Ozkan 2007). Hücreler başlangıç aşamasında 1 ng/ml epirubicin-HCl'ye maruz bırakılmıştır. Bir sonraki pasajlamada ölü hücreler ayrılmış, canlı hücrelerin üretilmesine devam edilmiştir. Her pasajlamadan sonra ilaç konsantrasyonu arttırılmıştır. Parental hücrelere uygulanan konsantrasyonlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. 50 ng/ml den daha yüksek ilaç konsantrasyonlarında hücrelerin büyük bir kısmı öldüğü için uygulama bu noktada durdurulmuştur. Parental hücrelere ilaç uygulaması sonucu elde edilen ilaca dirençli hücreler deneylerde kullanılmadan önce en az dört pasaj ilaç olmayan ortamda üretilmiştir.

Çizelge 4.1. Uygulanan epirubicin-HCl konsantrasyonları

Epirubicin-HCl konsantrasyonları
25 ng/ml
30 ng/ml
35 ng/ml
40 ng/ml
45 ng/ml
50 ng/ml

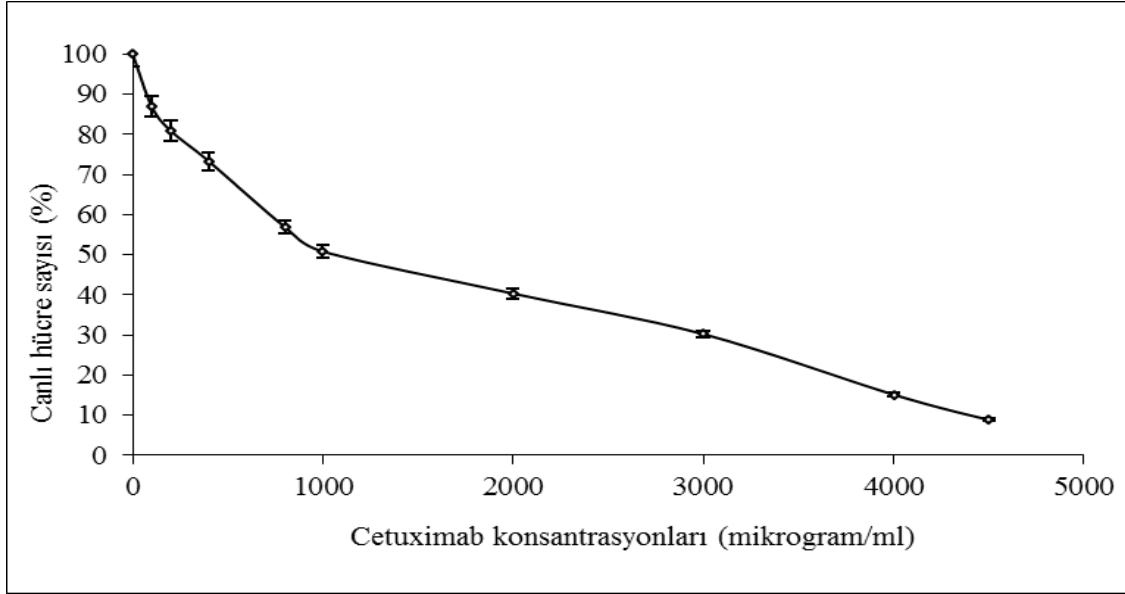
4.2. Cetuximabın Tek Başına ve Epirubicin-HCl ile Birlikte Parental Hep G2 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte sitotoksik etkisinin ortaya konması için Cell Titer-Blue^R Hücre Canlılığı ve Laktat Dehidrogenaz (LDH) Aktivite testleri uygulanmıştır. Epirubicin-HCl'nin tek başına IC değerleri ayrıca belirlenmiştir.

4.2.1. Hücre canlılığı testi

Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte P-Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi, Cell Titer-Blue^R Cell viability assay kiti kullanılarak ölçülmüştür. Cell Titer-Blue^R hücre canlılığı testinin esası, canlı hücrelerin rezorurini, floresan bir ürün olan resorufine çevirme yeteneğine dayanır. Ölü hücreler ise metabolik kapasitelerini çok çabuk kaybetmelerinden dolayı floresan sinyali oluşturan ürün üretemezler. Flaskta üretilmiş hücreler tripsinize edildikten sonra sayılarak 96-kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre düşmek suretiyle ekilmiştir. Cetuximab ve epirubicin-HCl besiyeri ile seri olarak seyreltilerek içerisinde hücre bulunan kuyucuklara konulmuştur. Hücreler, cetuximab ve epirubicin-HCl ile birlikte 72 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin rezorurini resorufine redüksiyonunun floresanspektrofotometrede ($560_{\text{Eks}}/590_{\text{Ems}}$) ölçülmesiyle cetuximab için IC₅₀ (hücrelerin %50'sini öldüren

konsantrasyon), epirubicin-HCl için IC₅, IC₁₀, IC₂₀, IC₃₀, IC₄₀ ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.1 ve Çizelge 4.2).



Şekil 4.1. P-Hep G2 hücrelerinde artan cetuximab konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı

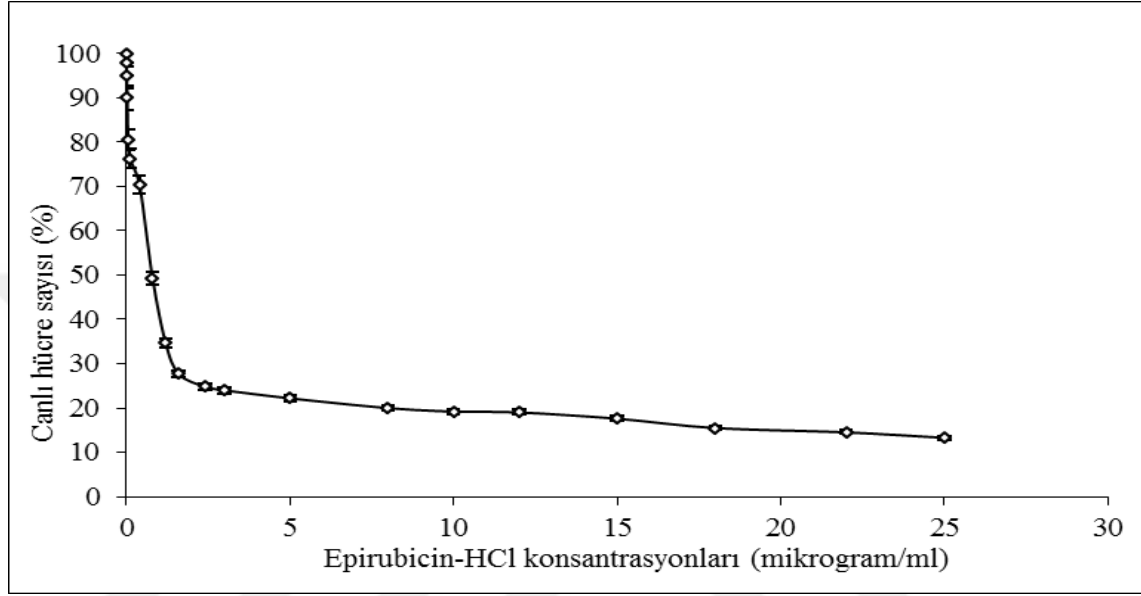
Artan konsantrasyonlar da 72 saat cetuximaba maruz bırakılan P-Hep G2 hücrelerinin canlılığı 400-4000 µg/ml konsantrasyonları arasında önemli ölçüde azalırken ($p < 0.05$), diğer konsantrasyonlarda yavaş bir azalma görülmüştür (Şekil 4.1). 72 saatlik inkübasyon sonunda IC₅₀ değeri 1000 µg/ml olarak hesaplanmıştır. 72 saatlik inkübasyon sonunda elde edilen veriler arasındaki istatistiksel farklar ($p < 0.05$) Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Cetuximabın P-Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Cetuximab konsantrasyonları (µg/ml)	Canlı hücre sayısı (%) 72 saatlik inkübasyon X ± SH
100 µg/ml	87 ± 1.09 i
200 µg/ml	81 ± 1.11 hi
400 µg/ml	73 ± 1.05 gh
800 µg/ml	57 ± 1.08 f
1000 µg/ml	50 ± 0.8 e
2000 µg/ml	40 ± 0.53 d
3000 µg/ml	30 ± 0.75 c
4000 µg/ml	15 ± 0.96 ab
4500 µg/ml	9 ± 0.49 a
Kontrol	100 ± 0.08 j

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). SH: Standart Hata

72 saat epirubicin-HCl'ye maruz bırakılan P-Hep G2 hücrelerinin canlılığı konsantrasyon artışına bağlı olarak azalmıştır (Şekil 4.2). En fazla canlılık azalışı 0.03-1.6 µg/ml arasında gerçekleşmiştir. 72 saat epirubicin-HCl'ye maruz bırakılan P-Hep G2 hücrelerinin IC₅, IC₁₀, IC₂₀, IC₃₀, IC₄₀ ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.013, 0.03, 0.05, 0.40, 0.66 ve 0.80 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Epirubicin-HCl konsantrasyonlarının uygulamalarından ortaya çıkan sitotoksik etkilerdeki istatistiksel farklılıklar (p<0.05) Çizelge 4.3'de verilmiştir.



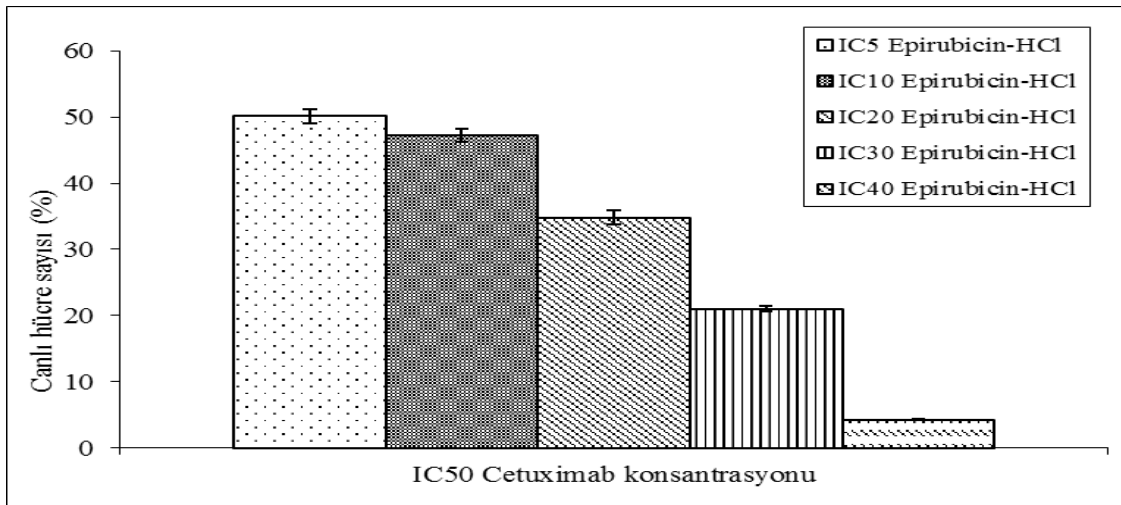
Şekil 4.2. P-Hep G2 hücrelerinde artan epirubicin-HCl konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı

P-Hep G2 hücreleri, cetuximab (IC₅₀) ve epirubicin-HCl'nin IC₅, IC₁₀, IC₂₀, IC₃₀ ve IC₄₀ (<IC₅₀) konsantrasyonları ile birlikte 72 saat boyunca inkübe edilmiştir (Şekil 4.3). 72 saat sonunda en etkili sitotoksik etki gösteren kombinasyon konsantrasyonları hücre canlılığına bakılarak bulunmuştur. Cetuximab (IC₅₀) ile birlikte uygulanan epirubicin-HCl konsantrasyonları (IC₅, IC₁₀, IC₂₀, IC₃₀, IC₄₀) kendi aralarında sıralandığında en etkili sitotoksik etki gösteren konsantrasyonlar, IC₅₀ cetuximab + IC₄₀ epirubicin-HCl olarak bulunmuştur (40>30>20>5>10) (Çizelge 4.4). Bundan sonraki parental hücrelerle yapılan çalışmalarda en etkili sitotoksik etki gösteren kombinasyondaki konsantrasyonlar olan IC₅₀ cetuximab + IC₄₀ epirubicin-HCl kullanılarak devam edilmiştir.

Çizelge 4.3. Epirubicin-HCl'nin P-Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Epirubicin-HCl konsantrasyonları ($\mu\text{g/ml}$)	Canlı hücre sayısı (%) 72 saatlik inkübasyon $X \pm SH$
0.005 $\mu\text{g/ml}$	98 \pm 1.06 j
0.01 $\mu\text{g/ml}$	95 \pm 0.74 ij
0.03 $\mu\text{g/ml}$	90 \pm 1.02 i
0.05 $\mu\text{g/ml}$	81 \pm 0.70 hi
0.10 $\mu\text{g/ml}$	76 \pm 0.87 h
0.40 $\mu\text{g/ml}$	70 \pm 1.07 g
0.80 $\mu\text{g/ml}$	50 \pm 1.05 e
1.20 $\mu\text{g/ml}$	35 \pm 1.07 cd
1.60 $\mu\text{g/ml}$	28 \pm 0.58 c
2.40 $\mu\text{g/ml}$	25 \pm 0.56 bc
3.0 $\mu\text{g/ml}$	24 \pm 0.49 bc
5.0 $\mu\text{g/ml}$	22 \pm 0.55 bc
8.0 $\mu\text{g/ml}$	20 \pm 0.96 b
10.0 $\mu\text{g/ml}$	19.2 \pm 0.58 b
12.0 $\mu\text{g/ml}$	19 \pm 0.75 b
15.0 $\mu\text{g/ml}$	17.6 \pm 0.53 b
18.0 $\mu\text{g/ml}$	15.5 \pm 0.46 b
22.0 $\mu\text{g/ml}$	14.5 \pm 0.69 ab
25.0 $\mu\text{g/ml}$	13.3 \pm 0.96 ab
Kontrol	100 \pm 0.08 j

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). SH: Standart Hata



Şekil 4.3. Cetuximabın epirubicin-HCl (IC₅, IC₁₀, IC₂₀, IC₃₀, IC₄₀) ile birlikte P-Hep G2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi

Çizelge 4.4. Cetuximabın (IC₅₀) epirubicin-HCl ile birlikte P-Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

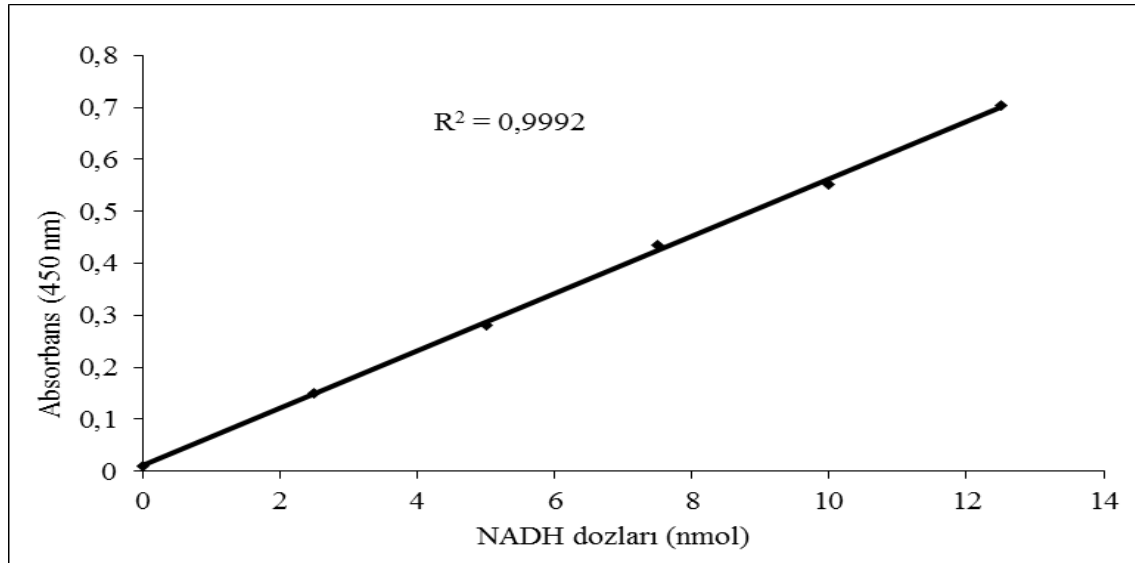
Epirubicin-HCl konsantrasyonları	Canlı hücre sayısı (%) 72 saatlik inkübasyon X ± SH
IC ₅ (0.013 µg/ml)	50 ± 1.05 e
IC ₁₀ (0.03 µg/ml)	47 ± 1.01 e
IC ₂₀ (0.05 µg/ml)	34 ± 1.07 cd
IC ₃₀ (0.40 µg/ml)	21 ± 1.08 bc
IC ₄₀ (0.66 µg/ml)	4 ± 0.42 a
Kontrol	100 ± 0.09 j

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0.05). SH: Standart Hata

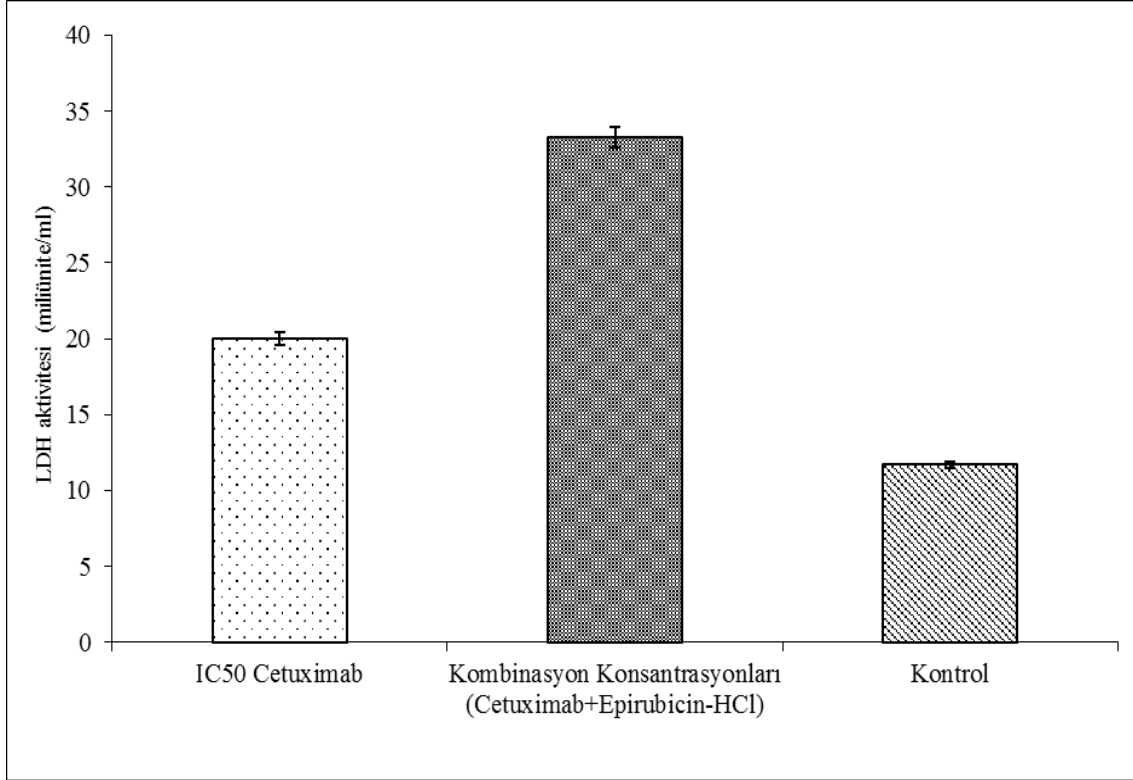
4.2.2. Laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite ölçümü

Laktat dehidrogenaz (LDH), laktik asiti NAD⁺ varlığında pirüvik asite dönüştüren enzimdir. Laktik asit hücre bütünlüğünün bozulması ile ortaya çıkar. Yani, kültüre alınmış hücrelerin ölümü ile hücre membran bütünlüğü bozulur ve sitoplazma içeriği dışarı çıkar. Laktat dehidrogenaz enzimi de genellikle her hücrede bulunduğu için enzim aktivitesine bağlı olarak ölüm oranının hesaplanmasına yardımcı olur.

P-Hep G2 hücreleri IC₅₀ konsantrasyonunda cetuximaba ve IC₅₀ cetuximab + IC₄₀ epirubicin-HCl'ye (en etkili sitotoksik etki gösteren kombinasyon konsantrasyonları) 72 saat maruz bırakıldıktan sonra LDH enzim aktivitesindeki değişiklikler ölçülmüştür (Şekil 4.5). NADH standart grafiği ($y = 0.0553x + 0.0105$) Şekil 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.4. NADH standart grafiği



Şekil 4.5. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte P-Hep G2 hücrelerinde LDH aktivitesi üzerine etkisi

Kombinasyon konsantrasyonlarının uygulandığı hücrelerde 2.8 kat, cetuximabın tek başına uygulandığı hücrelerde ise 1.7 kat LDH enzim aktivitesinin kontrol grubu hücrelerine (sadece besiyeri uygulanmış hücreler) göre arttığı görülmüştür. Kombinasyon konsantrasyonlarının ve cetuximabın tek başına uygulandığı hücrelerdeki LDH enzim aktivitesi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$) bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı P-Hep G2 hücrelerinde LDH enzim aktivite düzeyleri

Uygulamalar	LDH Aktivitesi (miliünite/ml)
	$X \pm SH$
Cetuximab	20.0 ± 0.30 ab
Cetuximab + Epirubicin-HCl	33.3 ± 0.10 c
Kontrol	11.7 ± 0.15 a

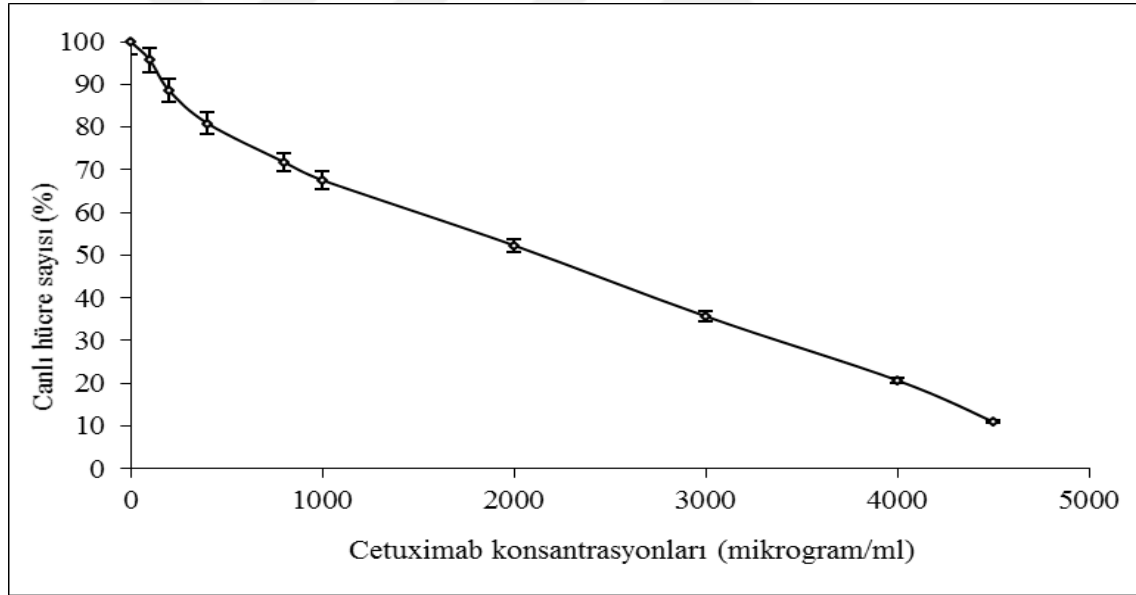
X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). SH: Standart Hata

4.3. Cetuximabın Tek Başına ve Epirubicin-HCl ile Birlikte İlaça Dirençli Hep G2 Hücreleri Üzerine Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

4.3.1. Hücre canlılığı testi

Cetuximab ve epirubicin-HCl'nin, R-Hep G2 insan karaciğer kanseri hücreleri üzerine sitotoksik etkisi, parental hücrelerde olduğu gibi Cell Titer-Blue^R Cell viability assay kiti ile ölçülmüştür (Gloeckner vd 2001). R-Hep G2 hücreleri, 100-4500 µg/ml konsantrasyon aralığında cetuximaba ve 0.005-25 µg/ml konsantrasyon aralığında epirubicin-HCl'ye maruz bırakılmıştır. İlaça dirençli Hep G2 hücrelerinin cetuximab ve epirubicin-HCl ile ayrı ayrı 72 saatlik inkübasyonunun sonunda cetuximab için IC₅₀ değeri ve epirubicin-HCl için IC₅, IC₁₀, IC₂₀, IC₃₀, IC₄₀ ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Cetuximaba maruz bırakılan R-Hep G2 hücrelerinde konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığı azalmıştır (Şekil 4.6). En hızlı azalış 1000-4000 µg/ml arasındaki konsantrasyonlarda görülmüştür. 72 saatlik inkübasyon sonunda cetuximabın IC₅₀ değeri 2279 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.6). 72 saatlik inkübasyon sonunda, parental hücreler ile ilaca dirençli hücreler karşılaştırıldığında, ilaca dirençli hücreler cetuximaba yaklaşık olarak 2.3 kat daha fazla direnç göstermişlerdir.



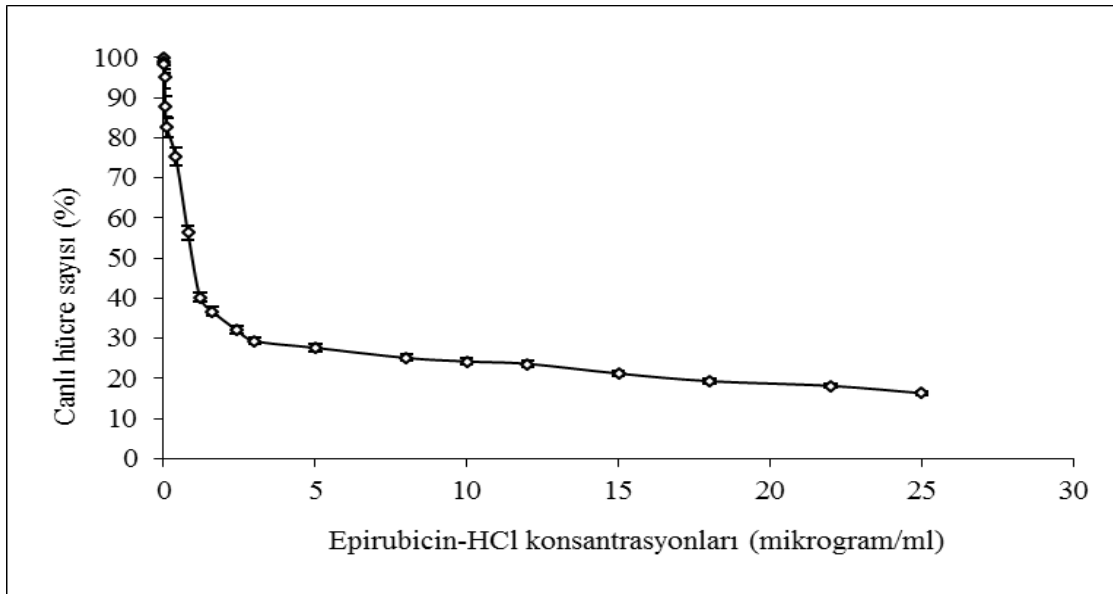
Şekil 4.6. R-Hep G2 hücrelerinde artan cetuximab konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı

Çizelge 4.6. Cetuximabın R-Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Cetuximab konsantrasyonları ($\mu\text{g/ml}$)	Canlı hücre sayısı (%) 72 saatlik inkübasyon $X \pm \text{SH}$
100 $\mu\text{g/ml}$	96 ± 1.04 j
200 $\mu\text{g/ml}$	89 ± 1.09 ı
400 $\mu\text{g/ml}$	81 ± 1.07 hı
800 $\mu\text{g/ml}$	72 ± 1.05 gh
1000 $\mu\text{g/ml}$	68 ± 0.6 g
2000 $\mu\text{g/ml}$	52 ± 0.57 ef
3000 $\mu\text{g/ml}$	36 ± 0.70 d
4000 $\mu\text{g/ml}$	21 ± 0.90 bc
4500 $\mu\text{g/ml}$	11 ± 0.45 ab
Kontrol	100 ± 0.06 j

X: Beş tekrarin ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). SH: Standart Hata

Artan konsantrasyonlarda 72 saat epirubicin-HCl'ye maruz bırakılan R-Hep G2 hücrelerinin canlılığı 0.03-2.4 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonları arasında önemli ölçüde azalırken ($p < 0.05$), diğer konsantrasyonlarda çok yavaş bir azalma görülmüştür (Şekil 4.7). 72 saatlik inkübasyon sonunda IC_5 değeri 0.03, IC_{10} değeri 0.11, IC_{20} değeri 0.32, IC_{30} değeri 0.53, IC_{40} değeri 0.74 ve IC_{50} değeri 0.95 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7). 72 saatlik inkübasyon sonunda, P-Hep G2 hücreleri ile R-Hep G2 karşılaştırıldığında, dirençli hücreler epirubicin-HCl'ye yaklaşık olarak IC_{50} konsantrasyonunda 1.2 kat daha fazla direnç göstermişlerdir.



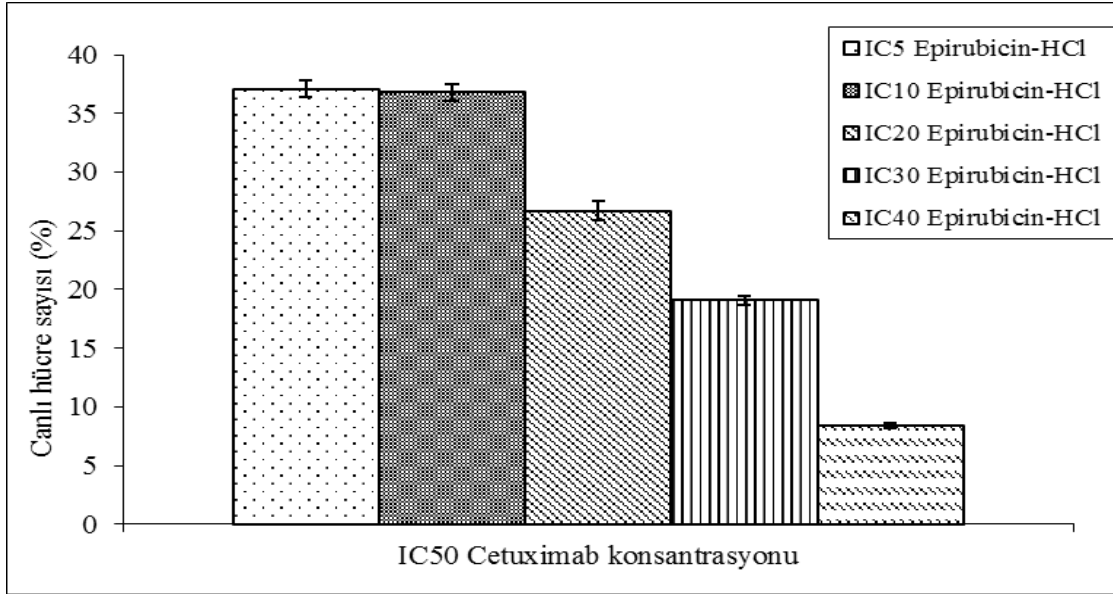
Şekil 4.7. R- Hep G2 hücrelerinde artan epirubicin-HCl konsantrasyonlarına karşı azalan hücre canlılığı

Çizelge 4.7. Epirubicin-HCl'nin R-Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

Epirubicin-HCl konsantrasyonları (µg/ml)	Canlı hücre sayısı (%) 72 saatlik inkübasyon X ± SH
0.005 µg/ml	99 ± 1.02 j
0.01 µg/ml	98 ± 0.70 j
0.03 µg/ml	95 ± 0.98 ij
0.05 µg/ml	88 ± 0.65 i
0.10 µg/ml	83 ± 0.82 hi
0.40 µg/ml	75 ± 1.02 gh
0.08 µg/ml	56 ± 1.04 f
1.20 µg/ml	40 ± 1.05 d
1.60 µg/ml	37 ± 0.55 d
2.40 µg/ml	32 ± 0.52 cd
3.0 µg/ml	29 ± 0.47 c
5.0 µg/ml	28 ± 0.53 c
8.0 µg/ml	25 ± 0.93 bc
10.0 µg/ml	24.2 ± 0.54 bc
12.0 µg/ml	23.6 ± 0.70 bc
15.0 µg/ml	21 ± 0.50 bc
18.0 µg/ml	19 ± 0.42 b
22.0 µg/ml	18 ± 0.65 b
25.0 µg/ml	16 ± 0.92 b
Kontrol	100 ± 0.06 j

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). SH: Standart Hata

R-Hep G2 hücreleri, cetuximab (IC_{50}) ve epirubicin-HCl'nin IC_5 , IC_{10} , IC_{20} , IC_{30} ve IC_{40} ($<IC_{50}$) konsantrasyonları ile birlikte 72 saat boyunca inkübe edilmişlerdir (Şekil 4.8). 72 saat sonunda en etkili sitotoksik etki gösteren kombinasyon konsantrasyonları hücre canlılığına bakılarak bulunmuştur. Cetuximab (IC_{50}) ile birlikte uygulanan epirubicin-HCl konsantrasyonları (IC_5 , IC_{10} , IC_{20} , IC_{30} , IC_{40}) kendi aralarında sıralandığında en etkili sitotoksik etki gösteren konsantrasyonlar, IC_{50} cetuximab + IC_5 Epirubicin-HCl ($5 > 20 > 10 > 40 > 30$) olarak bulunmuştur (Çizelge 4.8). Bundan sonraki çalışmalarda en etkili sitotoksik etki gösteren kombinasyonda ki konsantrasyonlar olan IC_{50} cetuximab + IC_5 epirubicin-HCl kullanılarak devam edilmiştir.



Şekil 4.8. Cetuximabın epirubicin-HCl (IC₅, IC₁₀, IC₂₀, IC₃₀, IC₄₀) ile birlikte R-Hep G2 hücrelerinde hücre canlılığına etkisi

Çizelge 4.8. Cetuximabın (IC₅₀) epirubicin-HCl ile birlikte R-Hep G2 hücreleri üzerine sitotoksik etkisi

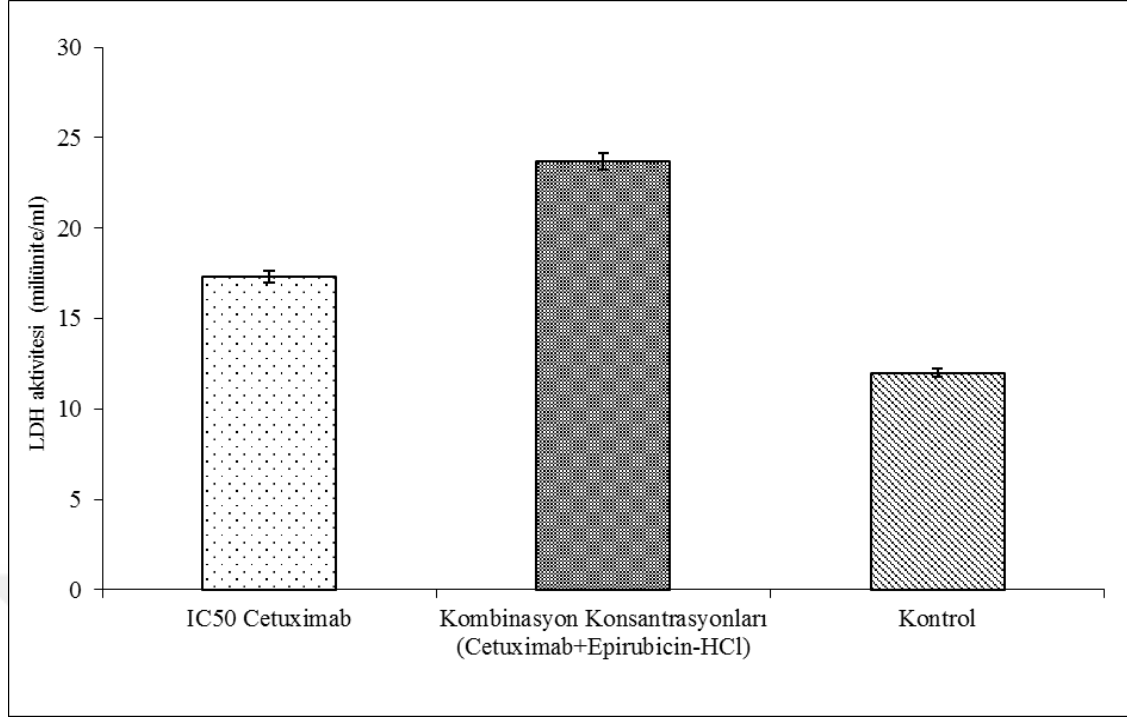
Epirubicin-HCl konsantrasyonları	Canlı hücre sayısı (%) 72 saatlik inkübasyon X ± SH
IC ₅ (0.03 µg/ml)	37 ± 1.05 d
IC ₁₀ (0.11 µg/ml)	37 ± 1.01 d
IC ₂₀ (0.32 µg/ml)	26 ± 1.07 c
IC ₃₀ (0.53 µg/ml)	19 ± 1.08 b
IC ₄₀ (0.74 µg/ml)	8 ± 0.42 a
Kontrol	100 ± 0.09 j

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0.05). SH: Standart Hata

4.3.2. İlaça dirençli Hep G2 hücrelerinde laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite

ölçümü

Cetuximab tek başına (IC₅₀ konsantrasyonu) ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte (en etkili sitotoksik etki gösteren konsantrasyon kombinasyonu) R-Hep G2 hücrelerine 72 saat boyunca uygulanarak LDH enzim aktivitesindeki değişiklikler belirlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte R-Hep G2 hücrelerinde LDH aktivitesi üzerine etkisi

Hücrelerde en yüksek LDH aktivitesi cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasında görülmüştür. Tek başına cetuximab ve epirubicin-HCl ile birlikte uygulama yapılan hücrelerdeki LDH aktivitesi kontrol grubu hücrelerinden yaklaşık olarak sırasıyla 1.4 kat ve 2 kat daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.9). Birlikte uygulama yapılan hücrelerdeki LDH enzim aktivitesi kontrol grubu hücrelerindeki LDH enzim aktivitesinden istatistiksel olarak farklı ($p < 0.05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.9. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı R-Hep G2 hücrelerinde LDH enzim aktivite düzeyleri

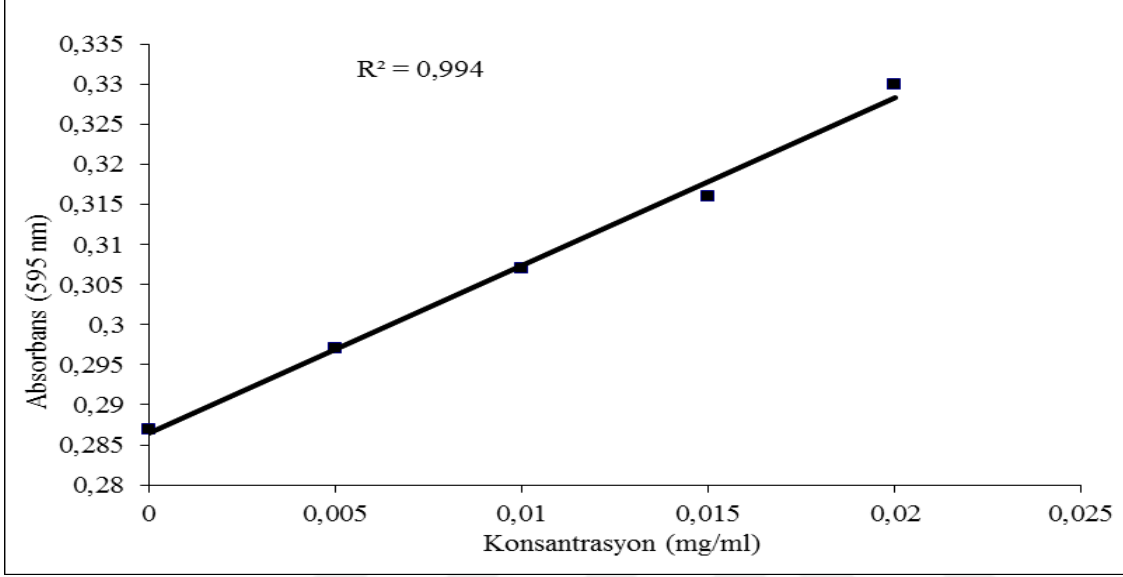
Uygulamalar	LDH Aktivitesi (miliünite/ml) X ± SH
Cetuximab	17.3 ± 0.25 ab
Cetuximab + Epirubicin-HCl	23.7 ± 0.43 b
Kontrol	12.0 ± 0.13 a

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). SH: Standart Hata

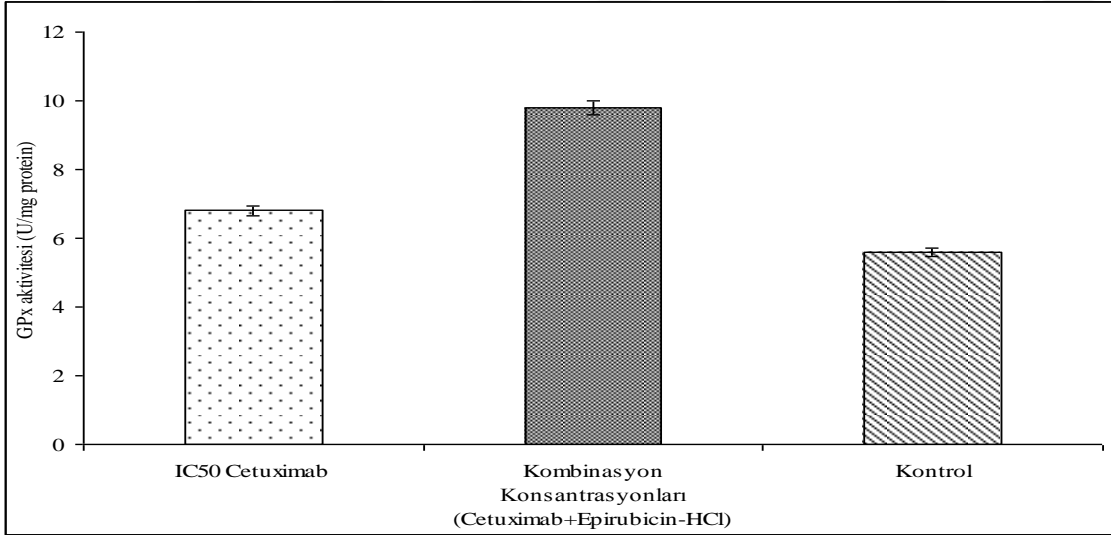
4.4. Cetuximabın Tek Başına ve Epirubicin-HCl ile Birlikte Parental ve İlaça Dirençli Hep G2 Hücrelerinde Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Ölçülmesi

Glutasyon peroksidaz (GPx), hücrelerin antioksidan enzimlerinden birisidir. Hücreler, prooksidan/oksidan bir ajana maruz kaldıklarında kendilerini oksidatif strese

karşı korumak için bu enzimi sentezlerler. Cetuximab tek başına (IC_{50} konsantrasyonu) ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte (en etkili sitotoksik etki gösteren kombinasyon konsantrasyonları) P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücrelerine 72 saat uygulandıktan sonra hücrelerdeki oksidatif stresin belirteci olan glutasyon peroksidaz aktivitesindeki değişiklikler belirlenmiştir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). Bovine serum albumin (BSA) standart grafiği ($y = 2.1x + 0.2864$) Şekil 4.10'da verilmiştir.



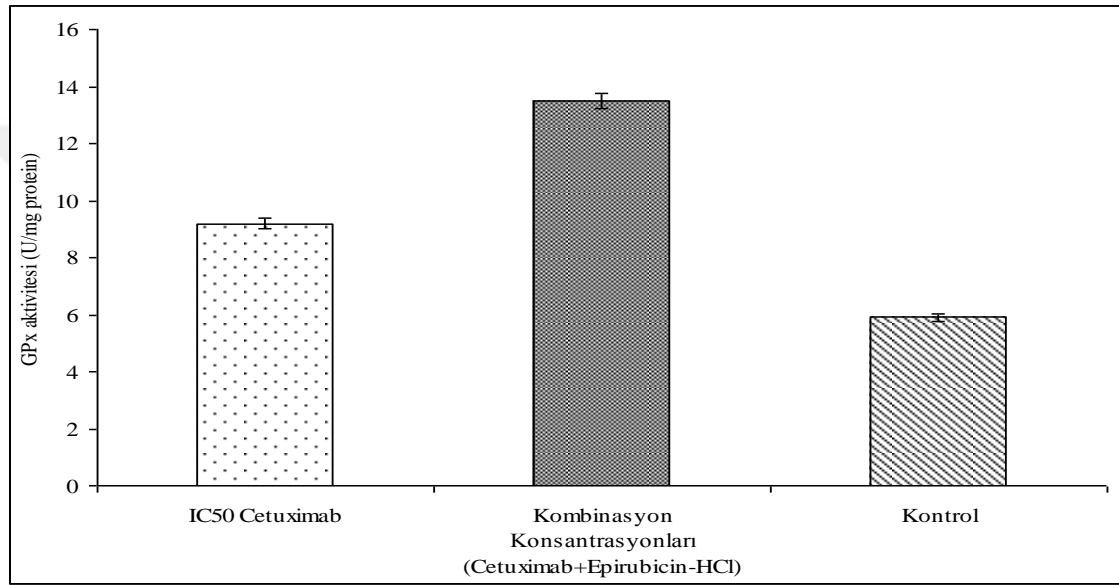
Şekil 4.10. BSA standart grafiği



Şekil 4.11. P-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesine etkisi

72 saat süreyle cetuximaba maruz bırakılan parental hücreler kontrol grubu hücreleri ile karşılaştırıldığında glutasyon peroksidaz aktivitesinin %21 oranında arttığı gözlenmiştir ve bu artışta istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). Cetuximab ve epirubicin-HCl birlikte parental hücrelere 72 saat uygulandıında

glutasyon peroksidaz aktivitesinin kontrol grubu hücrelerine göre %75 oranında arttığı gözlenmiş ve bu artışta istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). Cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı parental hücrelerdeki glutasyon peroksidaz aktivitesi sadece cetuximab uygulanmış hücrelerdeki glutasyon peroksidaz aktivitesinden 1.4 kat daha fazla bulunmuştur (Çizelge 4.10). Tek başına cetuximab uygulanmış R-Hep G2 hücrelerinde ise glutasyon peroksidaz aktivitesinin kontrol grubu hücrelerine göre %56 oranında arttığı gözlemlenmiştir ve bu artışta istatistiksel açıdan önemli olduğu bulunmuştur ($p < 0.05$). Cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı R-Hep G2 hücrelerindeki glutasyon peroksidaz aktivitesi sadece cetuximab uygulanmış hücrelerdeki glutasyon peroksidaz aktivitesinden yaklaşık olarak 1.5 kat daha fazla bulunmuştur (Çizelge 4.10).



Şekil 4.12. R-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesine etkisi

Çizelge 4.10. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücrelerinde glutasyon peroksidaz aktivite düzeyleri

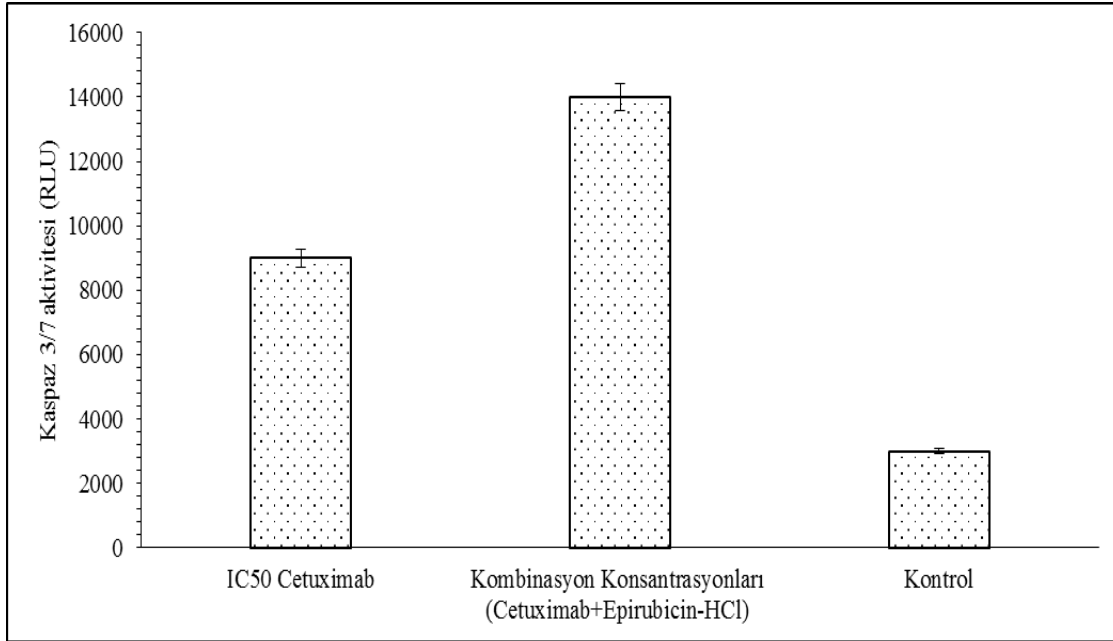
Uygulamalar	Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi (U/mg protein)	
	X ± SH	
	P-Hep G2	R-Hep G2
Cetuximab (IC ₅₀)	6.8 ± 0.50 b	9.2 ± 0.57 de
Cetuximab + Epirubicin-HCl	9.8 ± 0.15 e	13.5 ± 0.49 hı
Kontrol	5.6 ± 0.12 a	5.9 ± 0.60 a

X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur ($p < 0.05$). SH: Standart Hata

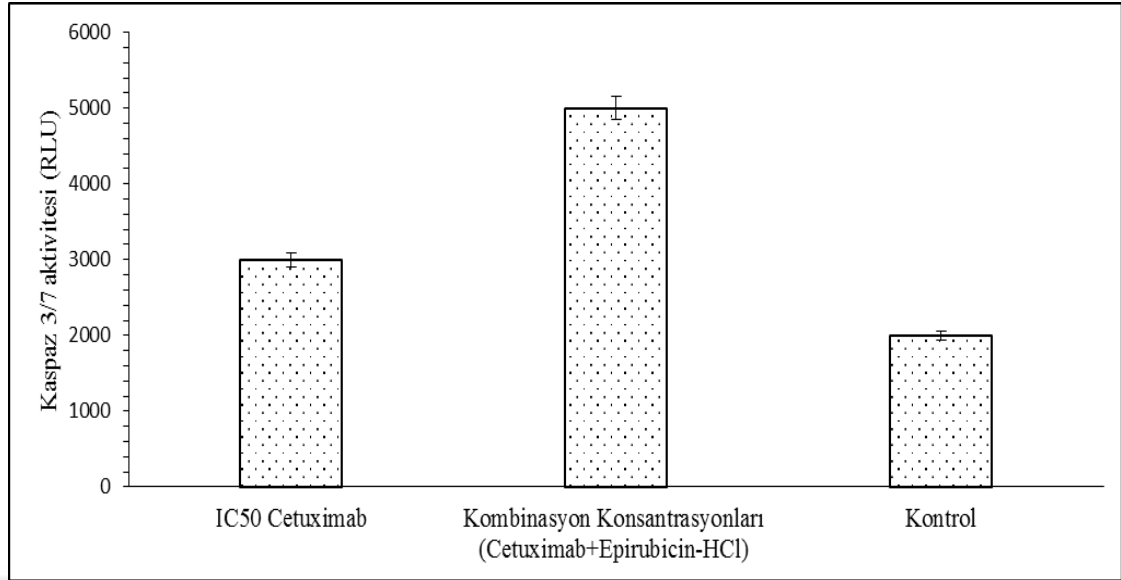
4.5. Parental ve İlaça Dirençli Hep G2 Hücrelerinde Cetuximabın Tek Başına ve Epirubicin-HCl ile Birlikte Kaspaz-3/7 Enzim Aktivitesine Etkisinin Ölçülmesi

Parental ve ilaca dirençli Hep G2 hücrelerine cetuximab tek başına ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte 72 saat uygulandıktan sonra apoptotik yolun anahtar enzimlerinden biri olan kaspaz-3/7'nin aktivitesi ölçülerek apoptozu uyarma potansiyelleri belirlenmiştir.

Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücrelerinde kaspaz-3/7 enzim aktivitesine etkileri sırasıyla Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'te verilmiştir. P-Hep G2 hücrelerinde kaspaz-3/7 aktivitesi, 72 saatlik cetuximab inkübasyonu sonunda kontrole göre 3 kat artış gösterirken epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında ise kontrole göre yaklaşık 4.7 kat artış göstermiştir (Çizelge 4.11). Cetuximab, epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında P-Hep G2 hücrelerindeki kaspaz-3/7 aktivitesinin sadece cetuximab uygulanan hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivitesinden 1.6 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı P-Hep G2 hücrelerindeki kaspaz-3/7 aktivitesi istatistiksel olarak birbirlerinden ve kontrolden farklı ($p < 0.05$) bulunmuştur. Gerek cetuximabın tek başına, gerekse epirubicin-HCl ile birlikte uygulaması sonucunda kaspaz-3/7 aktivitesindeki en fazla artış P-Hep G2 hücrelerinde görülmüştür. 72 saat cetuximab uygulanmış R-Hep G2 hücrelerindeki kaspaz-3/7 aktivitesi kontrole göre 1.5 kat artış gösterirken cetuximab epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında kaspaz-3/7 aktivitesi kontrole göre yaklaşık olarak 2.5 kat artış göstermiştir (Şekil 4.14). Cetuximab, epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında R-Hep G2 hücrelerindeki kaspaz-3/7 aktivitesinin sadece cetuximab uygulanan hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivitesinden 1.7 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.11).



Şekil 4.13. P-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte kaspaz-3/7 enzim aktivitesine etkisi



Şekil 4.14. R-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte kaspaz-3/7 enzim aktivitesine etkisi

Çizelge 4.11. Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücrelerinde kaspaz-3/7 enzim aktiviteleri

Uygulamalar	Kaspaz-3/7 Aktivitesi (RLU)	
	X ± SH	
	P-Hep G2	R-Hep G2
Cetuximab (IC ₅₀)	9000 ± 0.65 h	3000 ± 0.17 b
Cetuximab + Epirubicin-HCl	14000 ± 0.43 m	5000 ± 0.29 d
Kontrol	3000 ± 0.12 b	2000 ± 0.10 a

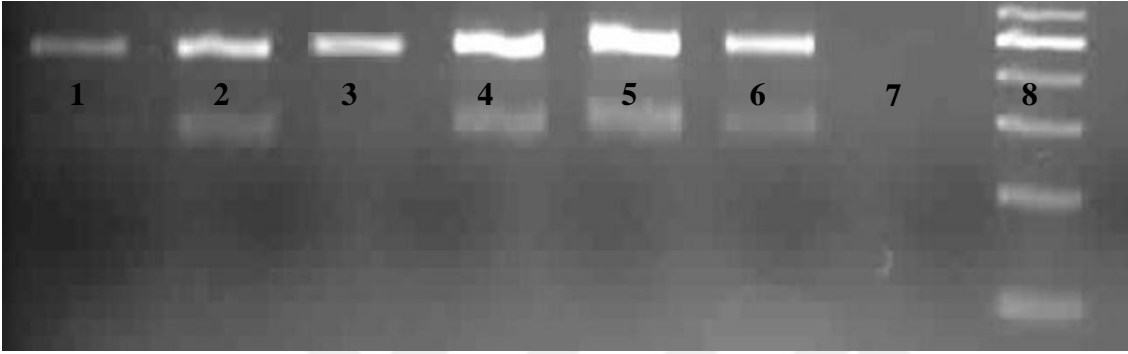
X: Beş tekrarın ortalaması olup aynı sütunda ayrı harfleri alan değerler birbirinden istatistiksel önemde farklı bulunmuştur (p<0.05). RLU: Bağlı Işık Birimi-Luminesans. SH: Standart Hata

4.6. Parental ve İlaça dirençli Hep G2 Hücrelerinde Cetuximabın Tek Başına ve Epirubicin-HCl ile Birlikte Prolifere Hücre Nükleer Antijeni (PCNA), Siklin D1, Bax ve Bcl-2 Genlerinin İfade Düzeylerine Etkisi

Çoğalan proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA), siklin D1, Bax ve Bcl-2 genlerinin ifade düzeyleri Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile belirlenerek cetuximabın tek başına (IC₅₀ konsantrasyonu) ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasının antiproliferatif etkiye, hücre döngüsünü bloke edici etkiye ve apoptotik etkiye neden olup olmadıkları gösterilmiştir.

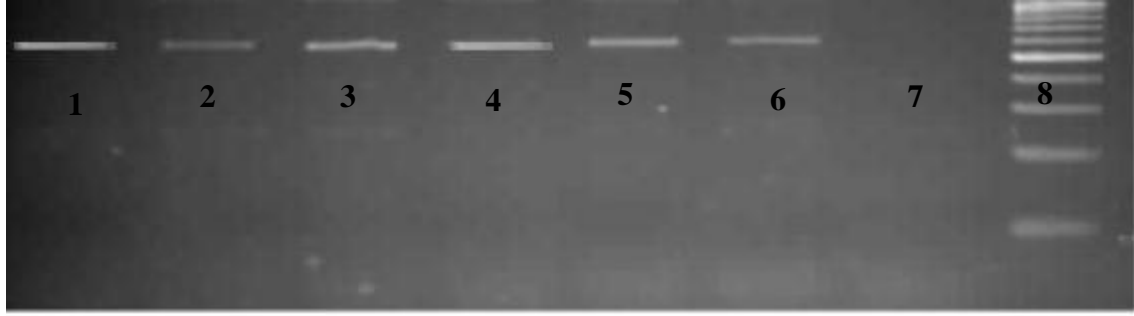
Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte hücrelerdeki PCNA, siklin D1, Bax ve Bcl-2 transkripsiyonlarını etkileyip etkilemediğini incelemek için her bir gen için spesifik primer çiftleri ve kontrol olarak gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) geni kullanılarak RT-PCR yapılmıştır (Şekil 4.15).

Sadece besiyeri ile muamele edilmiş hücrelerimizde (kontrol grubu) ve cetuximabın tek başına ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı tüm hücre gruplarımızda GAPDH geninin ekspresyonuna bakılarak RT-PCR'da kalıp DNA olarak kullanılan cDNA sentezinin gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir (Şekil 4.15). PCNA, siklin D1, Bax ve Bcl-2 genlerinin RT-PCR çalışmalarına cDNA sentezinin gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildikten sonra geçilmiştir. Tüm hücre gruplarımızda GAPDH gen ekspresyonunun varlığı gösterilerek cDNA sentezinin başarılı bir şekilde yapıldığı ortaya konmuştur. Tüm RT-PCR çalışmalarımızda kullanılan negatif kontrol gruplarımızın jel görüntülerinde herhangi bir bandın görülmemesi deneylerimizde herhangi bir kontaminasyonun olmadığını göstermiştir.



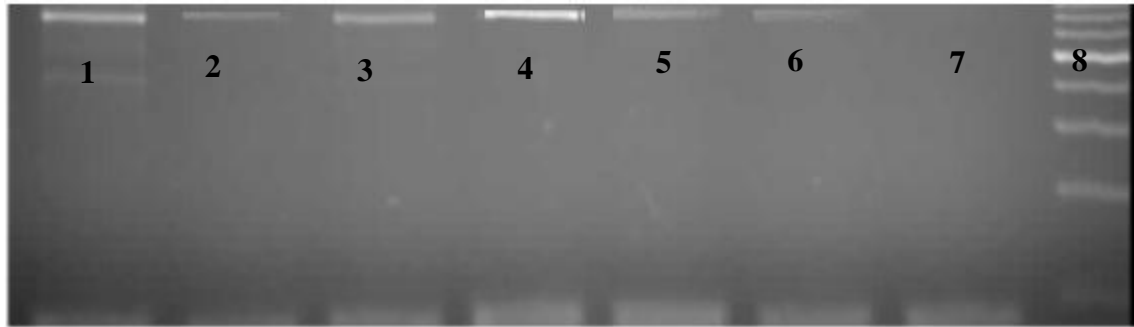
Şekil 4.15. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile GAPDH'nin mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk P-Hep G2 kontrol, 2. kuyucuk P-Hep G2 IC₅₀ cetuximab, 3. kuyucuk P-Hep G2 cetuximab + Epirubicin-HCl, 4. kuyucuk R-Hep G2 kontrol, 5. kuyucuk R-Hep G2 IC₅₀ cetuximab, 6. kuyucuk R-Hep G2 cetuximab + Epirubicin-HCl, 7. kuyucuk (-) kontrol, 8. Kuyucuk 100 bp DNA ladder

P-Hep G2 hücrelerine tek başına cetuximab uygulandığında PCNA mRNA ekspresyonunun kontrol grubu hücrelerine göre %27.3 azaldığı bulunurken cetuximab ve epirubicin-HCl birlikte uygulandığında %4.3'lük azalmanın olduğu hesaplanmıştır. R-Hep G2 hücrelerine ise tek başına cetuximab uygulandığında PCNA ekspresyonunun kontrol grubu hücrelerine göre %20.5 azaldığı bulunurken cetuximab ve epirubicin-HCl birlikte uygulandığında %28 oranında azalmanın olduğu hesaplanmıştır. P-Hep G2 hücrelerinde tek başına cetuximab uygulaması PCNA mRNA ekspresyonunda daha etkili azalmaya neden olurken R-Hep G2 hücrelerinde cetuximab ve epirubicin-HCl'nin birlikte uygulamasının daha fazla azalmaya neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.16). Tek başına cetuximab uygulaması P-Hep G2 hücrelerinde daha fazla antiproliferatif etki gösterirken R-Hep G2 hücrelerinde kombine uygulama daha fazla antiproliferatif etki göstermiştir (Şekil 4.20).



Şekil 4.16. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile PCNA'nın mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk P-Hep G2 kontrol, 2. kuyucuk P-Hep G2 IC₅₀ cetuximab, 3. kuyucuk P-Hep G2 cetuximab + Epirubicin-HCl, 4. kuyucuk R-Hep G2 kontrol, 5. kuyucuk R-Hep G2 IC₅₀ cetuximab, 6. kuyucuk R-Hep G2 cetuximab + Epirubicin-HCl, 7. kuyucuk (-) kontrol, 8. Kuyucuk 100 bp DNA ladder

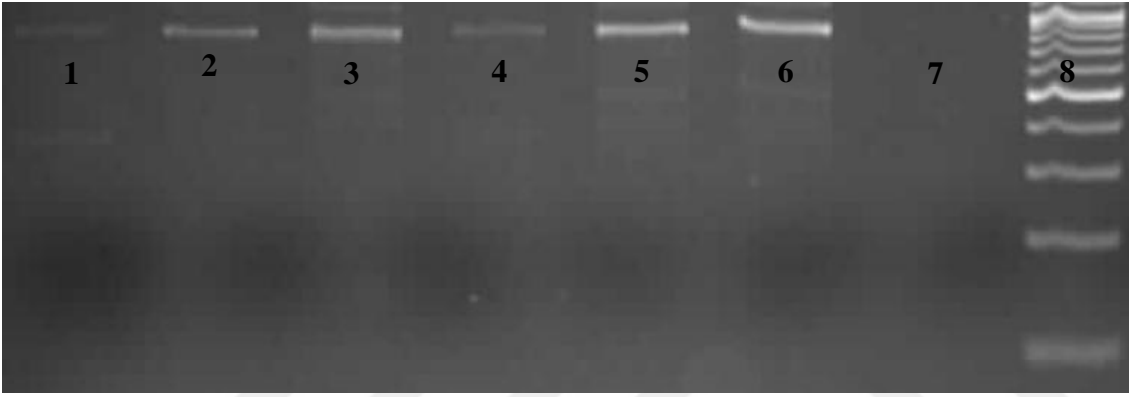
P-Hep G2 hücrelerine tek başına cetuximab uygulandığında siklin D1 mRNA ekspresyonunun kontrol grubu hücrelerine göre %49.7 azaldığı bulunurken cetuximab ve epirubicin-HCl birlikte uygulandığında %22.8'lik azalmanın olduğu hesaplanmıştır. R-Hep G2 hücrelerine ise tek başına cetuximab uygulandığında siklin D1 ekspresyonunun kontrol grubu hücrelerine göre %39 azaldığı bulunurken cetuximab ve epirubicin-HCl birlikte uygulandığında %66.7 oranında azalmanın olduğu hesaplanmıştır (Şekil 4.17). P-Hep G2 hücrelerinde tek başına cetuximab uygulaması siklin D1 mRNA ekspresyonunda daha etkili azalmaya neden olurken R-Hep G2 hücrelerinde cetuximab ve epirubicin-HCl'nin birlikte uygulamasının daha fazla azalmaya neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.20). P-Hep G2 hücrelerinde hücre döngüsünün 'G1' fazından 'S' fazına geçişinde tek başına cetuximab uygulaması daha etkili olurken R-Hep G2 hücrelerinde kombine uygulama daha etkili olmuştur.



Şekil 4.17. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile siklin D1'in mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk P-Hep G2 kontrol, 2. kuyucuk P-Hep G2 IC₅₀ cetuximab, 3. kuyucuk P-Hep G2 cetuximab + Epirubicin-HCl, 4. kuyucuk R-Hep G2 kontrol, 5. kuyucuk R-Hep G2 IC₅₀ cetuximab, 6. kuyucuk R-Hep G2 cetuximab + Epirubicin-HCl, 7. kuyucuk (-) kontrol, 8. Kuyucuk 100 bp DNA ladder

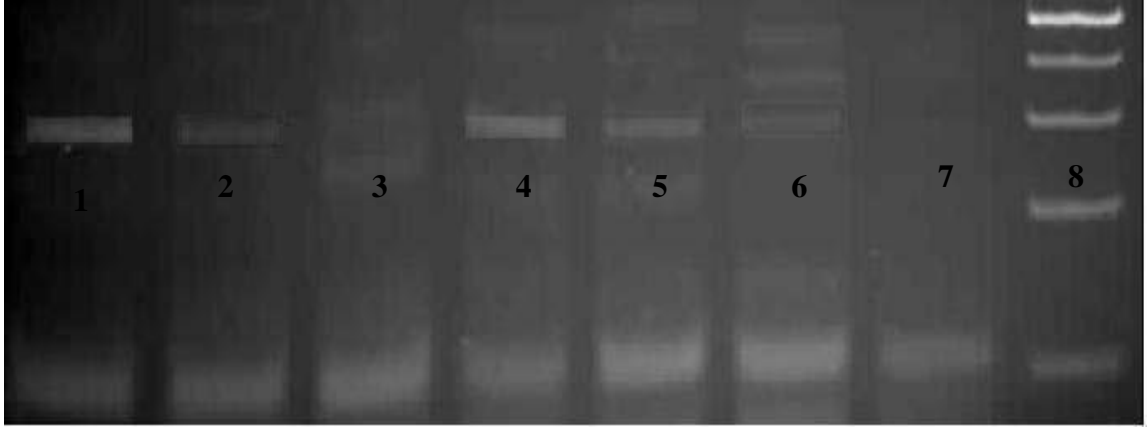
Mitokondrilerden sitokrom c'nin salınmasını sağlayan pro-apoptotik bir protein olan Bax ile anti-apoptotik Bcl-2 dengesi hücrelerin yaşamaya devam etmelerini veya ölmelerini belirlemede önemli olduğu bilinmektedir. Bir hücrede Bax/Bcl-2 oranı

apoptoza karşı hücrenin duyarlılığını düzenlemede etkilidir. Hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde tek başına cetuximab ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte uygulaması Bax mRNA ekspresyonunun kontrol grubu hücrelerine göre artmasını sağlamıştır. P-Hep G2 hücrelerine tek başına cetuximab uygulandığında Bax mRNA ekspresyonunun kontrol grubu hücrelerine göre %24.8 arttığı bulunurken cetuximab ve epirubicin-HCl birlikte uygulandığında %66.7'lik artmanın olduğu hesaplanmıştır. R-Hep G2 hücrelerine ise sadece cetuximab uygulandığında Bax ekspresyonunun kontrol grubu hücrelerine göre %15 arttığı bulunurken cetuximab ve epirubicin-HCl birlikte uygulandığında %39.7 oranında artmanın olduğu hesaplanmıştır (Şekil 4.18). Her iki uygulama P-Hep G2 hücrelerinde R-Hep G2 hücrelerinden daha fazla Bax ekspresyonu artışına neden olmuştur. Hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde kombine uygulama tek başına cetuximab uygulamasına göre Bax mRNA ekspresyonunu arttırmada daha etkili olmuştur (Şekil 4.20).

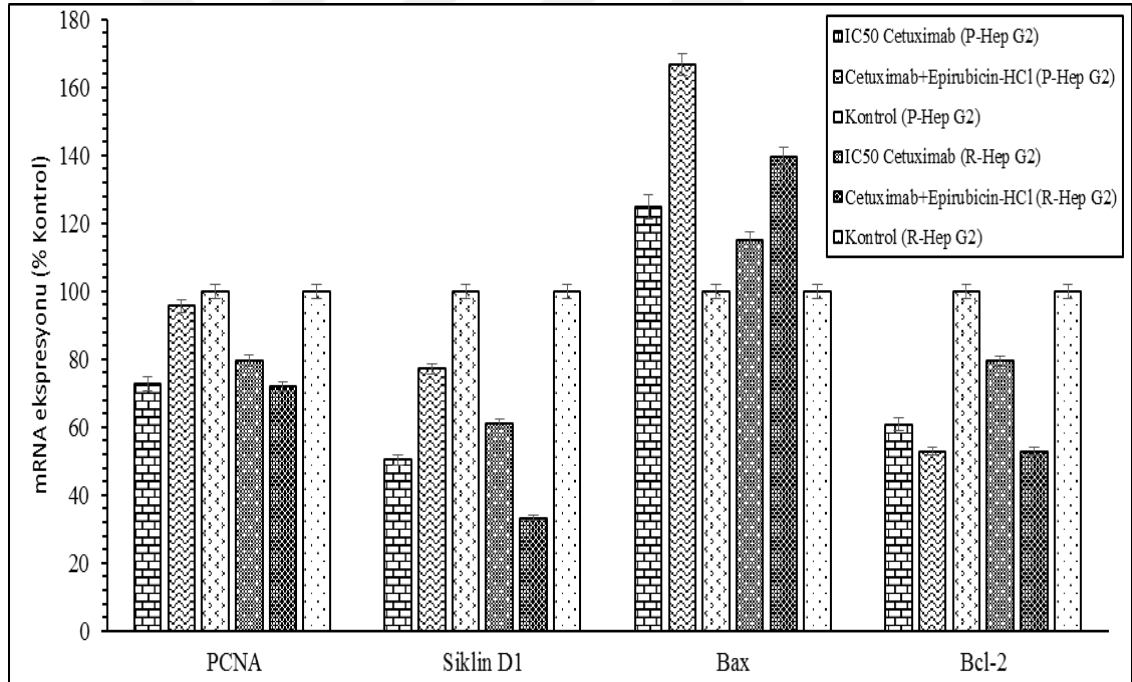


Şekil 4.18. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile Bax'ın mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk P-Hep G2 kontrol, 2. kuyucuk P-Hep G2 IC₅₀ cetuximab, 3. kuyucuk P-Hep G2 cetuximab + Epirubicin-HCl, 4. kuyucuk R-Hep G2 kontrol, 5. kuyucuk R-Hep G2 IC₅₀ cetuximab, 6. kuyucuk R-Hep G2 cetuximab + Epirubicin-HCl, 7. kuyucuk (-) kontrol, 8. Kuyucuk 100 bp DNA ladder

P-Hep G2 hücrelerine tek başına cetuximab uygulandığında Bcl-2 mRNA ekspresyonunun kontrol grubu hücrelerine göre %39.2 azaldığı bulunurken cetuximab ve epirubicin-HCl birlikte uygulandığında %47.1'lik azalmanın olduğu hesaplanmıştır. R-Hep G2 hücrelerine ise sadece cetuximab uygulandığında Bcl-2 ekspresyonunun kontrol grubu hücrelerine göre %20.6 azaldığı bulunurken cetuximab ve epirubicin-HCl birlikte uygulandığında %34.6 oranında azalmanın olduğu hesaplanmıştır (Şekil 4.19). Her iki uygulama P-Hep G2 hücrelerinde R-Hep G2 hücrelerinden daha fazla Bcl-2 ekspresyonu azalmasına neden olmuştur. Hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde kombine uygulama tek başına cetuximab uygulamasına göre Bcl-2 mRNA ekspresyonunu azaltmada daha etkili olmuştur (Şekil 4.20). Dolayısıyla, hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde tek başına cetuximab ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte uygulanması Bax/Bcl-2 oranında artışa neden olmuştur.



Şekil 4.19. Tüm hücrelerde RT-PCR analizi ile Bcl-2'nin mRNA ekspresyonu. 1. kuyucuk P-Hep G2 kontrol, 2. kuyucuk P-Hep G2 IC₅₀ cetuximab, 3. kuyucuk P-Hep G2 cetuximab + Epirubicin-HCl, 4. kuyucuk R-Hep G2 kontrol, 5. kuyucuk R-Hep G2 IC₅₀ cetuximab, 6. kuyucuk R-Hep G2 cetuximab + Epirubicin-HCl, 7. kuyucuk (-) kontrol, 8. Kuyucuk 100 bp DNA ladder



Şekil 4.20. Tüm hücrelerde karşılaştırmalı PCNA, siklin D1, Bax ve Bcl-2 mRNA ekspresyon seviyeleri

Cetuximab ve epirubicin-HCl'nin 72 saatlik IC₅₀ değerleri (hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonu) P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücrelerinde sırasıyla cetuximab için 1000 µg/ml ve 2279 µg/ml olarak hesaplanırken epirubicin-HCl için ise 0.80 µg/ml ve 0.95 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulanması hem P-Hep G2 hem de R-Hep G2 hücrelerinde sitotoksik etkiyi arttırmıştır. P-Hep G2 hücrelerinde en etkili sitotoksik etki gösteren kombinasyonda ki konsantrasyonlar

olarak IC₅₀ cetuximab + IC₄₀ epirubicin-HCl belirlenirken R-Hep G2 hücrelerinde IC₅₀ cetuximab + IC₅ epirubicin-HCl kombinasyon konsantrasyonları olarak belirlenmiştir. Hücre membran bütünlüğünün bozulması sonucu salınan sitoplazmik bir enzim olan laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesindeki en fazla artış hem P-Hep G2 hem de R-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasında görülmüştür. Cetuximab ve epirubicin-HCl birlikte uygulandığında glutatyon peroksidaz aktivitesinin kontrol grubu hücrelerine göre P-Hep G2 hücrelerinde 1.75 kat, R-Hep G2 hücrelerinde ise 2.3 kat arttığı gözlenmiştir. Apoptotik yolağın anahtar enzimlerinden biri olan kaspaz-3/7 aktivitesi 72 saatlik cetuximab uygulaması sonunda P-Hep G2 hücrelerinde kontrole göre 3 kat artarken cetuximab epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında yaklaşık olarak 4.7 kat artışın olduğu bulunmuştur. R-Hep G2 hücrelerinde cetuximab kaspaz-3/7 aktivitesinde kontrole göre 1.5 kat artışa neden olurken epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında yaklaşık olarak 2.5 kat artışa neden olmuştur. Antiproliferatif etkiyi ortaya koyan proliferasyon hücre nükleer antijeninin (PCNA) ve hücre döngüsünü durdurucu etkiyi ortaya koyan siklin D1 genlerinin mRNA ekspresyonlarının azalmasında P-Hep G2 hücrelerinde tek başına cetuximab uygulamasının daha etkili olduğu görülürken R-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasının daha etkili olduğu görülmüştür. Pro-apoptotik bir gen Bax mRNA ekspresyonunun hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde kontrol grubu hücrelerine göre artmasında cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasının tek başına cetuximab uygulamasına göre daha etkili olduğu bulunmuştur. Cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulaması anti-apoptotik bir gen olan Bcl-2 mRNA ekspresyonunu hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde tek başına cetuximab uygulamasına göre daha fazla azaltmıştır. Dolayısıyla, hem tek başına cetuximab uygulaması hem de cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulaması her iki hücrede Bax/Bcl-2 oranında artışa neden olmuştur.

Sonuç olarak, P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücrelerinin tek başına cetuximab ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte uygulamalarına farklı cevap vermeleri hücrelerin epirubicin-HCl'ye karşı direnç geliştirmesi, farklı antioksidan kapasiteye ve farklı pro-apoptotik/anti-apoptotik gen aktivitetlerine sahip olmaları ile ilişkilendirilebilir. Çalışılan tüm parametreler göz önünde bulundurulduğunda, cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasının cetuximabın tek başına uygulamasına göre daha çok antikanser etkisi gösterdiği görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Hepatosellüler karsinoma (HCC) dünyada en yaygın beşinci kanser türüdür ve yılda yarım milyon ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir (Bosetti vd 2014). HCC'nin kötü prognozu yüzünden ve klinikte ortaya çıkan sorunların çok çeşitli olmasından dolayı tedavi edilememektedir (Chen vd 2012). HCC tedavisinde en sık kullanılan yöntem olan cerrahi sonrası hastalık %70 gibi yüksek bir oran ile 5 yıl içinde yeniden nüks edebilmektedir (Llovet vd 2003). Sağkalım oranları karaciğer nakli ile artış göstermesine rağmen donör bulmadaki sıkıntılarda bunu sınırlamaktadır (Chen vd 2012). Ülkemizde 2013 yılında 1248 tane karaciğer nakli yapılmıştır. Nakil yapılan hastaların 1086'sı yaşamına devam etmiş, 162'si ise hayatını kaybetmiştir (Anonim 1). Ayrıca, ileri evre hastalarına karaciğer nakli veya cerrahi müdahale genelde uygulanmamaktadır (Bruix ve Llovet 2009). HCC'li hastaların hayatta kalma oranlarının artırılması için ve kullanılan mevcut tedavi yöntemlerinin başarı oranlarının artırılması için yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi zorunludur (Chen vd 2012).

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan en önemli metotlardan biri kemoterapidir. Doxorubicin ve epirubicin-HCl karaciğer kanseri tedavisinde kullanılan önemli ilaçlar arasında yer almaktadır. Doxorubicin ve epirubicin-HCl antrasiklin analoglarıdır. Antrasiklinler bilindiği gibi dünyada en yaygın kullanılan ve en etkili antineoplastik ajanların bir grubunu oluşturmaktadır (Schlitt vd 2014, Roche vd 2006, Llovet ve Bruix 2003). Bu ilaçların kullanımlarında karşımıza çıkan en önemli problem kümülâtif doz sınırlayıcı kardiyotoksisitedir (Nasr vd 2014). Epirubicin-HCl'nin doxorubicinden farkı C-4 pozisyonunda OH-grubu konfigürasyonundaki değişikliktir. Epirubicin-HCl doxorubicine yakın eşdeğer antitümör etkiye sahip olup hemen hemen onun yarı süresinde elimine olarak daha az kardiyotoksisiteye neden olduğu hayvan sistemlerinde gösterilmiştir (Han vd 2015, Simunek vd 2009, Berthiaume ve Wallace 2007). Çalışmamızda epirubicin-HCl'yi tercih etmemizdeki en önemli neden doxorubicin ve diğer antrasiklinlere göre daha az kardiyotoksisiteye neden olmasıdır. Ancak kemoterapi de istenen başarıya ulaşılamaması ve kanser hücrelerinin epirubicin-HCl'ye direnç geliştirmesi kombine tedavilere ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Kanser hastalarında gelişen ilaç dirençliliği, tedavinin uzamasına ve yüksek doz ilaç kullanımına sebep olarak hastalarda görülen yan etkilerin artmasına neden olup tedaviyi daha da zorlaştırmaktadır (Gao vd 2013). Dolayısıyla, mevcut ilaçların terapötik etkilerinin artırılması için yapılacak çalışmalarda parental kanser hücreleri ile birlikte ilaca dirençli kanser hücrelerinin de göz önünde bulundurulduğu, parental kanser hücrelerini öldürürken ilaca dirençli kanser hücrelerini de öldürebilen yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin gerektiğini düşünmekteyiz. Son günlerde geliştirilen yeni tedavi stratejilerinden biri de hedeflendirilmiş kemoterapötiklerin konvansiyonel kemoterapötiklerle birlikte uygulanmasıdır.

Son yirmi yıl içinde moleküler onkolojideki önemli gelişmeler sonucunda karsinogenez, tümör büyüme ve invazyonu ile metastaz biyolojisinde heyecan verici önemli bilgi kazanımları olmuştur. Kanser hücrelerinin 'ölümsüz, immortal' niteliklerine yönelik temel moleküler biyolojik bilgiler, güncel terapötik yaklaşımlara yeni boyutlar kazandırmıştır. Bu yeni antikanser ilaçların grubu ile 'hedeflenmiş kanser tedavisi' kavramı gündeme gelmiştir. Bu yeni moleküller, özgül hücrel anormalliklere karşı

‘hedeflenerek’ kullanılmaya başlanmıştır ve ‘targeted therapies=smart bombs’ olarak yabancı literatürde isimlendirilmiştir (Beeram ve Patnaik 2002). Konvansiyonel kemoterapötikler ‘seçici’ olmadıkları için proliferen olan tümör hücrelerini yok ederken normal hücreleri de ortadan kaldırmaktadırlar. Hedeflendirilmiş terapötikler ise ‘seçici hedefleri’ nedeniyle ‘özüml-moleküler defekti’ olan tümör hücrelerine yönelerek kanser hücrelerini öldürürken normal hücrelerin sağlıklı bir ortamda devamına imkân tanımaktadır. Bu nedenle hedeflenmiş tedavilerin en önemli avantajı ‘terapötik indekslerinin yüksek’ olmasıdır. Son sekiz-on yıl içinde pre-klinik ve klinik araştırma sonuçları tamamlanmış yeni ajanlar hızla Amerika Birleşik Devlet’lerinde FDA onayı alarak kliniğe gelmiş bulunmaktadır (Chaplin ve Dougherty 1990, Bicknell ve Haris 1992, Goss ve Gauthier 2004).

Kanser tedavisinde hedeflendirilmiş kemoterapötiklerin (antikorlar ve küçük molekül inhibitörleri) en önemli hedeflerinden birisi pek çok kanser hücrelerinde anormal ve sürekli olarak eksprese edilen epidermal büyüme faktörü reseptörüdür (EGFR). Çeşitli çalışmalar, tümörlerin agresif büyüme özelliklerine katkıda bulunan EGFR’lerin insan hepatosellüler kanserinde (HCC) sık sık ifade edildiğini göstermiştir (Lupberger vd 2011, Itabashi vd 2008, Buckley vd 2008). Epidermal büyüme faktörü (EGF), tümör hücre proliferasyonu, apoptozun inhibisyonu, anjiogenez, invazyon ve metastaz gibi süreçlerde önemli rol oynamasından dolayı EGFR antikanser ilaçları için önemli bir hedef haline gelmiştir (Cooper ve Hausman 2006). EGFR’ye ligand bağlandıktan sonra reseptör-aracılı sinyal iletimi başlayarak, dimerizasyon ile hücre mitogenezini ve hücre transformasyonunu başlatan EGFR tirozin kinaz (TK) aktivitesi aktif hale gelir (Krasinskas 2011).

Çalışmamızda kullandığımız cetuximab, EGFR’ye hedeflendirilmiş bir kimerik monoklonal antikordur (mAb). Cetuximab endojen ligandlara göre yaklaşık olarak 5-10 kat daha yüksek bir afinite ile EGFR’ye özel olarak bağlanır ve reseptörün fonksiyonunun inhibisyonunu sağlar (Lim vd 2011, Van Cutsem vd 2009). Günümüze kadar cetuximab ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalarda cetuximabın meme, kolon, akciğer, böbrek ve prostat gibi çeşitli insan kanser hücrelerinin çoğalmasını apoptozu uyararak, EGFR, AKT ve mitojen-aktif protein kinazların (MAPK) fosforilasyonunu engelleyerek inhibe ettiği gösterilmiştir (D’Angelo vd 2014, Chen vd 2014, Mao vd 2010). Ancak, cetuximab ile tedavi sadece rektal ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri gibi az sayıda kanserde istenen etkiyi göstermiştir (Harari 2004) ve HCC hastaları ile yapılan klinik çalışmalarda ise beklenen sonuçları gösterememiştir (Llovet ve Bruix 2008, Zhu vd 2007, Gruenwald vd 2007). HCC’lerde EGFR’nin aşırı ifadesi ile tümörün erken nüks etmesi (Daveau vd 2003) ve ekstrahepatik metastaz oluşumu arasında pozitif bir ilişkinin olduğu gösterilmiştir (Zhao vd 2004). Bu nedenle EGFR, HCC’de yeni tedavi stratejileri geliştirmek için umut verici bir hedefdir.

Hedeflendirilmiş kemoterapötikler yüksek konsantrasyonlarda tek başına tedavide kullanıldığında deri toksisitesi gibi pek çok yan etkilere neden olabilmektedirler (Lim vd 2011, Van Cutsem vd 2009). Hedeflendirilmiş kemoterapötikler ile standart kemoterapi ajanlarının birlikte uygulamaları sonucunda kanser tedavisinde yeni stratejilerin ortaya çıkması sağlanabilir. Standart kemoterapi uygulamalarına hedeflendirilmiş ajanların ilave edilmesini değerlendiren hem başarılı hem de başarısız

çok sayıda örnek vardır. Parental ve epirubicin-HCl'ye dirençli Hep G2 hücrelerinde cetuximab ve epirubicin-HCl'nin birlikte kullanıldığı herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda EGFR'yi hedef alan ilaçlardan biri olan cetuximab ile epirubicin-HCl'nin parental ve ilaca direnç kazanmış karaciğer kanseri hücrelerinde (R-Hep G2) antitümör etkisi farklı mekanizmalarla araştırılmıştır. Cetuximab ve epirubicin-HCl tek başına 72 saat hücrelere uygulandıktan sonra yarattıkları sitotoksik etkiye en fazla hassasiyeti parental Hep G2 (P-Hep G2) hücreleri göstermiştir. P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücrelerinde IC₅₀ değerleri (hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyonu) sırasıyla cetuximab için 1000 µg/ml ve 2279 µg/ml olarak hesaplanırken epirubicin-HCl için ise 0.80 µg/ml ve 0.95 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Bir çalışmada, cetuximabın yabani tip p53 eksprese eden hepatosellüler kanser hücrelerinin (Hep G2) proliferasyonunu kontrollere göre zaman ve doza bağlı olarak en fazla %57 oranında (1000 µg/ml-72 saatlik uygulama) inhibe ettiği kristal-viyole boyama yöntemi ile gösterilmiştir (Huether vd 2005). Yapılan bu çalışma ile bulunan IC₅₀ konsantrasyonunun Cell Titer-Blue^R Hücre Canlılığı sitotoksikite testini kullanarak elde ettiğimiz IC₅₀ konsantrasyonuna benzer olması sonuçlarımızı desteklemektedir. Ayrıca bu çalışmada Hep G2 hücreleri ile mutant p53 eksprese eden Huh-7 hücrelerinin cetuximaba karşı farklı duyarlılık gösterdikleri gösterilmiş ve bunun nedeni olarak da iki hücre dizisi arasındaki farklı p53 seviyesinin neden olabileceği ileri sürülmüştür. Fonksiyonel olarak sağlam p53'ün G0/G1 duraklaması için bir ön koşul olduğu bilinmektedir. Hücre döngüsü kontrol noktalarının temel bir bileşeni olan tümör baskılayıcı p53 çeşitli hücrel streslere cevap olarak aktive olur. Aktive p53 transkripsiyon faktörü olarak görev yapar ve hücre döngüsünü durdurmaya yardımcı olan p21^{Waf1/CIP1} ve gadd45 gibi genlerin ekspresyonunu düzenler. Mutant p53 eksprese eden Huh-7 hücrelerinde p53 düzgün bir şekilde çalışmadığından dolayı hücre döngüsü doğru bir şekilde kontrol edilememiş ve buna bağlı olarak da cetuximaba karşı daha az duyarlılık göstermiş olabileceği bildirilmiştir (Huether vd 2005).

Cetuximab ve epirubicin-HCl'nin birlikte uygulandığı en etkili konsantrasyon P-Hep G2 hücrelerinde IC₅₀ cetuximab + IC₄₀ epirubicin-HCl olarak bulunurken R-Hep G2 hücrelerinde ise IC₅₀ cetuximab + IC₅ epirubicin-HCl olarak bulunmuştur. Epirubicin-HCl her iki hücre çeşidinde cetuximabın sitotoksik etkisini arttırmıştır. Çalışmamızda, hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde en yüksek laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesi cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasında görülmüştür. Kontrollere göre en yüksek LDH aktivite artışı P-Hep G2 hücrelerinde görülmüştür. Bir çalışmada cetuximabın tirozin kinaz inhibitörleri (erlotinib veya AG1024), HMG-CoA-redüktaz inhibitörü (fluvastatin), doxorubicin ve sisplatin ile birlikte Hep G2 ve Huh-7 hücrelerine uygulandığında sadece Hep G2 hücrelerinde sinerjistik antiproliferatif etki oluştuğu fakat Huh-7 hücrelerinde böyle bir etkinin görülmediği ortaya konmuştur (Huether vd 2005). Fakat bu sinerjistik sitotoksik etkiye neden olan mekanizmalar ile apoptotik etki mekanizmaları ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bizim yaptığımız çalışmada cetuximab ile epirubicin-HCl'nin birlikte gösterdikleri antiproliferatif etki ve etki mekanizmaları ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalarla insülin benzeri büyüme faktörü reseptörü 1'in (IGF-1R) aşırı ekspresyonunun Hep G2 hücrelerinde EGFR'ye hedeflendirilmiş ilaçlara karşı direncin nedenlerinden biri olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden HCC hücrelerinde IGF-1R'nin ve EGFR'nin birlikte hedeflenmesi EGFR'ye hedeflendirilmiş ilaçlara karşı direnç kazanılmasının engellenmesinde bir yol olarak önerilmiştir (Scharf ve Brulke 2003,

Hopfner vd 2005). Cetuximab ile tirozin fosforilasyonu ile aktive olan transkripsiyon faktörü STAT3'ün inhibitörü NSC-74859 birlikte uygulandığında Hep G2 hücrelerinin cetuximaba olan duyarlılıklarının arttığı ve STAT3'ün fosforilasyon durumunun HCC hücrelerinin cetuximab tedavisine gösterdikleri direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bunun da HCC tedavisinde yararlı bir klinik strateji olabileceği ileri sürülmüştür. Hep G2 ve Huh-7 hücreleri ile cetuximab tedavisine daha dirençli olan SK-HEP1 hücreleri karşılaştırıldığında SK-HEP1 hücrelerinde pSTAT3 düzeylerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Chen vd 2012). Cetuximab erlotinib ile birlikte Hep G2 hücrelerine uygulandığında sinerjistik bir etki göstererek EGFR sinyal iletiminin aşağı yönünde yer alan moleküllerin (p-EGFR, p-ERK1/2, p-AKT) ekspresyonlarında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Wei vd 2008). Cetuximab Hep G2 hücrelerine uygulandığında hücre göçünü inhibe ettiği, hücre döngüsünü G0/G1'de durdurduğu ve sinyal iletiminde görevli olan p-EGFR (Tyr1068), p-AKT (Ser473) ve p-ERK1/2'nin (Thr202/Tyr204) ekspresyonlarında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Ye vd 2008). Bcl-2 inhibitörü ABT737, epirubicin-HCl ile birlikte Hep G2 hücrelerine uygulandığında tek başına ABT737 uygulanmasına göre daha fazla sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. ABT737, Hep G2 hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve epirubicin-HCl'nin kemoduyarlılığını arttırdığı ortaya konmuştur (Du vd 2013). Rapamisinin hepatoma hücre dizilerinde (Hep G2, HuH7, SNU-387 ve SNU-449) cetuximab sitotoksitesini farklı oranlarda önemli ölçüde arttırdığı ortaya konmuştur. HuH7 ve Hep G2 hücrelerinde epitelyal mezenkimal geçişin uyarılmasının cetuximab sitotoksitesini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Ayrıca rapamisin önemli ölçüde cetuximab hassasiyetini restore ettiği ve bu hücrelerdeki mTOR sinyalinin azaldığı gösterilmiştir (Chen vd 2014). Rapamisin hem Hep G2 hücrelerinde hem de Huh-7 hücrelerinde cetuximabın antiproliferasyon etkisini arttırdığı gösterilmiştir. Cetuximabın rapamisin ile kombinasyonu PI3K/AKT/mTOR ve Ras/MAPK sinyal yolağındaki proteinlerin fosforilasyonunu inhibe ederek sinerjistik etki gösterdiği ortaya konmuştur. Rapamisin ile cetuximabın kombinasyonu Hep G2 hücreleri aşılınmış farelerde önemli ölçüde hepatosellüler kanser (HCC) gelişimini baskıladı ve sağkalımı arttırdığı ortaya konmuştur. Cetuximab ve rapamisinin in vitro ve in vivo'da HCC büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur (Geng vd 2014). Cetuximaba dirençli insan kolon karsinoma hücrelerinin cetuximab ve 5-fluorourasile parental insan kolon karsinoma hücrelerinden daha az duyarlı oldukları gösterilmiştir (D'Angelo vd 2014). Bortezomib tek başına, epidermal büyüme faktörü (EGF) ile uyarılmış beş farklı baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom hücre dizilerinin (HNSCC) (A-431, Cal 27, Kyse 140, PJ 15, PE/CA-PJ 41) hiç birinde önemli bir antiproliferatif aktivite göstermezken bortezomib ve cetuximab kombinasyonunun oldukça önemli antitümör etkiye sahip olduğu 3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) ve laktat dehidrogenaz (LDH) testleri ile gösterilmiştir. Bu sonuçlar, cetuximabın EGF ile uyarılmış HNSCC hücre dizilerinde bortezomibin sitotoksik aktivitesini arttırdığını göstermiştir (Wagenblast vd 2008). Cetuximab tek başına 0.5 ve 5.0 µmol/L konsantrasyonlarında sekiz adet baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu hücre dizisine (PE/CA-PJ-15, PE/CA-PJ-34, PE/CA-PJ-41, PE/CA-PJ-49, Cal-27, Kyse-140 CLS-354 ve UM-SCC-14C) 24, 48 ve 72 saat uygulandığında, her iki konsantrasyonda kontrol grubuna göre oldukça önemli antiproliferatif etkiye sahip olduğu WST ve LDH deneyleri ile ortaya konmuştur. Cetuximab deksametazon (glukokortikoid) ile birlikte verildiğinde uygulama yapılmamış kontrol grubuna göre önemli antiproliferatif etki gösterdiği ortaya konmuştur (Wagenblast vd 2009a). Bir tirozin kinaz inhibitör çeşidi

olan afatinib ile cetuximab birlikte çift mutant EGFR eksprese eden K562 hücrelerine uygulandığında sitotoksitelerini sinerjistik olarak arttırdıkları ortaya konmuştur. Bu hücrelerde pro-apoptotik protein BIM'in uyarılmasıyla apoptozun gerçekleştiği gösterilmiştir. Cetuximabın hücre yüzeyi EGFR seviyesini azalttığı ve ayrıca afatinib ile kombine edildiğinde toplam EGFR seviyesini sinerjistik olarak azalttığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde (NSCLC) belirlenen afatinib ve cetuximabın sinerjistik etkisinin BIM'in uyarılması ve EGFR seviyesindeki değişiklikler ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Watanuki vd 2014). Cetuximabın tek başına 0.5 ve 5.0 µmol/L konsantrasyonlarında A-431 (epidermoid karsinom), PJ 15, PE/CA-PJ 41 ve Cal-27 (oral kavite karsinomu) ve Kyse-140 (özofagus karsinom) hücre dizilerinde önemli ölçüde aktivite gösterdiği MTT ve LDH testleri ile bulunmuştur. Cetuximab ile bortezomib kombinasyon halinde uygulandığında cetuximabın bortezomibin sitotoksik etkisini skuamöz hücreli karsinomu hücre dizilerinde arttırdığı gösterilmiştir (Wagenblast vd 2009b). İnsan kolorektal adenokarsinoma hücre dizilerinde (HT29 ve HCT116) insülin-benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF-1 R) tirozin kinaz inhibitörü (TKI)-NVP-AEW541'in, 5-Fluorouracil (5-FU), cetuximab ve beta-hidroksi-beta-metil-glutaril-koenzim A (HMG-CoA)-redüktaz inhibitörü fluvastatin ile kombine uygulandığında artmış antineoplastik etki gösterdiği LDH salınımındaki artışla ortaya konmuştur (Höpfner vd 2006). Sitostatiklerin cetuximab gibi EGFR inhibisyonu sağlayan ilaçlar ile birlikte kullanıldığında elde edilen artmış antineoplastik etkinin kesin mekanizması henüz net olmasa da EGF ve transforme edici büyüme faktörü (TGF)- α gibi EGFR ligandlarının kemoterapi uygulanmış kanser hücrelerinde önemli hayatta kalma faktörleri olduğu düşünülmektedir (Mendelsohn ve Fan 1997). Yukarıda bahsedilen çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar cetuximabın farklı antikanser ilaçları ile birlikte uygulanmasının tek başına uygulanmasından daha etkili olabileceğini göstermektedir. Fakat birlikte uygulama ile görülen artmış antineoplastik etkinin tüm kanser hücre çeşitlerinde gözlenmemesi de bu etkinin hücrelerin özelliklerine (p53 mutasyon durumu ve EGFR ligand seviyeleri gibi) göre değişebileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalarla cetuximabın hücre yüzeyi EGFR seviyesini azalttığı ve EGFR ile ilişkili sinyal iletim moleküllerinin fosforilizasyon durumlarını etkilediği gösterilmiştir. Çalıştığımız hücrelerde cetuximab tek başına ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte hücre yüzeyi EGFR seviyesini azaltmış veya EGFR ile ilişkili sinyal iletim moleküllerinin fosforilizasyon durumlarını değiştirerek etki göstermiş olabilir.

72 saat süreyle cetuximaba maruz bırakılan parental hücrelerinin glutatyon peroksidaz aktivitesinin kontrol grubu hücrelerine göre %21 oranında arttığı gözlenirken cetuximab ve epirubicin-HCl birlikte uygulandığında glutatyon peroksidaz aktivitesinin kontrol grubu hücrelerine göre %75 oranında arttığı bulunmuştur. Cetuximabın ve epirubicin-HCl'nin birlikte uygulandığı parental hücrelerdeki glutatyon peroksidaz aktivitesi tek başına cetuximab uygulanmış hücrelerdeki glutatyon peroksidaz aktivitesinden 1.4 kat daha fazla bulunmuştur. Tek başına cetuximab uygulanmış R-Hep G2 hücrelerinde ise glutatyon peroksidaz aktivitesinin kontrol grubu hücrelerine göre %56 oranında arttığı gözlemlenmiştir. Cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığı R-Hep G2 hücrelerindeki glutatyon peroksidaz aktivitesi sadece cetuximab uygulanmış hücrelerdeki glutatyon peroksidaz aktivitesinden yaklaşık olarak 1.5 kat daha fazla bulunmuştur. Kanser hücrelerinin uygulanan tedavi yöntemlerine

karşı farklı hassasiyetlerinin olması sahip oldukları antioksidan sistemlerindeki farklılıktan kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca epirubicin-HCl gibi antikanser ilaçlarına karşı hücrelerin ilaç direnci geliştirmeleri de diğer bir faktör olabilir. Antioksidan sistemleri hücreleri oksidatif hasarlara karşı korur. Glutasyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz kinonların elektron indirgemesi esnasında üretilen reaktif oksijen türlerinin etkilerinden hücreleri korurlar. Çeşitli tümörlerin ilaç direncinde etkili olan antioksidan ve detoksifikasyon mekanizmaları glutasyon, glutasyon peroksidaz ve glutasyon-S-transferazı (GST) gibi antioksidanları içerir. Çalışmamızda, cetuximabın hem tek başına hem de epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında bütün hücrelerde glutasyon peroksidaz aktivitesi artmıştır. Ancak, R-Hep G2 hücrelerindeki artışın P-Hep G2 hücrelerinden daha fazla olduğu gözlenmiştir. R-Hep G2 hücrelerindeki yüksek glutasyon peroksidaz aktivitesi cetuximab ve epirubicin-HCl'nin etkilerinden bu hücreleri koruyor olabilir. Ayrıca bu durum hücre tipine de özgü olabilir. Hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında glutasyon peroksidaz aktivitesinin cetuximabın tek başına uygulamasına göre daha yüksek olması epirubicin-HCl'nin güçlü oksidatif stres yaratma etkisinden kaynaklanıyor olabilir. Bir çalışmada oksidatif strese neden olan epirubicin-HCl'ye direnç geliştirmiş H1299 (insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre dizisi) hücrelerinin parental hücrelere göre daha yüksek glutasyon peroksidaz ve glutasyon-S-transferaz (GST) enzim aktivitelerine sahip oldukları gösterilmiştir (Ozkan 2007). Epirubicine-HCl'ye direnç geliştirmiş MCF-7 (insan meme tümörü hücre dizisi) hücrelerinde süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin parental hücrelere göre 3 kat, selenyum bağımlı glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesinin 13 kat ve glutasyon-S-transferaz aktivitesinin ise 12 kat daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca epirubicin-HCl'yi aktive ettiği bilinen NADPH-sitokrom P-450 redüktazın aktivitesi dirençli hücrelerde 2 kat daha yüksek bulunmuştur (Ozkan vd 2004). Hep G2 hücrelerindeki epirubicin-HCl'in sitotoksikite mekanizmasının serbest radikal türlerinin üretimi ile ilgili olduğu serbest radikal süpürme enzimleri olan SOD, katalaz ve Se bağımlı glutasyon peroksidazın aktivitelerindeki artışın gösterilmesiyle ortaya konmuştur. Western blot analizi ile kanser hücrelerinde bol miktarda eksprese edilen bir marker proteini olan GST-pi'nin ekspresyonunda azalma ve epirubicin-HCl'nin serbest bir radikale dönüşümünde önemli bir enzim olan NADPH-bağımlı sitokrom P450 redüktazın aktivitesinde artma olduğunu göstermiştir. Süperoksit dismutaz, katalaz ve glutasyon peroksidazın kinon içeren antikanser antibiyotiklerini azaltarak Hep G2 hücrelerinin hücre içi antioksidan savunma mekanizmasının parçaları oldukları bildirilmiştir (Ozkan ve Fişkin 2004). Sisplatin, epirubicin-HCl, metotreksat ve vindesin gibi sitotoksik ilaçların hiçbirinin M14K (insan plevral mezotelyoma) ve A549 (pulmoner adenokarsinom) hücrelerinde mangan süperoksit dismutaz (Mn SOD) protein düzeyine bir etkide bulunmadığı gösterilmiştir (Järvinen vd 2000). Yapılan başka bir çalışmada, M38K mezotelyoma hücrelerinin M14K hücrelerinden epirubicin-HCl'ye daha dirençli olduğu ve aynı zamanda Mn SOD ve katalaz aktivitelerinin ve mRNA seviyelerinin daha yüksek olduğu gösterilirken glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktaz seviyelerinin önemli ölçüde farklı olmadığı gösterilmiştir (Kahlos vd 1998). Hidrojen peroksit süpürücü antioksidan enzimlerinden olan Mn SOD ile bir detoksifikasyon enzimi olan glutasyon-S-transferaz aktivitelerinin ve glutasyon miktarının yüksek bulunması M38K hücrelerinin hidrojen peroksit ve epirubicin-HCl'ye yüksek direnç göstermelerini kısmen açıklamıştır (Kinnula vd 1998). Bir tirozin kinaz inhibitörü olan erlotinib tek ajan olarak oksidatif stresi uyarır ve buna NADPH

oksidaz 4 (NOX4) aracılık eder. NOX4'ün aracılık ettiği oksidatif stres erlotinibin sitotoksik etkisinden kanser hücrelerini koruyan otofaji adı verilen bir işlemi aktive eder ve otofajinin inhibisyonu hücreleri erlotinibe karşı *in vitro* duyarlı hale getirir. Bu çalışmalar, oksidatif stresin kanser kemoterapisinde ikili bir role sahip olabileceğini göstermiştir. Çeşitli ilaç uygulamalarında oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oksidatif hasara neden olabilecekleri ve bunun da hücre ölümünü tetikleyebileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte, reaktif oksijen türlerinin aynı zamanda strese karşı hücreleri koruyan otofajiyi aktive edebileceği ve tedavinin etkinliğinin azalmasına neden olabilecekleri de ortaya konmuştur. Bu nedenle otofajinin ve hidroperoksit metabolizmasının inhibe edilmesinin erlotinib sitotoksitesini arttırmak ve maksimum terapötik etki elde etmek için etkili bir tedavi yöntemi olabileceği önerilmiştir (Sobhakumari 2013). FaDu, Cal-27 ve SQ20B hücrelerine (HNSCC) 10 µmol/L erlotinib uygulandığında hidroperoksit üretimi ile oksidatif stresin uyarıldığı ve bozulmuş tiol metabolizmasının olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerde oksitlenmiş glutasyon (GSSG) oranının da arttığı görülmüştür. Erlotinib ile EGFR sinyalizasyonunun inhibisyonu tiyol metabolizmasında bozulmaları uyardığı ve sitotoksitenin oksidatif stres ile tutarlı olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar HNSCC hücrelerinde erlotinib ile uyarılmış sitotoksitenin artmış oksidatif stres ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. H₂O₂'in erlotinib tarafından uyarılan sitotoksite ve oksidatif strese yer aldığı fakat O₂⁻ yer almadığı gösterilmiştir. NOX4 aracılığı ile ROS üretiminin erlotinib tarafından uyarılan sitotoksiteden ve oksidatif stresten sorumlu olduğu ortaya konmuştur. NOX4 enzimi diğer NOX enzimlerinden H₂O₂ akışını arttıran tek NOX enzimi olmasıyla farklıdır (Orcutt vd 2011). Flavonoid olan kuersetin, fisetin and luteolinin hiçbiri parental HeLa hücrelerinde glutasyon (GSH) seviyesini değiştirmedeği ancak sisplatin dirençli HeLa (HeLa CK) hücrelerinde tüm flavonoidlerin GSH seviyesini arttırdığı gösterilmiştir. Bu etkinin hücre tipine özgü olabileceği bildirilmiştir. Sadece kuersetin ve luteolinin parental HeLa hücrelerinde glutasyon S transferaz aktivitesini arttırdığı gösterilirken ilaca dirençli HeLa hücrelerinde tüm flavonoidlerin aynı etkiyi gösterdiği bildirilmiştir. Flavonoidler ile uygulama sonrası görülen HeLa CK hücrelerindeki yüksek glutasyon-S-transferaz aktivitesinin ksenobiyotiklerden bu hücreleri koruyor olabileceğini göstermiştir (Durgo vd 2009). Yukarıda tartışılan çalışmalar glutasyon peroksidaz aktivite deneylerinden elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. Cetuximab gibi EGFR'ye hedeflendirilmiş olan erlotinib (tirozin kinaz inhibitörü) ve epirubicin-HCl gibi antikanser ilaçlarının çeşitli kanser hücrelerinde artmış oksidatif stres oluşturarak sitotoksik etki gösterdikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca uygulanan sitotoksik maddelerin parental ve ilaca dirençli hücrelerde antioksidan enzimlerin aktivitelerinde farklı değişikliklere neden olabilecekleri de ortaya konmuştur. R-Hep G2 hücrelerinde görülen daha fazla enzim aktivite artışı sitotoksik maddelerden bu hücreleri koruyor olabilir. Ayrıca parental ve ilaca dirençli hücrelerdeki glutasyon peroksidaz aktivitesindeki farklı artış hücrelerin ilaç dirençliliği ile de kısmen ilgili olabilir.

Çalışmamızda, apoptotik ölüm belirteçlerinden biri olan kaspaz-3/7 aktivitesi P-Hep G2 ve R-Hep G2 hücrelerinde ölçülmüştür. Apoptotik yolağın anahtar enzimlerinden biri olan kaspaz-3/7 aktivitesi 72 saatlik cetuximab uygulaması sonunda P-Hep G2 hücrelerinde kontrole göre 3 kat artarken cetuximab epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında yaklaşık olarak 4.7 kat artışın olduğu bulunmuştur. Cetuximab R-Hep G2 hücrelerinde kaspaz-3/7 aktivitesinde kontrole göre 1.5 kat artışa neden

olurken epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında yaklaşık olarak 2.5 kat artışa neden olmuştur. Her iki hücrede de birlikte uygulama tek başına cetuximab uygulamasına göre kaspaz-3/7 aktivitesini daha fazla arttırmıştır. Kaspaz-3, apoptoza giden hücrelerde gözlemlenen tipik morfolojik değişimlere neden olan iskelet proteinleri gibi anahtar hücrel proteinlerin parçalanmasından sorumludur. Bu nedenle, apoptozun kritik bir yürütücüsüdür. Birçok kemoterapötik madde apoptozu uyararak sitotoksik etkilerini gösterirler. Cetuximab ve bir siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibitörü olan celecoxib (CXB) kombinasyonunun kayda değer oranda apoptozu indüklediği ve ajanların tek başına uygulamalarına göre kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivitesini arttırdıkları gösterilmiştir (Qian vd 2014). Cetuximab, düşük yoğunluklu ultrason ile kombine uygulandığında iki farklı baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom (HNSCC) hücre dizisinde (HSC-3 ve HSC-4) kaspaz-3 aktivasyonunu cetuximab aracılı lizizi teşvik ederek arttırdığı bildirilmiştir. Ayrıca, kaspaz-3 aktivasyonunun cetuximabın ve düşük yoğunluklu ultrasonun tek uygulamalarına göre daha fazla arttığı belirtilmiştir (Masui vd 2013). 5-fluorouracil (5-FU), leucovorin ve oxaliplatin (FOLFOX) ile cetuximab kombine olarak SW480 (kolorektal kanser) hücrelerine 48 saat uygulandığında kaspaz-3 aktivasyonu için gerekli olan kaspaz-3 proteolitik parçalanmasının kontrollere göre arttığı gösterilmiştir (Roh vd 2012). İnsan baş ve boyun kanseri (UMSCC1) ksenograflarının gemsitabin ardından cetuximab uygulamasına, cetuximab ardınan gemsitabin uygulamasından anlamlı olarak daha iyi cevap verdikleri bildirilmiştir. İki uygulama programı arasında kaspaz-3 aktivitesi açısından anlamlı bir farklılık gözlenmediği ortaya konmuştur (Bhojani vd 2011). Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom tümörü taşıyan C3H farelerinde tümör büyümesinde en fazla gecikmeyi ve hayatta kalmada maksimum artışı üçlü ajan kombinasyon (cetuximab + bevacizumab + sisplatin) tedavisinde değil de bevacizumab artı sisplatin tedavisinde görüldüğü bildirilmiştir. Western Blot analizi ile parçalanmış kaspaz-3'ün arttığı gösterilmiştir. Dahası, parçalanmış kaspaz-3 ekspresyonunun maksimum seviyesi üçlü ajan kombinasyonunda bulunmayıp bevacizumab artı sisplatin grubunda bulunmuştur (Wang vd 2010). DR4'e spesifik insan agonist monoklonal antikor olan mapatumumab ile epirubicin-HCl kombinasyon halinde insan mesane kanseri hücrelerine (T24, KU7 ve RT112) uygulandığında sinerjik sitotoksik etki göstermişlerdir. Sitotoksitede elde edilen sinerjinin apoptozda da elde edildiği bildirilmiştir. Epirubicin-HCl ve mapatumumab kombinasyonunun ölüm reseptörlerinin aşağı yöndeki molekülleri olan kaspaz-8, -9 ve -3'ü belirgin bir şekilde aktive ettiği gösterilmiştir (Ahmed vd 2015). Sun ginseng'in önemli ölçüde epirubicin-HCl ve paklitakselin antikanser aktivitelerini sinerjistik bir şekilde insan servikal adenokarsinoma hücreleri olan HeLa ve insan kolon kanseri hücreleri olan SW111C ve SW480'de arttırdığı gösterilmiştir. Bu etkiler hem Bax'ın hem de Bak'ın artmış mitokondriyal birikimi ile ilişkili olduğu ve bu durumun artmış sitokrom c salınımına, kaspaz-9/-3 aktivasyonuna ve apoptoza yol açtığı gösterilmiştir (Lin vd 2015). İnsan hepatoma hücresi dizisi HA22T/VGH epirubicin-HCl ile muamele edildiğinde reaktif oksijen türleri ve nitrik oksit üretimi, Fas, FasL ve Fas-ilişkili ölüm domaini ekspresyonu ve kaspaz-8 ve kaspaz-3 aktivitelerinin arttığı ortaya konmuştur. Epirubicin-HCl uygulaması ayrıca apoptozun uyarılması ile sonuçlanan glutatyon miktarında da azalmaya neden olmuştur. HA22T/VGH hücreleri progesteron ve epirubicin-HCl ile birlikte muamele edildiğinde, epirubicin-HCl'nin etkilerinin arttığı gösterilmiştir (Chang vd 2014b). Bir bitki izoflavonu olan formononetin (7-hidroksi-4'-methoxyi-soflavone) önemli ölçüde epirubicin-HCl sitotoksitesini insan servikal kanser hücre dizisi HeLa'da arttırdığı gösterilmiştir.

Epirubicin-HCl ile formononetinin birlikte uygulanması hidrojen peroksit ve süperoksit serbest radikallerini içeren reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyelerini arttırmıştır. Epirubicin-HCl tek başına çoklu ilaç direnci (MDR) 1, MDR-ilişkili protein (MRP) 1 ve MRP2'nin mRNA'sını belirgin olarak arttırdığı ortaya konmuştur. Bunun tersi olarak, formononetin tek başına ya da kombine uygulandığında MRP1 ve MRP2 mRNA ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Kombine uygulama mitokondriyal apoptotik yolu, Bax/Bcl-2 ekspresyon oranını, mitokondriyal membran potansiyel kaybını ve kaspaz-9 ve -3'ün aktivasyonunu arttırarak tetiklediği ortaya konmuştur (Lo ve Wang 2013). Domuz aort endotelial hücrelerine (PAECs) epirubicin-HCl (3-30 µM) uygulandığında hücre canlılığının konsantrasyona ve zamana bağlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Epirubicin-HCl kaspaz-3/7 aktivitesini, apoptotik hücreleri ve intrasellüler lipid peroksit seviyesini arttırdığı ve aynı zamanda mitokondriyal membran depolarizasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (Yamada vd 2012). Epirubicin-HCl ve bir tirozin kinaz reseptör inhibitörü olan sunitinib birlikte fare mesane tümör hücreleri olan MBT-2'lere uygulandıklarında sinerjistik sitotoksik etki gösterdikleri ortaya konmuştur. MBT-2 hücrelerinde apoptoz yolağının aktivasyonu parçalanmış kaspaz-3'ün ve poli (ADP-riboz) polimerazın (PARP) artması ile doğrulanmıştır (Wu vd 2012). Yukarıda tartışılan çalışmalar kaspaz-3/7 aktivite deneylerinden elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir. Hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde tek başına cetuximab uygulaması hücre lizisine neden olarak kaspaz-3/7 aktivasyonunu arttırmış olabilir. Kombine uygulamada kullanılan epirubicin-HCl, reaktif oksijen türleri ve nitrik oksit üretimini, Fas, FasL ve Fas-ilişkili ölüm domaini ekspresyonunu arttırarak kaspaz-3/7 aktivite artışına katkı yapmış olabilir.

Antiproliferatif etkiyi ortaya koyan ve DNA polimeraz bileşenlerinden biri olup replikasyonda görev alan proliferasyon hücre nükleer antijeninin (PCNA) ve hücre döngüsünü durdurucu etkiyi ortaya koyan ve hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişinde aktive olan siklin D1 genlerinin mRNA ekspresyonlarına RT-PCR ile bakılmıştır. P-Hep G2 hücrelerinde PCNA ve siklin D1 ekspresyonlarının azalmasında tek başına cetuximab uygulamasının daha etkili olduğu görülürken R-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasının daha etkili olduğu görülmüştür. Hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulaması tek başına cetuximab uygulamasına göre pro-apoptotik bir gen olan Bax mRNA ekspresyonunu arttırmada daha etkili olduğu bulunmuştur. Cetuximab epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında anti-apoptotik bir gen olan Bcl-2 ekspresyonu hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde tek başına cetuximab uygulamasına göre daha fazla azalmıştır. Dolayısıyla, hem tek başına cetuximab uygulaması hem de cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulaması her iki hücrede Bax/Bcl-2 oranında artışa neden olmuştur. Cetuximabın tek başına ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte uygulanması sonucu bu oranın hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde artması her iki uygulamanın bu hücrelerde apoptozu uyardığını göstermiştir. Bir çalışmada, sorafenibin EGFR inhibitörleri olan gefitinib ve erlotinib ile sinerjistik olarak hepatoma hücresi olan Hep 3B hücrelerinde PCNA ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Ezzoukhry vd 2012). Kutanöz skuamöz hücreli karsinomlu farelerde cetuximab uygulamasının PCNA ekspresyonunu azalttığı ortaya konmuştur (Galer vd 2011). Oral skuamöz hücreli karsinom hücre dizisi olan HSC3'de tek başına cetuximab uygulamasının PCNA ekspresyonunu kontrol hücrelerine göre değiştirmede ancak genistein (izoflavon ve

güçlü bir protein tirozin kinaz inhibitörü) ile birlikte uygulamasının PCNA ekspresyonunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Park vd 2010). Anaplastik tiroid kanserli farelerde bevacizumab ve cetuximabın hem tek başına hem de kombine uygulamalarının PCNA ekspresyonunda azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Prichard vd 2007). Cetuximab uygulanmış primer kolon karsinoma ve lenfatik ve hepatik metastaz ksenograft modellerinde PCNA ekspresyonunun baskılandığı ortaya konmuştur (Dong vd 2012). Cetuximab ve icotinib (EGFR tirozin kinaz inhibitörü) H1975 (NSCLC) tümörü ksenograftlarına kombine uygulandıklarında PCNA ekspresyonunu azalttıkları gösterilmiştir (Wang vd 2014). Oral skuamöz hücreli karsinoma (OSCC) ksenograftlarına cetuximab ve paclitaxel kombine uygulandığında PCNA ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Park 2009).

Cetuximabın Hep G2 hücrelerinde siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) p21^{Waf1/CIP1} ve p27^{Kip1}'in ifadesinde artışa neden olduğu ve bununla hücre döngüsünün G1/G0 fazında tutulmasını uyardığı ortaya konmuştur. Bununla birlikte siklin D1 ekspresyonunda azalmaya neden olduğu da gösterilmiştir. Kaspaz 3 aktivasyonuna neden olarak apoptoz da ılımlı bir artışa neden olduğu ortaya konmuştur (Huether vd 2005). Baş ve boyun skuamöz hücreli karsinoma (HNSCC) hücre dizisi olan Fadu hücrelerine cetuximab tek başına ve celecoxib (COX-2'nin seçici bir inhibitörü) ile birlikte uygulandığında siklin D1 protein seviyesinin azaldığı ve kombine uygulamanın tek başına uygulamaya göre siklin D1 protein seviyesini azaltmada daha etkili olduğu gösterilmiştir (Yang vd 2015). c-myc, Bcl-2, Bcl-XL ve siklin D1 gen ekspresyonlarının cetuximab uygulaması ile HNSCC hücre dizisinde (BB49) değişmediği ve ayrıca RAS'ın aktive olmasının cetuximaba dirençte önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir (Rampias vd 2014). Mide kanseri hücre dizileri olan SGC-7901 ve MKN-45 hücrelerine cetuximab ve irinotecan birlikte uygulandığında siklin D1 ekspresyonunun inhibe edildiği gösterilmiştir (Liu vd 2011). Yukarıda tartışılan çalışmalar PCNA ve siklin D1 RT-PCR sonuçlarımızı desteklemektedir. Cetuximabın çeşitli hücrelerde PCNA ve siklin D1 ekspresyonlarının azalmasına neden olduğu fakat bazı hücrelerde de PCNA ve siklin D1 ekspresyonlarına herhangi bir etkisinin olmadığı yapılan farklı çalışmalarla gösterilmiştir. Bu da cetuximabın PCNA ve siklin D1 ekspresyonlarına etkisinin hücre tipine göre değişebileceğini göstermektedir. Çalışmamızda tek başına cetuximab uygulamasının P-Hep G2 hücrelerinde kombine uygulamaya göre PCNA ve siklin D1 ekspresyonlarının azalmasında daha etkili olduğu görülürken R-Hep G2 hücrelerinde kombine uygulamanın daha etkili olduğu görülmüştür. Bu sonuç iki hücre çeşidi arasındaki ilaç dirençliliği farkından kaynaklanıyor olabilir. Tek başına cetuximab uygulamasına göre cetuximabın başka ilaçlar ile birlikte uygulamasının PCNA ve siklin D1 ekspresyonlarının azalmasında daha etkili olabileceği de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Cetuximab radyoterapi ve hipotermi ile birlikte insan nazofarenks karsinoma hücre dizisi CNE hücrelerine uygulandığında Bax ekspresyon seviyesi artarken Bcl-2 ekspresyon seviyesinin azaldığı bununla yüksek Bax/Bcl-2 oranına neden olduğu gösterilmiştir (Liu vd 2015). Paclitaxel dirençli insan özofagus skuamöz karsinomu (ESCC) hücreleri parental hücrelere göre morfolojide, proliferasyon hızında, doubling süresinde, hücre döngüsü dağılımında ve koloni oluşum oranında değişiklikler göstermiştir. İlaça dirençli hücrelerde Bcl-2, prokaspaz-3 ve P-gp proteininin aşırı eksprese olduğu ve Bax ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Wang vd 2013). Baş ve

boyun skuamöz hücreli karsinomlu farelere bevacizumab, cetuximab ve cisplatin üçlü olarak kombine uygulandığında Bcl-2 ekspresyonunun azaldığı ancak Bax ekspresyon seviyesinin değişmediği bulunmuştur (Wang vd 2010). İnsan kolon adenokarsinom hücre dizisi Caco-2 hücrelerine epirubicin-HCl uygulandığında p53, Bax, kaspaz-3 ve -9 ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir (Lo ve Liu 2014). Bir başka çalışmada epirubicin-HCl HA22T/VGH (hepatosellüler karsinom) hücrelerinde anti-apoptotik protein Bcl-XL seviyesinde azalmaya neden olurken progesteronun hiçbir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. Epirubicin-HCl ve progesteron birlikte uygulandığında ise epirubicin-HCl'nin tek başına uygulamasına göre daha fazla Bcl-XL protein seviyesinde azalmaya neden olduğu ortaya konmuştur. Progesteron pro-apoptotik protein Bax seviyesinde herhangi bir değişikliğe neden olmazken epirubicin-HCl tek başına Bax seviyesinde azalmaya neden olmuştur. Epirubicin-HCl ve progesteron birlikte uygulandığında ise Bax seviyesindeki azalmanın epirubicin-HCl'nin tek başına uygulamasından daha az olduğu gösterilmiştir. Pro-apoptotik/anti-apoptotik faktör oranının (Bax/Bcl-XL), kombine uygulama ile son derece artmış olduğu bildirilmiştir (Chang vd 2014a). Epirubicin-HCl'nin HeLa hücrelerinde Bax/Bcl-2 oranını arttırdığı ortaya konmuştur (Lo ve Wang 2013). Epirubicin-HCl'nin Caco-2 (insan kolon adenokarsinoma) hücrelerinde kaspaz-3, -8 ve 9'un yanı sıra p53 ve Bax'ın mRNA seviyesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Epirubicin-HCl, 8-hydroxydaidzein (fermente soya tohumu koji'den izole edilen izoflavon) ile birlikte uygulandığında epirubicin-HCl'nin tek başına uygulamasına göre kaspaz-3, -8 ve 9, p53 ve Bax'ın mRNA seviyesinde daha fazla artışa neden olduğu ortaya konmuştur. Bütün bu uygulamalar Bcl-2 ekspresyonunda da azalmaya neden olup Bax/Bcl-2 oranında artışa neden olmuştur (Lo 2013). Epirubicin-HCl, 7,3',4'-trihidroksiizoflavon (daidzeinin başlıca metabolitlerden biri) ile HeLa (insan servikal kanseri) hücrelerine kombine uygulandığında epirubicin-HCl'nin tek başına uygulamasına göre kaspaz-3, kaspaz 9, p53 ve Bax'ın ekspresyonunda daha fazla artışa neden olduğu gösterilmiştir. Bütün bu uygulamalar Bax/Bcl-2 oranında artışa neden olmuştur ancak kombine uygulamadaki artışın daha fazla olduğu gözlenmiştir (Lo vd 2012). TRAIL-R2'ye karşı bir insan agonist monoklonal antikoru olan lexatumumab ile epirubicin-HCl renal hücre karsinoma hücrelerine (RCC) kombine uygulandığında Bax mRNA seviyesinin arttığı gösterilmiştir (Jin vd 2012). HT1376 ve MCR (insan mesane kanseri) hücrelerine epirubicin-HCl uygulanmasının Bax ve Bcl-2 ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmadığı bulunmuştur (Zoli vd 2004). Bcl-2 antisens oligonükleotid (G3139) ile epirubicin-HCl PC-3 prostat kanseri hücrelerine birlikte uygulandıklarında belirgin bir şekilde Bcl-2 mRNA ve protein seviyesinin azaldığı gösterilmiştir (Jiang vd 2011). Bir safra asidi olan glikolik asit (GC) ile epirubicin-HCl Caco-2 insan kolon adenokarsinoma hücrelerine birlikte uygulandıklarında Bcl-2 mRNA ifadesini baskıladıkları, Bax mRNA ekspresyonunu uyardıkları ve Bax/Bcl-2 oranını ve p53, kaspaz-9 ve -3'ün mRNA seviyelerini önemli ölçüde arttırdıkları ortaya konmuştur (Lo vd 2008). GEO-kolon kanserli farelerde cetuximab uygulamasının Bcl-2 protein miktarının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (Damiano vd 2006). Fare GEO kolon adenosarkinoma hücre tümör ksenograftları 14 hafta boyunca cetuximaba maruz bırakıldıktan sonra elde edilen GEO-C225-RES hücrelerindeki Bcl-2 ekspresyonu insan GEO kolon adenosarkinoma hücreleri ile karşılaştırıldığında herhangi bir değişikliğin olmadığı gözlemlenmiştir (Ciardiello vd 2004). NSCLC hücre dizileri olan A549 ve H1299 hücrelerine cetuximab tek başına ve altın nanopartikülleri (AuNP) ile birlikte uygulandığında tek başına cetuximab uygulaması Bcl-2 protein seviyesini

değiştirmezken kombine uygulama Bcl-2 protein seviyesini azaltmıştır (Qian vd 2014). Yukarıda tartışılan çalışmalar Bax ve Bcl-2 RT-PCR sonuçlarımızı desteklemektedir. Cetuximab ve epirubicin-HCl'nin çeşitli hücrelerde Bax/Bcl-2 oranında artışa neden oldukları fakat bazı hücrelerde de herhangi bir değişikliğe neden olmadıkları yapılan farklı çalışmalarla gösterilmiştir. Bu da cetuximab ve epirubicin-HCl'nin Bax ve Bcl-2 ekspresyonlarına etkilerinin hücre tipine göre değişebileceğini göstermektedir. Çalışmamızda kombine uygulamanın hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde tek başına cetuximab uygulamasına göre Bax ekspresyonunun artmasında ve Bcl-2 ekspresyonunun azalmasında daha etkili olduğu bulunmuştur. Yukarıda tartışılan çalışmalarda cetuximabın farklı maddeler ile birlikte uygulamasının tek başına uygulamasına göre Bax/Bcl-2 oranında daha fazla artışa neden olduğunu göstermiştir.

Çalışmamız, parental Hep G2 hücreleri ile epirubicin-HCl dirençli Hep G2 hücrelerinin tek başına cetuximab uygulamasına ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasına verdikleri cevapların farklılığını ortaya koyan ilk bilimsel çalışmadır. P-Hep G2 hücrelerinin cetuximabın tek başına ve ayrıca epirubicin-HCl ile birlikte uygulamalarına R-Hep G2 hücrelerinden daha duyarlı olduğu bulunmuştur. Cetuximab ile epirubicin-HCl'nin birlikte uygulaması tek başına cetuximab uygulamasına göre hem P-Hep G2 hem de R-Hep G2 hücrelerinde sitotoksik etkiyi arttırması, bu kombine uygulamanın, epirubicin-HCl gibi konvansiyonel ilaçlara veya cetuximaba karşı direnç gösteren kanser hücreleri için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ışık olabileceğini göstermiştir. Her iki hücre çeşidinde birlikte uygulamanın tek başına uygulamadan laktat dehidrogenaz (LDH), glutatyon peroksidaz ve kaspaz 3/7 aktivitelerini arttırmada daha etkili olduğu görülmüştür. Tek başına cetuximab uygulamasının kombine uygulamaya göre P-Hep G2 hücrelerinde daha fazla antiproliferatif ve hücre döngüsünü durdurucu etkiye sahip olduğu görülürken R-Hep G2 hücrelerinde kombine uygulama daha etkili bulunmuştur. Hem cetuximabın tek başına hem kombine uygulaması her iki hücrede pro-apoptotik bir gen olan Bax ekspresyonunu arttırmış anti-apoptotik bir gen olan Bcl-2 ekspresyonunu ise azaltmıştır. Dolayısıyla her iki uygulama bu hücrelerde Bax/Bcl-2 oranında artışa neden olduğu bulunmuştur. Bu da hem cetuximabın tek başına hem kombine uygulamasının her iki hücrede apoptozu uyardığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar parental ve ilaca dirençli hücrelerin tedavisinde farklı stratejilerin izlenmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. İlaça dirençli hücreler için mevcut tedavilerin yeterli olamayabileceğinden dolayı tedaviye farklı etki mekanizmasına sahip yeni ilaçların eklenmesi gibi çözümler üretilebilir. Cetuximabın hücre çeşidine göre farklı etkiler göstermesi, hücrelerin sahip olduğu EGFR, IGFR ve p53 ekspresyon seviyesine ve mutasyon durumuna göre değişiyor olabilir. Bu yüzden cetuximab ile tedavi edilecek hastaların mutasyon durumlarının bilinmesi klinik fayda sağlanmasında yararlı olacaktır. Günümüzde cetuximab gibi moleküler hedefli ilaçların kullanılacağı hasta popülasyonlarının belirlenmesinde kullanılacak biyobelirteçler son derece az ve yetersizdir. Bu biyobelirteçlerin belirlenmesini sağlayacak çalışmalar son derece önemli ve ilgi çekicidir. İleriki dönemlerde yapılacak bu çalışmalardan elde edilecek sonuçlar doğrultusunda doğru hasta popülasyonlarında bu ilaçların kullanılması ile daha yüksek tedavi cevap oranları elde edilebilir ve ayrıca tedavide de ekonomik yönden oldukça kazanç sağlanabilir.

Bunlara ek olarak, karaciğer kanseri patogenezi anlayışımız hala çok temeldir. Şimdiye kadar aydınlatılmış genomik değişiklikler HCC'nin başlaması ve ilerlemesi için gerekli olan anahtar vuruşların çok küçük bir kısmını temsil etmektedir. Uluslararası konsorsiyumların oluşturduğu multidisipliner çalışmalar elde edilen klinik verilerin analiz edilmesi için gereklidir. Yeni yüksek verimli teknolojiler sayesinde yapılan çalışmalarla tedavi için yeni hedef onkogenler belirlenebilecektir. İnsanlarda bilinen hepatokarsinogenik anormalliklere neden olan spesifik mutasyonları veya onkojenik bağımlı döngüleri hedefleyen yeni bileşiklerin geliştirilmesi gerekmektedir. HCC kök hücre dizileri, yeni ilaçların test edilmesi için geliştirilmelidir. Erken ve geç dönem klinik çalışmalar yeni bileşiklerin belirlenmesi için tasarlanmalıdır.



6. SONUÇ

Bu çalışmada Cell Titer-Blue^R Hücre Canlılığı ve Laktat Dehidrogenaz (LDH) testleri ile epidermal büyüme faktörü reseptörüne hedeflendirilmiş bir monoklonal antikor olan cetuximabın tek başına ve klasik bir kemoterapötik ajan olan epirubicin-HCl ile birlikte parental karaciğer kanseri hücreleri (P-Hep G2) ve epirubicin-HCl dirençli karaciğer kanseri (R-Hep G2) hücreleri üzerine sitotoksik etkisi araştırılmış ve birlikte uygulamanın hem P-Hep G2 hem de R-Hep G2 hücrelerinde tek başına uygulamaya göre sitotoksik etkiyi arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca epirubicin-HCl dirençli (ilaca dirençli) Hep G2 hücrelerine 72 saat cetuximab uyguladıktan sonra elde ettiğimiz sonuçlara göre hesapladığımız IC₅₀ konsantrasyonunun parental hücreler için hesaplanandan daha yüksek olması ilaca dirençli hücrelerin cetuximaba karşıda çapraz direnç gösterdiklerini ortaya koymuştur. Cetuximab ve epirubicin-HCl birlikte uygulandığında glutatyon peroksidaz aktivitesindeki artışın cetuximabın tek uygulamasına göre daha fazla olması birlikte uygulamanın her iki hücrede artmış oksidatif strese neden olduğunu ortaya koymuştur. Benzer şekilde birlikte uygulamanın her iki hücrede tek uygulamaya göre kaspaz 3/7 aktivitesinde daha fazla artışa neden olarak apoptozu uyarmada daha etkili olduğu gösterilmiştir. PCNA ve siklin D1 genlerinin mRNA ekspresyonlarının azalmasında P-Hep G2 hücrelerinde tek başına cetuximab uygulamasının daha etkili olduğu görülürken R-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasının daha etkili olduğu görülmüştür. Bu durumda hücrelerin ilaç dirençliliğine göre uygulamalara farklı cevaplar verebileceğini göstermiştir. Hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulamasının tek başına cetuximab uygulamasına göre pro-apoptotik bir gen olan Bax mRNA ekspresyonunu arttırmada daha etkili olduğu bulunmuştur. Cetuximab epirubicin-HCl ile birlikte uygulandığında anti-apoptotik bir gen olan Bcl-2 ekspresyonu hem P-Hep G2 hücrelerinde hem de R-Hep G2 hücrelerinde tek başına cetuximab uygulamasına göre daha fazla azalmıştır. Dolayısıyla, hem tek başına cetuximab uygulaması hem de cetuximabın epirubicin-HCl ile birlikte uygulaması her iki hücrede Bax/Bcl-2 oranında artışa neden olmuştur.

Cetuximabın tek başına ve epirubicin-HCl ile birlikte parental ve ilaca dirençli insan hepatosellüler Hep G2 hücrelerine ilk defa uygulandığı bu çalışmadan elde edilen sonuçlar cetuximabın kullanıldığı kombinasyon tedavilerinin gelecekteki klinik araştırmaları için bir gerekçe sağlayabilir. Klinik araştırmalar sonucu kombinasyonda tek uygulamaya göre daha düşük dozlarda cetuximab kullanılması sağlanarak deri kızarıklığı gibi cetuximabın yan etkileri azaltılabilir veya ortadan kaldırılabilir. Ayrıca tedaviden daha fazla cevap alınması başarılar ekonomik yönden hastaların yükünün hafifletilmesi sağlanabilir. Dolaylı olarak da ülke ekonomisine kazanç sağlanabilir. Çalışmamızın parental ve ilaca dirençli hücrelerin ilaç uygulamalarına farklı cevaplar verdiğini göstermesi kanser tedavisinde uygulanacak yeni stratejilerin belirlenmesinde yol gösterici olabilir.

7. KAYNAKLAR

- ADAMS, J.M. and CORY, S. 1998. The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science*, 281: 1322-1326.
- AGGARWAL, B.B. 2000. Tumor necrosis factor receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kB. *Ann. Rheum. Dis.*, 59: 6-16.
- AHMED, S.M., WU, X., JIN, X., ZHANG, X., TOGO, Y., SUZUKI, T., LI, Y., KANEMATSU, A., NOJIMA, M., YAMAMOTO, S., SUGIMOTO, M. and KAKEHI, Y. 2015. Synergistic induction of apoptosis by mapatumumab and anthracyclines in human bladder cancer cells. *Oncol. Rep.*, 33 (2): 566-572.
- AKKUS, I. 1995. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. Mimoza Yayınları, 38, Kuzucular Ofset, Konya-Türkiye.
- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. and WALTER, P. 2002. Molecular biology of the cell, Gerlande science Newyork.
- ALTUĞ, M. 2009. Sağlıklı erişkinlerde fiziksel aktivitenin eritrosit ve plazmadaki oksidan/antioksidan parametreler üzerine olan etkilerinin belirlenmesi ve yüksek antioksidan özelliği olduğu bilinen nar suyunun bu parametreler üzerine olan etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, 51 s.
- AMADO, R.G., WOLF, M., PEETERS, M., VAN CUTSEM, E., SIENA, S., FREEMAN, D.J., JUAN, T., SIKORSKI, R., SUGGS, S., RADINSKY, R., PATTERSON, S.D. and CHANG, D.D. 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.*, 26: 1626-1634.
- ANONİM 1. www.karacigernakliturkiye.com. [Son erişim tarihi: 11.10.2015]
- ANONİM 2. www.mini-tab.com/products/mini-tab. [Son erişim tarihi: 09.12.2015]
- ANONİM 3. www.tkd.org.tr. [Son erişim tarihi: 20.09.2015]
- ANONİM 4. www20.uludag.edu.tr/~eulukaya. [Son erişim tarihi: 25.09.2015]
- ARI, B. 2008. p53 yolağında yer alan MDM2 ve p53 genlerinde görülen tek nükleotid polimorfizimlerinin meme kanserli hastalarda araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, 73 sayfa.
- ARTEAGA, C.L. 2002. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression. *Oncologist*, 7: 31-39.
- ARTEEL, G.E. and SIES, H. 2001. The biochemistry of selenium and the glutathione system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 10: 153-158.

- AYDIN, A., SAYAL, A. ve İŞİMER, A. 2001. Serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemi. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ayın Kitabı.
- BABIOR, B.M. 2000. Phagocytes and oxidative stres. *Am J Med*, 109 (1): 33-44.
- BARNES, P.J. 2004. Alveolar Macrophages as orchestrators of COPD. *J. Copd.*, 1: 59-70.
- BASELGA, J. 2001. The EGFR as a target for anticancer therapy-focus on cetuximab. *Eur. J. Cancer.*, 37: 16-22.
- BASELGA, J. and ARTEAGA, C.L. 2005. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J. Clin. Oncol.*, 23: 2445-2459.
- BEAUGRAND, M., SALA, M. and DEGOS, F. 2005. Treatment of advanced hepatocellular carcinoma by seocalcitol: an international randomized double-blind placebocontrolled study in 747 patients. *J. Hepatol.*, 42: 17A.
- BEERAM, M. and PATNAIK, A. 2002. Targeting intracellular signal transduction. *Hematol. Oncol. Clin. North Amer.*, 16: 1089-1100.
- BELLAMY, C.O., MALCOMSON, R.D., HARRISON, D.J. and WYLLIE, A.H. 1995. Cell death in health and disease: The biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology*, 6: 3-16.
- BERMAN, J.J. 1988. Cell proliferation and the aetiology of hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 7: 305-309.
- BERTHIAUME, J.M. and WALLACE, K.B. 2007. Adriamycin-induced oxidative mitochondrial cardiotoxicity. *Cell Biol. Toxicol.*, 23: 15-25.
- BHOJANI, M.S., NYATI, M.K., ZHAO, L., NORMOLLE, D.P., ROSS, B.D., LAWRENCE, T.S. and REHEMTULLA, A. 2011. Molecular imaging of akt enables early prediction of response to molecular targeted therapy. *Transl Oncol*, 4 (3): 122-125.
- BICKNELL, R. and HARRIS, A.L. 1992. Anticancer strategies involving the vasculature: vascular targeting and the inhibition of angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.*, 3: 399-407.
- BIJWAARD, K.E., AGUILERA, N.S.I., MONCZAK, Y., TRUDEL, M., TAUBENBERGER J.K., JACK, H. and LICHY, J.H. 2001. Quantitative real-time reverse transcription-PCR assay for cyclin D1 expression: Utility in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Clinical Chemistry*, 47: 195-201.
- BIRNBAUM, A., DIPETRILLO, T. RATHORE, R., ANDERSON, E., WANEBO, H., PUTHWALA, Y., JOYCE, D., SAFRAN, H., HENDERSON, D., KENNEDY, T., READY, N. and SIO, T.T. 2010. Cetuximab, paclitaxel,

carboplatin, and radiation for head and neck cancer: a toxicity analysis. *Am. J. Clin. Oncol.*, 33 (2): 144-147.

BLANEY, J.E., MATRO J.M., MURPHY, B.R. and WHITEHEAD, S.S. 2005. Recombinant, live-attenuated tetravalent dengue virus vaccine formulations induce a balanced, broad, and protective neutralizing antibody response against each of the four serotypes in rhesus Monkeys. *Journal of Virology*, 79: 5516-5528.

BLICK, S.K. and SCOTT, L.J. 2007. Cetuximab: a review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck and metastatic colorectal cancer. *Drugs*, 67: 2585-607.

BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E. and FAGERSTEDT, K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: A review. *Ann. Bot.*, 91: 179-194.

BLUMENSCHNEIN, G.R. PAULUS, R., CURRAN, W.J., ROBERT, F., FOSSELLA, F., WERNER-WASIK, M., HERBST, R.S., DOESCHER, P.O., CHOY, H. and KOMAKI, R. 2011. Phase II study of cetuximab in combination with chemoradiation in patients with stage IIIA/B Non-Small-Cell Lung Cancer: RTOG 0324. *J. Clin. Oncol.*, 29: 2312-2318.

BOKEMEYER, C., BONDARENKO, I., HARTMANN, J.T., DE BRAUD F.G., VOLOVAT, C., NIPPGEN, J., STROH, C., CELIK, I. and KORALEWSKI, P. 2008. KRAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J. Clin. Oncol.*, 26: 4000.

BONNER, J.A., HARARI, P.M., GIRALT, J. AZARNIA, N., SHIN, D.M., COHEN, R.B., JONES, C.U., SUR, R., RABEN, D., JASSEM, J., OVE, R., KIES, M.S., BASELGA, J., YOUSOUFIAN, H., AMELLAL, N., ROWINSKY, E.K. and ANG, K.K. 2006. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.*, 354: 567-578.

BONNER, J.A., HARARI, P.M., GIRALT, J., AZARNIA, N., SHIN, D.M., COHEN, R.B., JONES, C.U., SUR, R., RABEN, D., JASSEM, J., OVE, R., KIES, M.S., BASELGA, J., YOUSOUFIAN, H., AMELLAL, N., ROWINSKY, E.K. and ANG, K.K. 2006. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.*, 354: 567-578.

BORST, P., EVERS, R., KOOL, M. and WIJNHOLDS, J. 2000. A family of drug transporters: The multi-drug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer. Inst.*, 92: 1295-1302.

BOSETTI, C., TURATI, F. and LA VECCHIA, C. 2014. Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 28: 753-770

- BOYBAULT, S., RICKMAN, D.S., DE REYNIÈS, A., BALABAUD, C., REBOUSSOU, S., JEANNOT, E., HÉRAULT, A., SARIC, J., BELGHITI, J., FRANCO, D., BIOULAC-SAGE, P., LAURENT-PUIG, P. and ZUCMAN ROSSI, J. 2007. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*, 45: 42-52.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
- BRANDA, M. and WANDS, J.R. 2006. Signal transduction cascades and hepatitis B and C related hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 43: 891-902.
- BREUHAHN, K., VREDEN, S., HADDAD, R., BECKEBAUM, S., STIPPEL, D., FLEMMING, P., NUSSBAUM, T., CASELMANN, W.H., HAAB, B.B. and SCHIRMACHER P. 2004. Molecular profiling of human hepatocellular carcinoma defines mutually exclusive interferon regulation and insulin-like growth factor II overexpression. *Cancer Res.*, 64: 6058-6064.
- BRUIX, J. and LLOVET, J.M. 2009. Major achievements in hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 21: 373 (9664): 614-616.
- BRUIX, J. and SHERMAN, M. 2005. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 42: 1208-1236.
- BRUIX, J., BOIX, L., SALA, M. and LLOVET, J.M. 2004. Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, 5: 215-219.
- BUCKLEY, A.F., BURGART, L.J., SAHAI, V. and KAKAR, S. 2008. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in conventional hepatocellular carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*, 129 (2): 245-251.
- BUDHU, A., FORGUES, M., YE, Q.H., JIA, H.L., HE, P., ZANETTI, K.A., KAMMULA, U.S., CHEN, Y., QIN, L.X., TANG, Z.Y. and WANG, X.W. 2006. Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. *Cancer Cell*, 10: 99-111.
- BURLACU, A. 2003. Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *J. Cell Mol. Med.*, 7: 249-257.
- CALVISI, D.F., LADU, S., GORDEN, A., FARINA, M., CONNER, E.A., LEE, J.S., FACTOR, V.M. and THORGEIRSSON, S.S. 2006. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. *Gastroenterology*, 130: 1117-1128.

- CAMAGGI, C.M., STROCCHI, E., TAMASSIA, V., MARTONI, A., GIOVANNINI, M., IAFELICE, G., CANOVA, N., MARRARO, D., MARTINI, A. and PANNUTI, F. 1982. Pharmacokinetic studies of 4'-epi-doxorubicin in cancer patients with normal and impaired renal function and with hepatic metastases. *Cancer Treat. Rep.*, 66: 1819-1824.
- CAMPOLI, M., FERRIS, R., FERRONE, S. and WANG, X. 2010. Immunotherapy of malignant disease with tumor antigen-specific monoclonal antibodies. *Clin Cancer Res.*, 16: 11-20.
- CARPENTER, G. and COHEN, S. 1990. Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, 265: 7709-7712.
- CHANG, W.T., CHENG, H.L., HSIEH, B.S., CHIU, C.C., LEE, K.T. and CHANG, K.L. 2014a. Progesterone increases apoptosis and inversely decreases autophagy in human hepatoma HA22T/VGH cells treated with epirubicin. *The Scientific World Journal*, 2014: 1-14.
- CHANG, W.T., HSIEH, B.S., CHENG, H.L., LEE, K.T. and CHANG, K.L. 2014b. Progesterone augments epirubicin-induced apoptosis in HA22T/VGH cells by increasing oxidative stress and upregulating Fas/FasL. *J. Surg. Res.*, 188 (2): 432-441.
- CHAPLIN, D.J. and DOUGHERTY, G.J. 1990. Tumour vasculature as a therapeutic strategy for cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 9: 267.
- CHEN, W., HU, Q.D., XIA, X.F., LIANG, C., LIU, H., ZHANG, Q., MA, T., LIANG, F. and LIANG, T.B. 2014. Rapamycin enhances cetuximab cytotoxicity by inhibiting mTOR-mediated drug resistance in mesenchymal hepatoma cells. *Cancer Biol. Ther.*, 15 (8): 992-999.
- CHEN, W., SHEN, X., XIA, X., XU, G., MA, T., BAI, X. and LIANG, T. 2012. NSC 74859-mediated inhibition of STAT3 enhances the anti-proliferative activity of cetuximab in hepatocellular carcinoma. *Liver Int.*, 32 (1): 70-77.
- CHHANIWAL, N., LI, C., WANG, J., QIANG, G., QI, T. and MAHER, H. 2015. Hepatocellular carcinoma: Review of current treatment with a focus on transarterial chemoembolization and radiofrequency ablation. *Open Journal of Radiology*, 5: 50-58.
- CHIANG, D.Y., VILLANUEVA, A., HOSHIDA, Y., PEIX, J., NEWELL, P., MINGUEZ, B., LEBLANC, A.C., DONOVAN, D.J., THUNG, S.N., SOLÉ, M., TOVAR, V., ALSINET, C., RAMOS, A.H., BARRETINA, J., ROAYAIE, S., SCHWARTZ, M., WAXMAN, S., BRUIX, J., MAZZAFERRO, V., LIGON, A.H., NAJFELD, V., FRIEDMAN, S.L., SELLERS, W.R., MEYERSON, M. and LLOVET J.M. 2008. Focal gains of VEGFA and molecular classification of HCC. *Cancer Res.*, 68: 6779-6788.

- CHOI, K.J., BAIK, I.H., YE, S.K. and LEE, Y.H. 2015. Molecular Targeted Therapy for Hepatocellular Carcinoma: Present Status and Future Directions. *Biol. Pharm. Bull.*, 38 (7): 986-991.
- CHOWDHUR, Y.I., THARAKAN, B. and BHAT, G.K. 2006. Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 11: 506-525.
- CIARDIELLO, F., BIANCO, R., CAPUTO, R., CAPUTO, R., DAMIANO, V., TROIANI, T., MELISI, D., DE VITA, F., DE PLACIDO, S., BIANCO, A.R. and TORTORA, G. 2004. Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cells with acquired resistance to antiepidermal growth factor receptor therapy. *Clin. Cancer. Res.*, 10 (2): 784-793.
- CNUBBEN, N.H.P., RIETJENS, I.M.C.M., WORTELBOER, H., VAN-ZANDEN, J. and VAN BLADEREN, P.J. 2001. The interplay of glutathione related processes in antioxidant defense. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 10: 141-152.
- COHEN, J.J. 1993a. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp. Pract.*, 28(12): 35-43
- COHEN, J.J. 1993b. Apoptosis. *Immunol. Today*, 14: 126-130.
- COHEN, P. 2002. Protein kinases-the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 1: 309-315.
- COHEN, R.B. 2003. Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer*, 2: 246-251.
- COLE, S.P., BHARDWAJ, G., GERLACH, J.H., MACKIE, J.E., GRANT, C.E., ALMQUIST, K.C., STEWART, A.J., KURZ, E.U., DUNCAN, A.M. and DEELEY, R.G. 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, 258: 1650-1654.
- COOPER, G.M. and HAUSMAN R.E. 2006. Hücre Moleküler Yaklaşım. Çev. Edit: Sakızlı M., Atabey N., 3. Baskı, ss. 325-355, İzmir Tıp Kitabevi, İzmir.
- CUMMINGS, B.S. and SCHNELLMANN R.G. 2002. Cisplatin-Induced Renal Cell Apoptosis: Caspase 3-Dependent and -Independent Pathways. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 302: 8-17.
- CUNNINGHAM, D., HUMBLTET, Y., SIENA, S., KHAYAT, D., BLEIBERG, H., SANTORO, A., BETS, D., MUESER, M., HARSTRICK, A., VERSLYPE, C., CHAU, I. and VAN CUTSEM, E. 2004. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 35: 337-345.

- D'ANGELO, D., MUSSNICH, P., ROSA, R., BIANCO, R., TORTORA, G. and FUSCO, A. 2014. High mobility group A1 protein expression reduces the sensitivity of colon and thyroid cancer cells to antineoplastic drugs. *BMC Cancer*, 14: 851.
- DAMIANO, V., CAPUTO, R., BIANCO, R., D'ARMIENTO, F.P., LEONARDI, A., DE PLACIDO, S., BIANCO, A.R., AGRAWAL, S., CIARDIELLO, F. and TORTORA, G. 2006. Novel toll-like receptor 9 agonist induces epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibition and synergistic antitumor activity with EGFR inhibitors. *Clin. Cancer. Res.*, 12 (2): 577-583.
- DANCEY, J.E. and CHEN, H.X. 2006. Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5: 649-659.
- DAVEAU, M., SCOTTE, M., FRANÇOIS, A., COULOUARN, C., ROS, G., TALLET, Y., HIRON, M., HELLOT, M.F. and SALIER, J.P. 2003. Hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, and their receptors as combined markers of prognosis in hepatocellular carcinoma. *Mol. Carcinog.*, 36: 130-141.
- DE ROOCK, W., CLAES, B., BERNASCONI, D., DE SCHUTTER, J., BIESMANS, B., FOUNTZILAS, G., KALOGERAS, K.T., KOTOULA, V., PAPAMICHAEL, D., LAURENT-PUIG, P., PENNAULT-LLORCA, F., ROUGIER, P., VINCENZI, B., SANTINI, D., TONINI, G., CAPPUZZO, F., FRATTINI, M., MOLINARI, F., SALETTI, P., DE DOSSO, S., MARTINI, M., BARDELLI, A., SIENA, S., SARTORE-BIANCHI, A., TABERNERO, J., MACARULLA, T., DI FIORE, F., GANGLOFF, A.O., CIARDIELLO, F., PFEIFFER, P., QVORTRUP, C., HANSEN T.P., VAN CUTSEM, E., PIESSEVAUX, H., LAMBRECHTS, D., DELORENZI, M. and TEJPAN, S. 2010a. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.*, 11: 753-762.
- DE ROOCK, W., JONKER, D.J., DI NICOLANTONIO, F., SARTORE-BIANCHI, A., TU, D., SIENA, S., LAMBA, S., ARENA, S., FRATTINI, M., PIESSEVAUX, H., VAN CUTSEM, E., O'CALLAGHAN C.J., KHAMBATA-FORD, S., ZALCBERG, J.R., SIMES, J., KARAPETIS, C.S., BARDELLI, A. and TEJPAN, S. 2010b. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA*, 304: 1812-1820.
- DEATON, C.M. and MARLIN, D.J. 2003. Exercise-associated oxidative stress, *Clin. Tech. Equine. Pract.*, 2 (3): 278-291.
- DEGTEREV, A., BOYCE, M. and YUAN, J. 2001. The channel of death. *J. Cell Biol.*, 155: 695-698.

- DEVERAUX, Q.L. and REED, J.C. 1999. IAP family proteins: suppressors of apoptosis. *Genes Dev.*, 13: 239-252.
- DI BISCEGLIE, A.M., RUSTGI, V.K., HOOFNAGLE, J.H., DUSHEIKO, G.M. and LOTZE, M.T. 1988. Hepatocellular carcinoma. *Ann. Intern. Med.*, 108: 390-401.
- DONDOSSOLAA, E., DOBROFF, A.S., MARCHIÒ, S., CARDÓ-VILA, M., HOSOYA, H., LIBUTTÌ, S.K., CORTÌ, A., SIDMAN, R.L., ARAP, W. and PASQUALINI, R. 2016. Self-targeting of TNF-releasing cancer cells in preclinical models of primary and metastatic tumors. *PNAS*, 113: 2223-2228.
- DONG, X., JIN, K., HU, X., DU, F., LAN, H., HAN, N., MA, Z., XIE, B., CUI, B., TENG, L. and CAO, F. 2012. Antitumor effect of FP3 in combination with cetuximab on patient-derived tumor tissue xenograft models of primary colon carcinoma and related lymphatic and hepatic metastases. *Int. J. Mol. Med.*, 30 (1): 126-132.
- DU, P., CAO, H., WU, H.R., ZHU, B.S., WANG, H.W., GU, C.W., XING, C.G. and CHEN, W. 2013. Blocking Bcl-2 leads to autophagy activation and cell death of the HEPG2 liver cancer cell line. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 14 (10): 5849-5854.
- DURGO, K., VUKOVIĆ, L., RUSAK, G., OSMAK, M. and ČOLIĆ, J. F. 2009. Cytotoxic and Apoptotic Effect of Structurally Similar Flavonoids on Parental and Drug-Resistant Cells of a Human Cervical Carcinoma. *Food Technol. Biotechnol.*, 47 (4): 356-363.
- EARNSHAW, W.C. 1995. Nuclear changes in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7: 337-
- EL SERAG, H.B. and MASON, A.C. 1999. Rising incidence of hepatocellular carcinoma in the United States. *N. Engl. J. Med.*, 340: 745-750.
- EL-DEIRY, W.S., TOKINO, T., VELCULESCU, P.E., LEVY, D.B., PARSONS, R., TRENT, J.M., LIN, D., MERCEWR, W.E., KINZLER, K.W. and VOGELSTEIN, B. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75: 817.
- ERSTER, S. and MOLL, U.M. 2005. Stress induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331: 843-850.
- EZZOUKHRY, Z., LOUANDRE, C., TRÉCHEREL, E., GODIN, C., CHAUFFERT, B., DUPONT, S., DIOUF, M., BARBARE, J.C., MAZIÈRE, J.C. and GALMICHE, A. 2012. EGFR activation is a potential determinant of primary resistance of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib. *Int. J. Cancer*, 131 (12): 2961-1969.
- FAN, T.J., HAN, L.H., CONG, R.S. and LIANG, J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 37: 719-727.

- FAN, Z., SHANG, B.Y., LU, Y., CHOU, J.L. and MENDELSON J. 1997. Reciprocal changes in p27(Kip1) and p21(Cip1) in growth inhibition mediated by blockade or overstimulation of epidermal growth factor receptors. *Clin Cancer Res*, 3: 1943-1948.
- FARAZI, P.A. and DEPINHO, R.A. 2006. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. *Nat. Rev. Cancer*, 6: 674-687.
- FARDEL, O., LECUREUR, V. and GUILLOUZO, A. 1996. The P-glycoprotein multidrug transporter. *Gen. Pharmacol.*, 27 (8): 1283-1291.
- FERBER, M.J., MONTOYA, D.P., YU, C., ADERCA, I., MCGEE, A., THORLAND, E.C., NAGORNEY, D.M., GOSTOUT, B.S., BURGART, L.J., BOIX, L., BRUIX, J., MCMAHON, B.J., CHEUNG, T.H., CHUNG, T.K., WONG, Y.F., SMITH, D.I. and ROBERTS, L.R. 2003. Integrations of the hepatitis B virus (HBV) and human papillomavirus (HPV) into the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene in liver and cervical cancers. *Oncogene*, 22: 3813-3820.
- FLOHE, L. and GUNZLER, W.A. 1984. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.*, 105: 115-121.
- FREEMAN, B.A. and CRAPO, J.D. 1982. Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47: 412-426.
- GALER, C.E., COREY, C.L., WANG, Z., YOUNES, M.N., GOMEZ-RIVERA, F., JASSER, S.A., LUDWIG, D.L., EL-NAGGAR, A.K., WEBER, R.S. and MYERS, J.N. 2011. Dual inhibition of epidermal growth factor receptor and insulin-like growth factor receptor I: reduction of angiogenesis and tumor growth in cutaneous squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 33 (2): 189-198.
- GAO, A.M., KE, Z.P., SHI, F., SUN, G.C. and CHEN, H. 2013. Chrysin enhances sensitivity of BEL-7402/ADM cells to doxorubicin by suppressing PI3K/Akt/Nrf2 and ERK/Nrf2 pathway. *Chem. Biol. Interact.*, 206 (1):100-108.
- GAZITT, Y., LIU, Q.Y. and VOSELE, D. 2001. Bcl-2 antisense oligonucleotide (ASO) enhances apoptosis and cytotoxicity in drug-resistant myeloma cells. *Blood*, 98: 641.
- GENG, J., LI, X., LANG, X., QIAO, C., HU, M., YANG, J., FENG, J. and LV, M. 2014. Combination of cetuximab and rapamycin enhances the therapeutic efficacy in hepatocellular carcinoma. *Technol. Cancer Res. Treat.*, 13 (4): 377-385.
- GEOFFEY, M.C. and ROBERT, E.H. 2004. The cell a molecular approach. Boston, ASM Pres.

- GERSCHENSON, L.E, and ROTELLO, R.J. 1993. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J.*, 6: 2450-2455.
- GEYER, C.E., FORSTER, J., LINDQUIST, D., CHAN, S., ROMIEU, C.G., PIENKOWSKI, T., JAGIELLO-GRUSZFELD, A., CROWN, J., CHAN, A., KAUFMAN, B., SKARLOS, D., CAMPONE, M., DAVIDSON, N., BERGER, M., OLIVA, C., RUBIN, S.D., STEIN, S. and CAMERON, D. 2006. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 355: 2733-2743.
- GLOECKNER, H., JONULEIT, T. and LEMKE, H.D. 2001. Monitoring Of Cell Viability And Cell Growth In A Hollow-Fiber Bioreactor By Use Of The Dye Alamar Blue (Tm). *Journal of Immunological Methods*, 252: 131-138.
- GOLDSTEIN, N.I., PREWETT, M., ZUKLYS, K. ROCKWELL, P. and MENDELSON, J. 1995. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res.*, 1: 1311-1318.
- GOSS, G. and GAUTHIER, I. 2004. Targeted therapies: promising a better future for patients. *Signal*, 5: 2.
- GOTTESMAN, M.M. and PASTAN, I. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochemistry*, 62: 385-427.
- GOTTESMAN, M.M., AMBUDKAR, S.V., NI, B., ARAN, J.M., SUGIMOTO, Y., CARDARELLI, C.O. and PASTAN, I. 1994. Exploiting multidrug resistance to treat cancer. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 59: 677-683.
- GRIFFITHS, G.J., DUBREZ, L., MORGAN, C.P., JONES, N.A., WHITEHOUSE, J., CORFE, B.M., DIVE, C. and HICKMAN, J.A. 1999. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in-vivo precede the onset of apoptosis. *J. Cell Biol.*, 144: 903-914.
- GRUENWALD, V., WILKENS, L., GEBEL, M., GRETEN, T.F, KUBICKA, S., GANSER, A., MANNS, M.P. and MALEK, N.P. 2007. A phase II open-label study of cetuximab in unresectable hepatocellular carcinoma: final results [Abstract]. *J. Clin. Oncol.*, 25: 4598.
- GUEMOURI, L., ARTUR, Y., HERBETH, B., JEANDEL, C., CUNY, G. and SIEST, G. 1991. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin. Chem.*, 37 (11): 1932-1937.
- GUTTERIDGE, J.M. and HALLIWELL, B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann. N Y. Acad. Sci.*, 899: 136-147.
- HALLIWELL, B. 1984. Oxygen radicals; A commonsense look at their nature and medical importance. *Med. Biol.*, 62: 71-77.

- HALLIWELL, B. and GUTTERIDGE, J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine. Third Edition, Oxford University Pres. Inc., New York, 936pp.
- HAN, Y., ZHANG, J.P., QIAN, J.Q. and HU, C.Q. 2015. Cardiotoxicity evaluation of anthracyclines in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Appl. Toxicol.*, 35 (3): 241-252.
- HANAHAN, D. and WEINBERG, R.A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100: 57-70.
- HARARI, P.M. 2004. Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocrine-Related Cancer*, 11: 689-708.
- HARARI, P.M., ALLEN, G.W. and BONNER, J.A. 2007. Biology of interactions: Antiepidermal growth factor receptor agents. *J. Clin. Oncol.*, 25: 4057-4065.
- HARUYAMA, Y., YORITA, K., YAMAGUCHI, T., KITAJIMA, S., AMANO, J., OHTOMO, T., OHNO, A., KONDO, K. and KATAOKA, H. 2015. High preoperative levels of serum glypican-3 containing N-terminal subunit are associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after partial hepatectomy. *Int. J. Cancer.*, 137 (7): 1643-1651.
- HAWKES, E. and CUNNINGHAM, D. 2010. Relationship between colorectal cancer biomarkers and response to epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J. Clin. Oncol.*, 28: 529-531.
- HERMES-LIMA, M., STOREY, J.M. and STOREY, K.B. 2001. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. In: Storey K.B., Storey J.M. (Editors), *Cell and Molecular Responses to Stress*, Elsevier Press, pp. 263-287, Amsterdam.
- HILL, B.T. and WHELAN, R.D.H. 1982. A comparison of the lethal and kinetic effects of doxorubicin and 4'-epi-doxorubicin in vitro. *Tumori*, 68: 29-37.
- HOLMER, A.F. 2004. Cetuximab in colon cancer. *N. Engl. J. Med.*, 351: 1575-1576.
- HOPFNER, M., HUETHER, A., SUTTER, A.P., MAASER, K., SCHUPPAN, D. and SCHERUBL H. 2005. The insulin-like growth factor receptor 1 is a promising target for novel treatment approaches in hepatocellular cancer, unpublished work.
- HOPFNER, M., SUTTER, A.P., HUETHER, A., BARADARI, V. and SCHERUBL, H. 2006. Tyrosine kinase of insulin-like growth factor receptor as target for novel treatment and prevention strategies of colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.*, 12 (35): 5635-5643.
- HOPKINS, S.J. 1983. Epirubicin. *Drugs Future*, 8: 402-406.

- HUANG, S.T., YANG R.C., YANG L.J., LEE P.N. and PANG J.H.S. 2003. *Phyllanthus Urinaria* triggers the apoptosis and Bcl-2 down regulation in lewis lung carcinoma cells. *Life Sciences*, 72: 1705-1716.
- HUERTA, S., GOULET, E.J., YEPEZ, S. and LIVINGSTON, E.H. 2007. Screening and detection of apoptosis. *J. Surg. Res.*, 139: 143-156.
- HUETHER, A., HOPFNER, M., BARADARI, V., SCHUPPAN, D. and SCHERUBL, H. 2005. EGFR blockade by cetuximab alone or as combination therapy for growth control of hepatocellular cancer. *Biochem. Pharmacol.*, 70: 1568-1578.
- HUNG, R.W.Y. and CHOW, A.W. 2004. Dissecting the “end game”: clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assesment of apoptosis. *Clin. Invest. Med.*, 27: 324-44.
- HURWITZ, H., FEHRENBACHER, L., NOVOTNY, W., CARTWRIGHT, T., HAINSWORTH, J., HEIM, W., BERLIN, J., BARON, A., GRIFFING, S., HOLMGREN, E., FERRARA, N., FYFE, G., ROGERS, B., ROSS, R. and KABBINAVAR, F. 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 350: 2335-2342.
- HUSSAIN, S.P., SCHWANK, J., STAIB, F., WANG, X.W. and HARRIS, C.C. 2007. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. *Oncogene*, 26: 2166-2176.
- INDRAJIT, C. and BINU, T. 2006. Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. *Cell Mol. Biol. Lett.*, 11: 506-525.
- INNO, A., SALVATORE, M.D., CENCI, T., MARTINI, M., ORLANDI, A., STRIPPOLI, A., FERRARA, A.M., BAGALÀ, C., CASSANO, A., LAROCCA, L.M. and BARONE, C. 2011. Is There a role for IGF1R and c-MET pathways in resistance to cetuximab in metastatic colorectal cancer? *Clin. Colorectal Cancer*, 10 (4): 325-332.
- ITABASHI, H., MAESAWA, C., OIKAWA, H., KOTANI, K., SAKURAI, E., KATO, K., KOMATSU, H., NITTA, H., KAWAMURA, H., WAKABAYASHI, G. and MASUDA, T. 2008. Angiotensin II and epidermal growth factor receptor cross-talk mediated by a disintegrin and metalloprotease accelerates tumor cell proliferation of hepatocellular carcinoma cell lines. *Hepatol. Res.*, 38 (6): 601-613.
- JANSSON, O., MOTLAGH, P.B., PERSSON, M., HENRIKSON, R. and GRANKVIST, K. 1999. Increase in doxorubicin cytotoxicity by carvedilol inhibition of P-glycoprotein activity. *Biochemical. Pharmacol.*, 58: 1801-1806.
- JÄRVINEN, K., PIETARINEN-RUNTTI, P., LINNAINMAA, K., RAIVIO, K.O., KREJSA, C.M., KAVANAGH, T. and KINNULA, V.L. 2000. Antioxidant defense mechanisms of human mesothelioma and lung

- adenocarcinoma cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 278 (4): L696-702.
- JIANG, H., XIA, D., WU, L.J. and CHEN, Z.D. 2011. Inhibition of Bcl-2 enhances the efficacy of epirubicin chemotherapy in PC-3 prostate cancer cells. *Chin. Med. J. (Engl)*, 124 (23): 4018-4021.
- JIN, X., WU, X.X., JIN, C., INUI, M., SUGIMOTO, M. and KAKEHI, Y. 2012. Delineation of apoptotic genes for synergistic apoptosis of lexatumumab and anthracyclines in human renal cell carcinoma cells by polymerase chain reaction array. *Anticancer Drugs*, 23 (4): 445-454.
- JONKER, D.J., O'CALLAGHAN, C.J., KARAPETIS, C.S., ZALCBERG, J.R., TU, D., AU, H.J., BERRY, S.R., KRAHN, M., PRICE, T., SIMES, R.J., TEBBUTT, N.C., VAN HAZEL, G., WIERZBICKI, R., LANGER, C. and MOORE, M.J. 2007. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 357: 2040-2048.
- KAHLOS, K., ANTTILA, S., ASIKAINEN, T., KINNULA, K., RAIVIO, K.O., MATTSON, K., LINNAINMAA, K. and KINNULA, V.L. 1998. Manganese superoxide dismutase in healthy human pleural mesothelium and in malignant pleural mesothelioma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 18 (4): 570-580.
- KARS, M.D., ISERI, O.D., GUNDUZ, U., URAL A.U., ARPACI, F. and MOLNAR, J. 2006. Development Of Rational In Vitro Models For Drug Resistance In Breast Cancer And Modulation Of MDR By Selected Compounds. *Anticancer Research*, 26, 4559-4568.
- KERR, J.F.R., WYLLIE, A.H and CURRIE, A.R. 1972. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-245.
- KHAMBATA-FORD, S., GARRETT, C.R., MEROPOL, N.J., BASIK, M., HARBISON, C.T., WU, S., WONG, T.W., HUANG, X., TAKIMOTO, C.H., GODWIN, A.K., TAN, B.R., KRISHNAMURTHI, S.S., BURRIS, H.A., POPLIN E.A., HIDALGO, M., BASELGA, J., CLARK, E.A. and MAURO, D.J. 2007. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.*, 25: 3230-3237.
- KIEFER, C.S., CLAES, A.R., NZAYISENGA, J.C., PIETRA, S., STANISLAS, T., HUSER, A., IKEDA, Y. and GREBE, M. 2015. Arabidopsis AIP1-2 restricted by WER-mediated patterning modulates planar polarity. *Development*, 142 (1): 151-161.
- KIM, E.S., KHURI, F.R. and HERBST, R.S. 2001. Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225). *Curr. Opin. Oncol.*, 13: 506-513.

- KINNULA, K., LINNAINMAA, K., RAIVIO, K.O. and KINNULA, V.L. 1998. Endogenous antioxidant enzymes and glutathione S-transferase in protection of mesothelioma cells against hydrogen peroxide and epirubicin toxicity. *Br. J. Cancer*, 77 (7): 1097-1102.
- KOLARIC, K., POTREBICA, V. and CERVEK, J. 1983. Phase II clinical trial of 4'-epidoxorubicin in metastatic solid tumors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 106: 148-152.
- KOUKOURAKIS, M.I., TSOUTSOU, P.G., KARPOUZIS, A., TSIARKATSI, M., KARAPANTZOS, I., DANIILIDIS, V. and KOUSKOUKIS, C. 2010. Radiochemotherapy with cetuximab, cisplatin, and amifostine for locally advanced head and neck cancer: a feasibility study. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 77 (1): 9-15.
- KRASINSKAS, A.M. 2011. EGFR signaling in colorectal carcinoma. *Patholog Res Int*, 2011: 932932.
- KUHN, C., YU, S.H., CHRAPLYVY, M., LINDER, H.E. and SENIOR, R.M. 1976. The induction of emphysema with elastase II. Changes in connective tissue. *Lab. Invest.*, 34: 372-380.
- LAWRANCE, R.A. and BURK, R.F. 1976. Glutathion peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 71 (4): 952-958.
- LEE, J.S., HEO, J., LIBBRECHT, L., CHU, I.S., KAPOSI-NOVAK, P., CALVISI, D.F., MIKAELIAN, A., ROBERTS, L.R., DEMETRIS, A.J., SUN, Z., NEVENS, F., ROSKAMS, T. and THORGEIRSSON, S.S. 2006. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat. Med.*, 12: 410-416.
- LIANG, J.D., PING, X.O., TSENG, Y.J., HUANG, G.T., LAI, F. and YANG, P.M. 2014. Recurrence predictive models for patients with hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation using support vector machines with feature selection methods. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 117: 425-434.
- LIM, R., SUN, Y., IM, S.A. HSIEH, R.K., YAU, T.K., BONAVENTURA, A., CHEIRSILPA, A., ESSER, R., MUESER, M. and ADVANI, S. 2011. Cetuximab plus irinotecan in pretreated metastatic colorectal cancer patients: the ELSIE study. *World J. Gastroenterol.*, 17: 1879-1888.
- LIN, Y., JIANG, D., LI, Y., HAN, X., YU, D., PARK, J.H. and JIN, Y.H. 2015. Effect of sun ginseng potentiation on epirubicin and paclitaxel-induced apoptosis in human cervical cancer cells. *J. Ginseng Res.*, 39 (1): 22-28.
- LINARDOU, H., BRIASOULIS, E., DAHABREH, I.J., MOUNTZIOS, G., PAPADIMITRIOU, C., PAPADOPOULOS, S., BAFALOUKOS,

- D., KOSMIDIS, P. and MURRAY, S. 2011. All about KRAS for clinical oncology practice: Gene profile, clinical implications and laboratory recommendations for somatic mutational testing in colorectal cancer. *Cancer Treat. Rev.*, 37: 221-233.
- LITMAN, T., BRANGI, M., HUDSON, E., FETSCH, P., ABATI, A., ROSS, D.D., MIYAKE, K., RESAU, J.H., and BATES, S.E. 2000. The multidrug resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2). *Journal Cell Science*, 113: 2011-2021.
- LIU, W., KANG, M., QIN, Y., WEI, Z. and WANG, R. 2015. Apoptosis-inducing effects of cetuximab combined with radiotherapy and hypothermia on human nasopharyngeal carcinoma CNE cells. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 8 (2): 2182-2189.
- LIU, X., GUO, W.J., ZHANG, X.W., CAI, X., TIAN, S. and LI, J. 2011. Cetuximab enhances the activities of irinotecan on gastric cancer cell lines through downregulating the EGFR pathway upregulated by irinotecan. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 68 (4): 871-878.
- LIU, Y.Y., HAN, T.Y., GIULIANO, A.E. and CABOT, M.C. 2001. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB Journal*, 15: 719-730.
- LLOVET, J.M. and BRUIX, J. 2003. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival. *Hepatology*, 37: 429-442.
- LLOVET, J.M. and BRUIX, J. 2008. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 48: 1312-1327.
- LLOVET, J.M., BURROUGHS, A. and BRUIX, J. 2003. Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 362: 1907-1917.
- LLOVET, J.M., DI BISCEGLIE, A.M., BRUIX, J., KRAMER, B.S., LENCIONI, R., ZHU, A.X., SHERMAN, M., SCHWARTZ, M., LOTZE, M., TALWALKAR, J. and GORES G.J; for the Panel of Experts in HCC-Design Clinical Trials. 2008. Design and end-points of clinical trials in HCC. *J. Natl. Cancer Inst.*, 100: 698-711.
- LLOVET, J.M., SCHWARTZ, M. and MAZZAFERRO, V. 2005. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin. Liver Dis.*, 25: 181-200.
- LLOVET, J.M., RICCI, S., MAZZAFERRO, V., HILGARD, P., GANE, E., BLANC, J.F., DE OLIVEIRA, A.C., SANTORO, A., RAOUL, J.L., FORNER, A., SCHWARTZ, M., PORTA, C., ZEUZEM, S., BOLONDI, L., GRETEN, T.F., GALLE, P.R., SEITZ, J.F., BORBATH, I., HÄUSSINGER, D., GIANNARIS, T., SHAN, M., MOSCOVICI, M., VOLIOTIS, D. and

- BRUIX, J. 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, 359: 378-390.
- LO, Y.L. 2013. A potential daidzein derivative enhances cytotoxicity of epirubicin on human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 14 (1): 158-176.
- LO, Y.L. and WANG, W. 2013. Formononetin potentiates epirubicin-induced apoptosis via ROS production in HeLa cells in vitro. *Chem. Biol. Interact.*, 205 (3): 188-197.
- LO, Y.L. and LIU, Y. 2014. Reversing multidrug resistance in Caco-2 by silencing MDR1, MRP1, MRP2, and BCL-2/BCL-xL using liposomal antisense oligonucleotides. *PLoS One*, 9 (3): e90180.
- LO, Y.L., WANG, W. and HO, C.T. 2012. 7,3',4'-Trihydroxyisoflavone modulates multidrug resistance transporters and induces apoptosis via production of reactive oxygen species. *Toxicology*, 302: 221-232.
- LO, Y.L., HO, C.T. and TSAI, F.L. 2008. Inhibit multidrug resistance and induce apoptosis by using glycocholic acid and epirubicin. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 35 (1-2): 52-67.
- LOPEZ, P., VILLANUEVA, A. and LLOVET, J.M. 2006. Up-dated systematic review of randomized controlled trials in hepatocellular carcinoma. 2002-2005. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 23: 1535-1547.
- LOWE, S.W. and LIN, A.W. 2000. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21: 485-495.
- LOWE, S.W., RULEY, H.E., JACKS, T. and HOUSMAN, D.E. 1993. p53- dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, 74: 957-967.
- LUPBERGER, J., ZEISEL, M.B., XIAO, F., THUMANN, C., FOFANA, I., ZONA, L., DAVIS, C., MEE, C.J., TUREK, M., GORKE, S., ROYER, C., FISCHER, B., ZAHID, M.N., LAVILLETTE, D., FRESQUET, J., COSSET, F.L., ROTHENBERG, S.M., PIETSCHMANN, T., PATEL, A.H., PESSAUX, P., DOFFOËL, M., RAFFELSBERGER, W., POCH, O., MCKEATING, J.A., BRINO, L. and BAUMERT, T.F. 2011. EGFR and EphA2 are host factors for hepatitis C virus entry and possible targets for antiviral therapy. *Nature Medicine*, 17 (5): 589-595.
- LURJE, G. and LENZ, H.J. 2009. EGFR signaling and drug discovery. *Oncology*, 77: 400-410.
- MACDONALD, J.S., GUNDERSON, L.L. and ADSON, M.A. 1982. Cancer of the hepatobiliary system, in DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds): *Cancer Principles and Practice of Oncology*. Lippincott Co, pp 590-615, Philadelphia.

- MAO, C. LIAO, R.Y. and CHEN, Q. 2010. BRAF mutation predicts resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in wild-type KRAS metastatic colorectal cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 136: 1293-1294.
- MARSHALL, J. 2006. Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer*, 107: 1207-1218.
- MARTINELLI, E., DEPALMA, R., ORDITURA, M., DE VITA, F. and CIARDIELLO, F. 2009. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clin. Exp. Immunol.*, 158: 1-9.
- MARTINOU, J.C. and GREN, D.R. 2001. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol. Cell. Biol.*, 2: 63-67.
- MASUI, T., OTA, I., KANNO, M., YANE, K. and HOSOI, H. 2013. Low-intensity ultrasound enhances the anticancer activity of cetuximab in human head and neck cancer cells. 2012. *Exp. Ther. Med.*, 5 (1): 11-16.
- MATES, J.M. 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*, 153: 83-104.
- MAYS, A.N., OSHEROFF, N., XIAO, Y., WIEMELS, J.L., FELIX, C.A., BYL, J.A., SARAVANAMUTTU, K., PENIKET, A., CORSER, R., CHANG, C., HOYLE, C., PARKER, A.N., HASAN, S.K., LO-COCO, F., SOLOMON, E. and GRIMWADE, D. 2010. Evidence for direct involvement of epirubicin in the formation of chromosomal translocations in t(15;17) therapy-related acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 115: 326-330.
- McCORD, J. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.*, 108: 652-659.
- MCDANIEL, J. and PILLAI, S.D. 2002. Gel alignment and band scoring for DNA fingerprinting using Adobe Photoshop. *Biotechniques*, 32 (1): 120-123.
- MEISSNER, M., STEIN, M., URBICH, C., REISINGER, K., SUSKE, G., STAELS, B., KAUFMANN, R. and JENS, G. 2004. PPAR activators inhibit vascular endothelial growth factor receptor-2 expression by repressing Sp1 dependent DNA binding and transactivation. *Circ. Res.*, 94: 324-332.
- MENDELSON, J. 2001. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr. Relat. Cancer*, 8: 3-9.
- MENDELSON, J. and BASELGA, J. 2003. Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J. Clin. Oncol.*, 21: 2787-2799.
- MENDELSON, J. and FAN, Z. 1997. Epidermal growth factor receptor family and chemosensitization. *J. Natl. Cancer Inst.*, 89: 341-343.

- MERCAN, U. 2004. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet. Fak. Derg.*, 15 (1-2): 91-96.
- MILLER, K., WANG, M., GRALOW, J., DICKLER, M., COBLEIGH, M., PEREZ, E.A., SHENKIER, T., CELLA, D. and DAVIDSON, N.E. 2007. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 357: 2666-2676.
- MILLS, G.C. 1957. Hemoglobin catabolism. I. glutathione peoxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.*, 229: 189.
- MRUK, D.D., SILVESTRINI, B., MENG-YUN, M.O. and CHENG, C.Y. 2002. Antioxidant superoxide dismutase -a review: Its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, 65: 305-311.
- MUGGIA, F.M., HOCHSTER, H. and GREEN M, et al.1984. Favorable experience with epirubicin in hepatoma. International Symposium on Advances in Anthracycline Chemotherapy, Milan, Italy, p 34 (abstr).
- MURRAY, R.K., MAYES, P.A., GRANNER, D.K. and RADWELL, V.W. 1993. Harper'in Biyokimyası. Çevirenler: Prof. Dr. Gülriş Mentec, Prof.Dr. Biltan Ersöz. Barış Kitabevi.
- MUTSAERS, A.J., FRANCA, G., MAN, S., LEE, C.R., EBOS, J.M., WU, Y., WITTE, L., BERRY, S., MOORE, M. and KERBEL, R.S. 2009. Dose-dependent increases in circulating TGF- α and other EGFR ligands act as pharmacodynamic markers for optimal biological dosing of cetuximab and are tumor independent. *Clin. Cancer Res.*, 15: 2397-2405.
- NASR, M., NAFEE, N., SAAD, H. and KAZEM, A. Improved antitumor activity and reduced cardiotoxicity of epirubicin using hepatocyte-targeted nanoparticles combined with tocotrienols against hepatocellular carcinoma in mice. 2014. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 88 (1): 216-225.
- NATALE, N., PIAZZA, E., ITALIA, C., TRABATTONI, A. and LUCHINI, S. 1983. The kinetics of anthracyclines in human plasma and tissues: Daunomycin, doxorubicin, and 4' epidoxorubicin. *Drugs Exp. Clin. Res.*, 9: 775-779.
- NICHOLSON, R.I., GEE, J.M. and HARPER, M.E. 2001. EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer*, 37: 9-15.
- NORDBERG, J. and ARNER, E.S.J. 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.*, 31: 1287-1312.
- O'DWYER, P.J., LEVY, D.E., KAUF, J.S., FITZGERALD, D.B. and BENSON, A.B. III. 2006. Gefitinib in advanced unresectable hepatocellular carcinoma: results

from the Eastern Cooperative Oncology Group's Study E1203. *J. Clin. Oncol.*, 24: (Abstract 4143).

ODEN-GANGLOFF, A., DI FIORE, F., BIBEAU, F. LAMY, A., BOUGEARD, G., CHARBONNIER, F., BLANCHARD, F., TOUGERON, D., YCHOU, M., BOISSIÈRE, F., LE PESSOT, F., SABOURIN, J.C., TUECH, J.J., MICHEL, P. and FREBOURG, T. 2009. TP53 mutations predict disease control in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab-based chemotherapy. *Br. J. Cancer*, 100: 1330-1335.

ORCUTT, K.P., PARSONS, A.D., SIBENALLER, Z.A., SCARBROUGH, P.M., ZHU, Y., SOBHAKUMARI, A., WILKE, W.W., KALEN, A.L., GOSWAMI, P., MILLER, F.J. Jr, SPITZ, D.R. and SIMONS, A.L. 2011. Erlotinib-mediated inhibition of EGFR signaling induces metabolic oxidative stress through NOX4. *Cancer Res.*, 71 (11): 3932-3940.

OZKAN, A. and FIŞKIN, K. 2004. Epirubicin HCl toxicity in human-liver derived hepatoma G2 cells. *Pol. J. Pharmacol.*, 56 (4): 435-444.

OZKAN, A., 2007. Lymphokine-Activated Killer Cell Susceptibility in Epirubicin Resistant and Parental Human Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Biologia*, 62: 232-237.

OZKAN, A., AYHAN, A. and FISKIN K. 2004. Combined effect of epirubicin and lymphokine-activated killer cells on the resistant human breast cancer cells. *Cell Biol. Toxicol.*, 20 (5): 261-271.

ÖKTEM, S., ÖZHAN, M.H. ve ÖZOL, D. 2001. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2: 91-95.

PAGLIA, D.E. and VALENTINE, W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70 (1): 158-69.

PARK, S.J., KIM, M.J., KIM, Y.K., KIM, S.M., PARK, J.Y. and MYOUNG, H. 2010. Combined cetuximab and genistein treatment shows additive anti-cancer effect on oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.*, 292 (1): 54-63.

PARK, Y.W. 2009. Targeted Molecular Therapy in a Murine Model of Oral Squamous Cell Carcinoma with an Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitor. *J. Korean Assoc. Maxillofac. Plast. Reconstr. Surg.*, 31(1): 8-17.

PARKIN, D.M., BRAY, F., FERLAY, J. and PISANI, P. 2005. Global cancer statistics 2002. *CA Cancer J. Clin.*, 55: 74-108.

PARKIN, D.M., PISANI, P. and FERLAY, J. 1999. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.*, 49 (2): 33-64.

- PERRY, M.C. 2008. The Chemotherapy Source Book. Lippincott Williams & Wilkins, 779 sayfa.
- PHILIP, P.A., MAHONEY, M.R., ALLMER, C., THOMAS, J., PITOT, H.C., KIM, G., DONEHOWER, R.C., FITCH, T., PICUS, J. and ERLICHMAN, C. 2005. Phase II study of Erlotinib (OSI-774) in patients with advanced hepatocellular cancer. *J. Clin. Oncol.*, 23: 6657-6663.
- PISANI, P., PARKIN, D.M., BRAY, F. and FERLAY, J. 1999. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer*, 83: 18-29.
- PLUMBRIDGE, T.W. and BROWN, J.R. 1978. Studies on the mode of interaction of 4'-epidoxorubicin and 4-demethoxydaunomycin with DNA. *Biochem. Pharmacol.*, 27: 1881-1882.
- PREWETT, M., ROCKWELL, P., ROCKWELL, R.F., GIORGIO, N.A., MENDELSON, J., SCHER, H.I. and GOLDSTEIN, N.I. 1996. The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.*, 19: 419-427.
- PRICHARD, C.N., KIM, S., YAZICI, Y.D., DOAN, D.D., JASSER, S.A., MANDAL, M. and MYERS, J.N. 2007. Concurrent cetuximab and bevacizumab therapy in a murine orthotopic model of anaplastic thyroid carcinoma. *Laryngoscope*, 117 (4): 674-679.
- QIAN, M., QIAN, D., JING, H., LI, Y., MA, C. and ZHOU, Y. 2014. Combined cetuximab and celecoxib treatment exhibits a synergistic anticancer effect on human oral squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Oncol. Rep.*, 32 (4): 1681-1688.
- QIAN, Y., QIU, M., WU, Q., TIAN, Y., ZHANG, Y., GU, N., LI, S., XU, L. and YIN, R. 2014. Enhanced cytotoxic activity of cetuximab in EGFR-positive lung cancer by conjugating with gold nanoparticles. *Scientific Reports*, 4: 7490.
- QU, C.K. 2002. Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response. *Biochim. Biophys. Acta*, 1592: 297-301.
- RAMPIAS, T., GIAGINI, A., SIOLOS, S., MATSUZAKI, H., SASAKI, C., SCORILAS, A. and PSYRRI, A. 2014. RAS/PI3K crosstalk and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 20 (11): 2933-2946.
- REICHERT, J.M., ROSENSWEIG, C.J., FADEN, L.B. and DEWITZ, M.C. 2005. Monoclonal antibody successes in the clinic. *Nat. Biotechnol.*, 23: 1073-1078.
- ROBERTS, L.R. and GORES, G.J. 2005. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. *Semin. Liver Dis.*, 25: 212-225.

- ROBINSON, D.R., WU, Y.M. and LIN, S.F. 2000. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, 19: 5548-5557.
- ROBUSTELLI DELLA CUNA, G., PAVESI, L., PRETI, P. and GANZINA, F. 1983. Clinical evaluation of 4'-epi-doxorubicin in advanced solid tumors. *Invest. New Drugs*, 1: 349-353.
- ROCHÉ, H., FUMOLEAU, P., SPIELMANN, M., CANON, J.L., DELOZIER, T., SERIN, D., SYMANN, M., KERBRAT, P., SOULIÉ, P., EICHLER, F., VIENS, P., MONNIER, A., VINDEVOGHEL, A., CAMPONE, M., GOUDIER, M.J., BONNETERRE, J., FERRERO, J.M., MARTIN, A.L., GENÈVE, J. and ASSELAIN, B. 2006. Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node-positive breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 Trial. *J. Clin. Oncol.*, 24: 5664-5671.
- ROH, S.A., CHOI, E.Y., CHO, D.H., YOON, Y.S., KIM, T.W., KIM, Y.S. and KIM, J.C. 2012. Characterization of biological responses of colorectal cancer cells to anticancer regimens. *J. Korean Surg. Soc.*, 83 (1): 21-29.
- ROMOND, E.H., PEREZ, E.A., BRYANT, J., SUMAN, V.J., GEYER, C.E. Jr, DAVIDSON, N.E., TAN-CHIU, E., MARTINO, S., PAIK, S., KAUFMAN, P.A., SWAIN, S.M., PISANSKY, T.M., FEHRENBACHER, L., KUTTEH, L.A., VOGEL, V.G., VISSCHER, D.W., YOTHERS, G., JENKINS, R.B., BROWN, A.M., DAKHIL, S.R., MAMOUNAS, E.P., LINGLE, W.L., KLEIN, P.M., INGLE, J.N. and WOLMARK, N. 2005. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N. Engl. J. Med.*, 353: 1673-1684.
- SALVESEN, G.S. and DUCKETT, C.S. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3: 401-410.
- SATO, T., IRIE, S., KRAJEWSKI, S. and REED, J.C. 1994. Cloning and sequencing of a cDNA encoding the rat Bcl2 protein. *Gene*, 140: 291-292.
- SCARTOZZI, M., BEARZI, I., MANDOLESI, A., GIAMPIERI, R., FALOPPI, L., GALIZIA, E., LOUPAKIS, F., ZANIBONI, A., ZORZI, F., BISCOTTI, T., LABIANCA, R., FALCONE, A. and CASCINU, S. 2011. Epidermal growth factor receptor (EGFR) gene promoter methylation and cetuximab treatment in colorectal cancer patients. *Br. J. Cancer*, 104: 1786-1790.
- SCHARF, J.G. and BRAULKE, T. 2003. The role of the IGF axis in hepatocarcinogenesis. *Horm. Metab. Res.*, 35: 685-693.
- SCHEFFER, G.L., SCHROEIJERS, A.B., IZQUIERDO, M.A., WIEMER, E.A. and SCHEPER, R.J. 2000. Lung resistance-related protein/major vault protein and vaults in multidrug resistant cancer. *Curr. Opin. Oncol.*, 12: 550-556.

- SCHLITT, A., JORDAN, K., VORDERMARK, D., SCHWAMBORN, J., LANGER, T. and THOMSEN, C. 2014. Cardiotoxicity and oncological treatments. *Dtsch. Arztebl. Int.*, 111 (10): 161-168.
- SELLERS, W.R. and FISHER, D.E. 1999. Apoptosis in cancer drug targeting. *Journal Clin. Invest.*, 104: 1655-1661.
- SERAFINI, M. and DEL RIO, D. 2004. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: Is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report*, 9 (3): 145-152.
- SHEPHERD, F.A., RODRIGUES PEREIRA, J., CIULEANU, T., TAN, E.H., HIRSH, V., THONGPRASERT, S., CAMPOS, D., MAOLEEKOONPIROJ, S., SMYLIE, M., MARTINS, R., VAN KOOTEN, M., DEDIU, M., FINDLAY, B., TU, D., JOHNSTON, D., BEZJAK, A., CLARK, G., SANTABÁRBARA, P. and SEYMOUR, L. 2005. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.*, 353: 123-132.
- SHERMAN, M. 2005. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening. *Semin. Liver Dis.*, 25 (2): 143-154.
- SIMUNEK, T., STERBA, M., POPELOVA, O., ADAMCOVA, M., HRDINA, R. and GERSL, V. 2009. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol. Rep.*, 61: 154-171.
- SOBHAKUMARI, A. 2013. Dual role of oxidative stress in head and neck cancer chemotherapy: cytotoxicity and pro-survival autophagy. Ph.D. Thesis, University of Iowa, 109 pp.
- SOLARY, E., DROIN, N., BETTAIEB, A., CORCOS, L., DIMANCHE-BOITREL, M.T. and GARRIDO, C. 2000. Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. *Leukemia*, 14: 1833-1849.
- SONG, O. 2004. Oxidative Stress: A theoretical model or biological reality? *CR Biologies*, 327: 649-662.
- STRATTON, M., CAMPBELL, P. and FUTREAL, A. 2009. The cancer genome. *Nature*, 458: 719-724.
- SYNOLD, T.W., DUSSAULT, I. and FORMAN, B.M. 2001. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux. *Nature Medicine*, 7: 584-590.
- TANG, X., CHEN, X., XU, Y., QIAO, Y., ZHANG, X., WANG, Y., GUAN, Y., SUN, F. and WANG, J. 2015. CD166 positively regulates MCAM via inhibition to ubiquitin E3 ligases Smurf1 and β TrCP through PI3K/AKT and c-

- Raf/MEK/ERK signaling in Bel-7402 hepatocellular carcinoma cells. *Cell Signal*, 27 (9): 1694-1702.
- TAŞYARAN, M.A. 2003. HBV infeksiyonu epidemiyolojisi. In: Tekeli E, Balık İ, eds. *Viral Hepatit*, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, ss: 121-128, Ankara.
- THOMAS, M. 1995. The role of free radicals and antioxidants: How do we know that they are working. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.*, 35 (1): 21-39.
- THOMAS, M.B., CHADHA, R., IWASAKI, M., GLOVER, K. and ABBRUZZESE, J.L. 2007. The combination of bevacizumab (B) and erlotinib (E) shows significant biological activity in patients with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) [Abstract]. *J. Clin. Oncol.*, 25: 214.
- THORGEIRSSON, S.S. and GRISHAM, J.W. 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.*, 31: 339-346.
- TOUCHETTE, N. and FOGLE, S. 1991. Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNIH. Res.*, 3: 75-78.
- TOYODA, H., KOMURASAKI, T., UCHIDA, D. and MORIMOTO, S. 1997. Distribution of mRNA for human epiregulin, a differentially expressed member of the epidermal growth factor family. *Biochem. J.*, 326: 69-75.
- TWELVES, C. J., DOBBS, N.A., MICHAEL, Y., SUMMERS, L.A., GREGORY, W., HARPER, P.G., RUBENS, R.D. and RICHARDS, M.A. 1992. Clinical pharmacokinetics of epirubicin: the importance of liver biochemistry tests. *Br. J. Cancer*, 66 (4): 765-769.
- ULAKOGLU, G. and ALTUN, S. 2004. The effects of epirubicin on proliferation and DNA synthesis of Ehrlich ascites carcinoma cells in vitro and in vivo. *Biologia*, 59 (6): 727-734.
- URSO, M.L. and CLARKSON, P.M. 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189: 41-54.
- VACA, CE, WILHELM, J. and HARMS-RINGDAHL, M. 1987. Interactions of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutat. Res.*, 195: 137-149.
- VALAVANIDIS, A., VLAHOGIANNI, T., DASSENAKIS, M. and SCOULLOS, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 64: 178-179.
- VAN CUTSEM, E., KÖHNE, C.H., HITRE, E., ZALUSKI, J., CHANG CHIEN, C.R., MAKHSON, A., D'HAENS, G., PINTÉR, T., LIM, R., BODOKY, G., ROH, J.K., FOLPRECHT, G., RUFF, P., STROH, C., TEJPAN, S., SCHLICHTING, M., NIPPGEN, J. and ROUGIER, P. 2009. Cetuximab and

- chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.*, 360: 1408-1417.
- VAN CUTSEM, E., LANG, I., D'HAENS, G., MOISEYENKO, V., ZALUSKI, J., FOLPRECHT, G, TEJPAR, S., KISKER, O., STROH, C. and ROUGIER P. 2008. KRAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J. Clin. Oncol.*, 26: 2.
- VERSLYPE, C., ROSMORDUC, O. and ROUGIER, P. 2012. Hepatocellular carcinoma: ESMO–ESDO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 23 (7): 41-48.
- VILLANUEVA, A., NEWELL, P., CHIANG, D., FRIEDMAN, S. and LLOVET, J.M. 2007. Genes and signaling pathways involved in the pathogenesis of HCC. *Semin. Liver Dis.*, 27: 55-76.
- VILLANUEVA, A., TOFFANIN, S. and LLOVET, J.M. 2008. Linking molecular classification of hepatocellular carcinoma and personalized medicine: preliminary steps. *Curr. Opin. Oncol.*, 20: 444-453.
- WAGENBLAST, J., BAGHI, M., ARNOLDNER, C., BISDAS, S., GSTTTNER, W., ACKERMANN, H., MAY, A., KNECHT, R. and HAMBEK, M. 2008. Effect of bortezomib and cetuximab in EGF-stimulated HNSCC. *Anticancer Res.*, 28: 2239-2243.
- WAGENBLAST, J., BAGHI, M., MORTEL, S., HIRTH, D., THRON, L., ARNOLDNER, C., GSTÖTTNER, W., MAY, A. and HAMBEK, M. 2009a. Does dexamethasone inhibit anticancer activity of cetuximab in squamous cell carcinoma cell lines of the head and neck. *Oncol. Rep.*, 22: 171-176.
- WAGENBLAST, J., BAGHI, M., ARNOLDNER, C., BISDAS, S., GSTOTTNER, W., ACKERMANN, H., MAY, A., HAMBEK, M. and KNECHT, R. 2009b. Cetuximab enhances the efficacy of bortezomib in squamous cell carcinoma cell lines. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 135: 387-393.
- WANG, C., GUO, L.B., MA, J.Y., LI, Y.M. and LIU, H.M. 2013. Establishment and characterization of a paclitaxel-resistant human esophageal carcinoma cell line. *Int. J. Oncol.*, 43 (5): 1607-1617.
- WANG, C.Y., MAYO, M.W. and BALDWIN, A.S. 1996 TNF-alpha and cancer therapy-induced cell death. *Science*, 274: 784-787.
- WANG, M., ZHANG, L., ZHAO, X., LIU, J., CHEN, Y. and WANG, C. 2014. Cetuximab in combination with icotinib overcomes the acquired resistance caused by EGFR T790M mutation in non-small cell lung cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 36 (9): 651-656.

- WANG, X.W., HUSSAIN, S.P., HUO, T., WU, C., FORGUEZ, M., HOFSETH, L.J., BRECHOT, C. and HARRIS, C.C. 2002. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology*, 181: 43-47.
- WANG, Y., DONG, L., BI, Q., LI, X., WU, D., GE, X., ZHANG, X., FU, J., ZHANG, C., WANG, C. and LI, S. 2010. Investigation of the efficacy of a bevacizumab-cetuximab-cisplatin regimen in treating head and neck squamous cell carcinoma in mice. *Target Oncol.*, 5: 237-243.
- WATANABE, T., SHINTANI, A., NAKATA, M., SHING, Y., FOLKMAN, J., IGARASHI, K. and SASADA, R. 1994. Recombinant human betacellulin. Molecular structure, biological activities, and receptor interaction. *J. Biol. Chem.*, 269: 9966-9973.
- WATANUKI, Z., KOSAI, H., OSANAI, N., OGAMA, N., MOCHIZUKI, M., TAMAI, K., YAMAGUCHI, K., SATOH, K., FUKUHARA, T., MAEMONDO, M., ICHINOSE, M., NUKIWA, T. and TANAKA, N. 2014. Synergistic cytotoxicity of afatinib and cetuximab against EGFR T790M involves Rab11-dependent EGFR recycling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 455: 269-276.
- WEI, W., GUO, R.P., LI, J.Q., XU, L., SHI, M. and ZHANG, Y.Q. 2008. Effects of cetuximab combined erlotinib on proliferation of human hepatocellular carcinoma cell lines Hep G2 and Bel-7402. *Ai Zheng*, 27(4): 386-392.
- WELLS, A. 1999. EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol*, 31: 637-643.
- WEN, Y., HAN, J., CHEN, J., DONG, J., XIA, Y., LIU, J., JIANG, Y., DAI, J., LU, J., JIN, G., HAN, J., WEI, Q., SHEN, H., SUN, B. and HU, Z. 2015. Plasma miRNAs as early biomarkers for detecting hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer*, 137 (7): 1679-1690.
- WILEY, H.S. 2003. Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling. *Exp. Cell Res.*, 284 (1): 78-88.
- WILHELM, S., CARTER, C., LYNCH, M., LOWINGER, T., DUMAS, J., SMITH, R.A., SCHWARTZ, B., SIMANTOV, R. and KELLEY, S. 2006. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 5: 835-844.
- WINSTON, G.W. 1991. Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100: 173-176.
- WONG, S.F. 2005. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. *Clin. Ther.*, 27: 684-694.
- WU, A.A., NIPARKO K.J. and PAI, S.I. 2008. Immunotherapy for head and neck cancer. *J. Biomed. Sci.*, 15: 275-289.

- WU, C.L., PING, S.Y., YU, C.P. and YU, D.S. 2012. Tyrosine kinase receptor inhibitor-targeted combined chemotherapy for metastatic bladder cancer. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 28 (4): 194-203.
- WUCHTER, C., KARAWAJEW, L., RUPPERT, V., BUCHNER, T., SCHOCH, C., HAFERLACH, T., RATEI, R. and DORKEN, B. 1999. Clinical significance of CD95, Bcl-2 and Bax expression and CD95 function in adult de novo acute myeloid leukemia in context of Pglycoprotein function, mutation stage, and cytogenetics. *Leukemia*, 13: 1943-1953.
- YAMADA, T., EGASHIRA, N., BANDO, A., NISHIME, Y., TONOGAI, Y., IMUTA, M., YANO, T. and OISHI, R. 2012. Activation of p38 MAPK by oxidative stress underlying epirubicin-induced vascular endothelial cell injury. *Free Radic Biol Med*, 52 (8): 1285-1293.
- YANG, Y., YAN, J., HUANG, Y., XU, H., ZHANG, Y., HU, R., JIANG, J., CHEN, Z. and JIANG, H. 2015. The cancer pain related factors affected by celecoxib together with cetuximab in head and neck squamous cell carcinoma. *Biomed Pharmacother*, 70: 181-189.
- YARDEN, Y. 2001. The EGFR family and its ligands in human cancer: signaling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer*, 37: S3-S8.
- YAROM, N., MARGINEAN, C., MOYANA, T., GORN-HONDERMANN, I., BIRNBOIM, H.C., MARGINEAN, H., AUER, R.C., VICKERS, M., ASMIS, T.R., MAROUN, J. and JONKER, D. 2010. EGFR expression variance in paired colorectal cancer primary and metastatic tumors. *Cancer Biol Ther*, 10: 416-421.
- YE, W.L., LIN, Z., LANG, X.L., QIAO, C.X., LI, X.Y., WANG, L.Y., MING, L. and LI, Y. 2008. Effects of cetuximab against human hepatocellular carcinoma cells HepG2 in vitro. *Journal of Sun Yat-Sen University (Medical Sciences)*, 05.
- YILMAZ, N. ve PENÇE, S. 2002. Kaspazlar. *İbni Sina Tıp Derg.*, 127-146.
- YOUNG, R.C., OZOLS, R.F. and MYERS, C.E. 1981. The anthracycline antineoplastic drugs. *N. Engl. J. Med.*, 305 (3): 139-153.
- YÜKSEL, B., HANDEMİR, KILIÇ, S., TAŞDEMİR, N. ve BATIOĞLU, S. 2008. Apoptosis ve kaspaz sistemi. *Jinekoloji obstetrik ve neonatoloji tıp dergisi*, 10: 58.
- ZHAO, Y.N., CAO, J., WU, F.X., OU, C., YUAN, W.P., MO, Q.G., WEI, W., LI, Y., SU, J.J. and LIANG, A.M. 2004. Expression and significance of EGF mRNA and EGFR mRNA in hepatocellular carcinoma. *Ai Zheng*, 23: 762-766.
- ZHU, A.X., STUART, K., BLASZKOWSKY, L.S., MUZIKANSKY, A., REITBERG, D.P., CLARK, J.W., ENZINGER, P.C., BHARGAVA, P., MEYERHARDT,

J.A., HORGAN, K., FUCHS, C.S. and RYAN, D.P. 2007. Cetuximab Phase 2 study of cetuximab in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 110: 581-589.

ZOLI, W., RICOTTI, L., TESEI, A., ULIVI, P., GASPERI, CAMPANI, A., FABBRI, F., GUNELLI, R., FRASSINETI, G.L. and AMADORI, D. 2004. Schedule-dependent cytotoxic interaction between epidoxorubicin and gemcitabine in human bladder cancer cells in vitro. *Clin Cancer Res*, 10 (4): 1500-1507.



ÖZGEÇMİŞ



Ayşe Erdoğan 1984 yılında Korkuteli/Antalya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Alanya’da tamamladı. 2003 yılında burslu olarak Haliç Üniversitesi Fen & Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü’ne girdi. 2007 yılında Moleküler Biyolog olarak ikincilik ile mezun oldu. 2007 yılında Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,

Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda doktora öğrenimine devam edip araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır.