



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP-MİKROBİYOLOJİ/İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ESOMEPRAZOL'ÜN KLASİK KEMOTERAPÖTİKLERLE
KOMBİNASYONLARININ AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİ VE PERİFERİK
KAN MONONÜKLEER HÜCRELERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Arzu YILMAZTEPE ORAL

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2011



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP-MİKROBİYOLOJİ/İMMÜNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ESOMEPRAZOL'ÜN KLASİK KEMOTERAPÖTİKLERLE
KOMBİNASYONLARININ AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİ VE PERİFERİK
KAN MONONÜKLEER HÜCRELERİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Arzu YILMAZTEPE ORAL

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL

Bursa-2011

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	III
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	
Akciğer kanseri	2
Epidemiyoloji	2
Etyoloji	3
Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi	6
Akciğer Kanseri Patolojisi	12
Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)	12
Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)	12
Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılan İlaçların Farnosötik Özellikleri	13
Tümör Mikroçevresi	15
Vakuoler-ATPazlar	
V-ATPazların Tümör Yayılımındaki Rolü	17
Antitümör İlaç Olarak Proton Pompa İnhibitörleri	19
GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
Hücre Kültürü	22
Kullanılan Besiyeri	23
Hücrelerin Sayılması ve İlaçların Uygulanması	23
Esomeprazol'un İlk Toksik Dozunun Belirlenmesi	23
Uygulanan İlaç Grupları	24
Deneylerde Kullanılan İlaç Konsantrasyonları	25
MTT Metodu	25
Canlı Hücrelerin Fotoğraflanması	26
M30 Antijen Ölçümü	26
ATP-TCA Metodu	27
Periferik Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu	28
DNA Siklus Analizi	29
İstatistiksel değerlendirme.....	29
BULGULAR.....	30
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	45
EKLER.....	49
KAYNAKLAR.....	54
TEŞEKKÜR.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	65

ÖZET

Tümör mikroçevresinin asiditesi kemoterapötiklere karşı dirençte önem taşıyan faktörlerden biridir. Asiditenin oluşmasında H^+ iyonunu hücre sitoplazmasından ekstrasellüler kompartmana taşıyan vakuolar H^+ ATPazlar (V-ATPazlar) denilen proton pompaları kritik rol oynarlar. Bu çalışmada bir proton pompa inhibitörü olan Esomeprazol'un klasik akciğer kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlarla kombinasyon halinde kullanıldığında akciğer kanseri hücre dizisi olan A549'un bu ilaçlara duyarlılığını arttırıp arttırmadığı araştırılmıştır. Bu amaçla akciğer kanseri tedavisinde kullanılan klasik ilaçlar olan sisplatin, karboplatin, pakiltaksel, dosetaksel, gemsitabin ve vinorelbin'in esomeprazol ile kombinasyonları uygulanan A549 hücresinde oluşturduğu sitotoksosite Metil Tiyazol Tetrazolyum (MTT) testi, ATP-TCA ve M30 ELISA gibi farklı metodlarla değerlendirilmiştir. Ayrıca, esomeprazol ile kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlar kombine edildiğinde sağlıklı normal lenfositler üzerine sitotoksik etkilerinin olup olmadığı da MTT ve akım sitometrik hücre siklusu analizleri ile incelenmiştir. İlk deneylerde, sadece esomeprazolün özellikle düşük dozlardaki sisplatin ve karboplatin ile kombinasyonlarının sitotoksitede belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı bir artışa yol açtığı gösterilmiştir. Bu artmış ölüm gemsitabin, vinorelbin, dosetaksel ve paklitaksel ile kombinasyonlarda gözlenmemiştir. Çalışmamızda esomeprazolün oluşturduğu sinerjik etki ATP-TCA testi ile tekrarlanan deneylerle de doğrulanıp kanıtlandıktan sonra hücre ölümünün mekanizmasını ortaya koymak için bir apoptoz belirteci olan M30 düzeyleri ölçülmüştür. Karboplatinin tek başına ve esomeprazol ile kombinasyonda gözlenen M30 artışı karboplatinin apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olduğunu ortaya koymuştur. Esomeprazolün sisplatin ile kombinasyonunda ise M30 artışı gözlenmemesi sisplatinin uygulanan dozlarda karboplatinden farklı olarak nekroz yoluyla hücre ölümüne yol açtığını düşündürmüştür. Esomeprazolün tek başına ve sisplatin veya karboplatin ile kombinasyonunun periferik kan lenfositleri üzerinde toksik etkilerinin bulunup bulunmadığı akım sitometrik hücre siklusu testi ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında esomeprazol dozunun artışına bağlı olarak apoptotik hücrelerde artış olduğu gösterilmiştir.

Bu tezde elde edilen veriler esomeprazolün tümörün kemoterapötiklere karşı duyarlılığını arttırarak ve kanser ilaçlarının yüksek dozda kullanılmasının yaratacağı yan etkilerden koruyabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer Kanseri, Sisplatin, Esomeprazol.

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ESOMEPRAZOLE COMBINED WITH CLASSICAL CANCER DRUGS ON LUNG CANCER CELLS AND PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

Acidity of tumour microenvironment is one of the important factors in resistance to chemotherapeutics. Proton pumps, referred as vacuolar H⁺ATPases (V-ATPases), play a critical role by transferring H⁺ ion from cell cytoplasm into extracellular compartment. In this study, to examine if Esomeprazole, a proton pump inhibitor, increases the sensitivity of A-549 cells, a lung cancer cell line, to classical drugs used for lung cancer treatment, when it is applied in combination. For this aim, the combination of classical drugs used for lung cancer treatment (cisplatin, carboplatin, paclitaxel, docetaxel, gemcitabine and vinorelbine) with esomeprazole were applied onto A-549 cells, and then, their cytotoxic effects were evaluated with different methods such as Methyl Thiazol Tetrazolium (MTT) Assay, ATP-TCA and M30 ELISA. Furthermore, the effect of esomeprazole alone and in combination with cancer drugs on lymphocytes were investigated with MTT and flow cytometric cell cycle analysis. In the first experiments, it was demonstrated that combinations of esomeprazole only with cisplatin and carboplatin lead to apparent and significant increase in cytotoxicity. This increased cytotoxicity was not seen in combinations with gemcitabine, vinorelbine, docetaxel and paclitaxel. After the synergic effect of esomeprazole were proved by repeated experiments with MTT and ATP-TCA, M30 (an apoptotic marker) levels were measured in order to determine the cell death mechanism. The increase of M30 levels in carboplatin alone and in combination with esomeprazole exhibit that carboplatin causes cell death by apoptosis. However, the fact that no increase was observed with cisplatin alone and in combination with esomeprazole suggested that cisplatin, unlike carboplatin, leads to cell death by necrosis. Finally, MTT and flow cytometric cell cycle analysis were applied to investigate whether esomeprazole alone or in combination with cisplatin or carboplatin has any cytotoxic effect on peripheral blood lymphocytes. When compared with control group apoptotic cell ratio was dose-dependently increased with both esomeprazole alone and in combination with cisplatin or carboplatin.

The data obtained in this thesis suggest that esomeprazole augments the sensitivity of tumour cells to chemotherapeutics, and also, may protect the host from side effects caused by the use of high doses of cancer drugs.

Key Words: Lung Cancer, Cisplatine, Esomperazole.

GİRİŞ

Malignitelerden meydana gelen ölümlerde ilk sırayı akciğer kanseri almaktadır. Akciğer kanserli hasta sayısında her yıl % 0,5 oranında artış görülmekte ve dünyada yılda yaklaşık 1 milyon kişi bu kanserden ölmektedir (1). Akciğer kanserlerinde 5 yıllık sağ kalımı oranı sadece % 14 civarındadır (2). Akciğer kanserinin kabul gören en iyi tedavi şekli cerrahi rezeksiyondur (3, 4). Cerrahi tedavinin başarısı ise ancak hastalığa erken evrede tanı konması ile mümkün olmaktadır (5, 6). Küçük hücre dışı akciğer kanserinde (KHDAK) tanı konulduğunda olguların sadece %33'den daha azı cerrahi rezeksiyona uygundur.

Akciğer kanserlerinin bir çoğu erken dönemde bulgu vermediği için, teşhiste geç kalınmaktadır (7, 8). Tüm yeni gelişen tanısal metotlara rağmen, olguların çoğunda, tanı konulduğunda saptanan tümör akciğerde sınırlı değildir. Hastalığın evresine göre multimodal tedavi seçenekleri de gündeme gelmektedir. Lokal ve sistemik adjuvan tedavilerdeki gelişmeler tedaviye dirençli metastazlardan kaynaklanan ölümleri engelleyememektedir. Farklı organlarda ve aynı organın farklı bölgesinde oluşan metastazların cerrahi, radyoterapi (RT) ve kemoterapi (KT) ile tamamen eradikasyonu neredeyse imkansız olup kanser tedavisinin en önemli sorununu oluşturmaktadır. Bu nedenle özellikle cerrahi şansını yitirmiş hastalar için kemoterapötik ajanlara direnç büyük önem taşımaktadır.

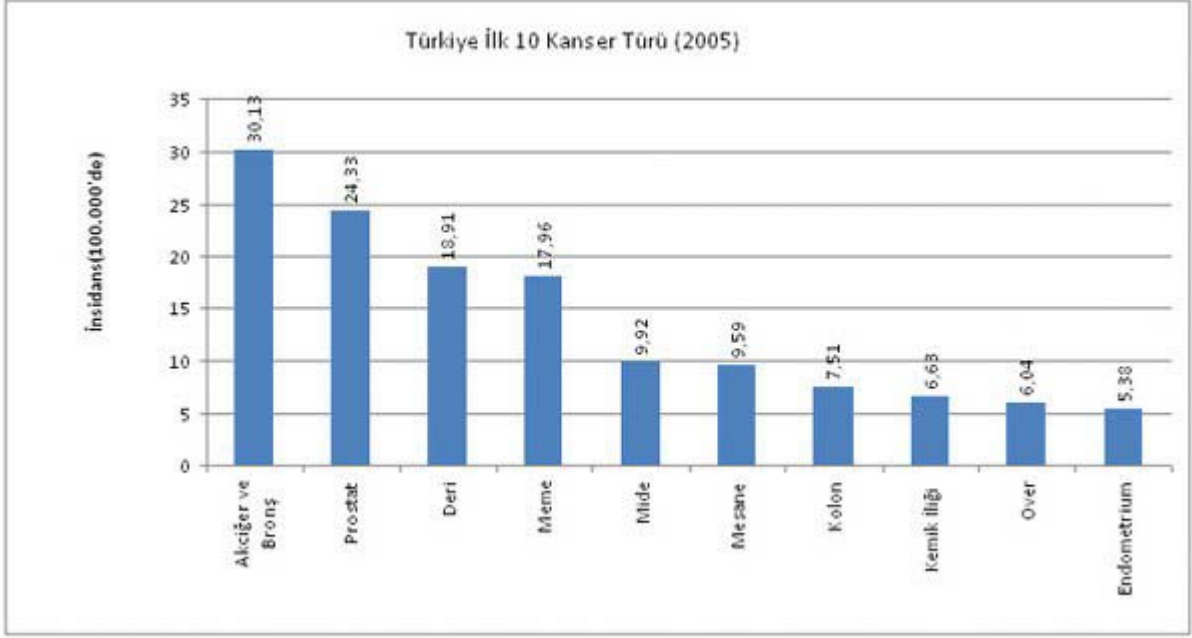
Kemoterapötik ajanlara karşı dirençte tümör mikroçevresinin asiditesi önem taşıyan faktörlerden biridir. Asiditenin oluşmasında, H^+ iyonunu hücre sitoplazmasından ekstrasellüler kompartmana (ESK) taşıyan vakuolar H^+ ATPazlar (V-ATPazlar) denilen proton pompaları kritik rol oynarlar. Dolayısıyla V-ATPazları inhibe etmeye yönelik terapötik yaklaşımların antineoplastik ajanlara karşı duyarlılığı arttırıcı veya direnci kırıcı etki göstermesi beklenir.

GENEL BİLGİLER

Akciğer Kanseri

Epidemiyoloji

Akciğer kanseri erkeklerde kanser ölümlerinin % 34'ünü, kadınlarda ise % 22'sini oluşturmaktadır. Bütün dünyadaki kanserler arasında % 12,8 (yılda 1 milyon yeni olgu) oranında görülmektedir ve kanser nedeniyle meydana gelen ölümlerinin % 17,8'ini oluşturmaktadır. Sadece 2000 yılında yeni tanı alan 1,2 milyon akciğer kanserli olgu olup, bunların da % 52'si gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Erkeklerde en sık, kadınlarda ise 5. sıklıkta görülen kanserdir. İnsidansı özellikle 65 yaş ve üzerinde artmaktadır (1, 9). Sigaranın, etiyojisinde büyük rol oynaması nedeniyle önlenabilir bir kanser türü olarak kabul edilmektedir. Endüstrileşme ve sigara içiminin artmasıyla birlikte 1950'li yıllardan günümüze insidansı giderek artmıştır. Kadınlarda bu artış daha da belirgin gözlenmekte ve görülme yaşı da düşmektedir. Maalesef mortalitesi yüksek ve tedaviye rağmen 5 yıllık yaşamın hastaların sadece % 10-15'inde sağlandığı bir hastalıktır (1, 9). Sosyoekonomik düzeyi düşük kesimlerde ve kentsel bölgelerde akciğer kanseri daha fazla görülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde, Avrupa, Avusturalya, Yeni Zelanda ve Doğu Asya daha sık görülen ülkelerdir. Sağlık Bakanlığı verilerine göre 1999-2005 yılları arasında ülkemizdeki kanser insidansı giderek artmış ve 2005 yılındaki kanser insidansı da 173,85/100000 şeklinde bildirilmiştir. 2005 yılında 8 ilde yapılan inceleme sonucunda akciğer kanserinin 30,13/100000'lik insidansla ilk sırada yer aldığı saptanmıştır (Şekil-1). Yine 2005 yılı Türkiye istatistiklerine göre erkeklerdeki kanser insidanslarına bakıldığında 52,73 /100000'lik insidans ile akciğer kanseri birinci sırada yer alırken kadınlarda 7,2/100000 insidans ile 4. sırada bulunmaktadır (10).



Şekil-1: Türkiye’de sık görülen ilk 10 kanser türünün dağılımı (10).

Etiyoloji

1. Sigara içimi

Akciğer kanserinin patogenezinin % 85-90 oranında sigara sorumludur. Günlük içilen sigara sayısı ve süresi erken yaşta sigaraya başlanması, yüksek katran içerikli ve filtresiz sigara içilmesi akciğer kanseri riskini arttırmaktadır. Bu artmış kanser riski sigarayı bırakma süresi ile doğru orantılı olarak azalmaktadır. Günde bir paket ve üzeri ile, 20 yıl ya da daha fazla süre sigara içenlerde akciğer kanseri riski 10-65 kat daha fazladır. Sigarayı bıraktıktan sonraki 5. yıldan itibaren risk azalmaktadır (11, 12). Pipo, puro ve çığneme tütün kullanımında, karsinojen konsantrasyonuna bağlı olarak akciğer kanseri riski artmakla beraber sigara kullanımından daha düşüktür. Pasif sigara içimi bile akciğer kanseri riskini % 20 arttırmaktadır (11, 13). Akciğer kanserinin histolojik tip dağılımı da sigara içen ve içmeyenler arasında farklılık göstermektedir. Adenokarsinom sigara içmeyenlerde her iki cinstede daha sık görülmekteyken, epidermoid karsinom sigara içen erkeklerde, küçük hücreli akciğer karsinomu ise sigara içen kadınlarda daha sık rastlanmaktadır (14).

Sigaradaki karsinojenler, kokarsinojenler ve tümör promotörleri, DNA’ya kadar ulaşarak DNA’da hatalı kodlama ve mutasyon oluşturarak akciğer kanserine neden olur.

2. Radon

Akciğer kanserine yol açan en önemli etiyolojik faktörlerden biridir. Uranyumun kırılmasıyla doğal olarak oluşan bir gazdır. Toprak ve suda bulunur. Konutlarda ortama yayılan parçalanma ürünlerinin inhalasyonu ile radonun karsinogenik etkisine maruz kalınmaktadır. Akciğer kanserinin etiyolojisinden %10-14'ünden radonun sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (15).

3. Mesleki Maruziyet

Bazı mesleki ajanlara maruziyet sonucunda akciğer kanseri 1,3-1,6 kat daha sık görülmektedir. Mesleki akciğer kanserli olguların yarısından fazlası asbest maruziyeti ile ilişkilidir. Asbest gemi, uçak, otomobil, inşaat ve tekstil sektöründe kullanılmakta olan doğada bulunan, ısıya ve kimyasal maddelere dayanıklı olan bir grup fibröz silikatın genel adıdır. Türkiye'de İç Anadolu ve Diyarbakır'da çevresel asbest maruziyeti mevcuttur. Akciğer kanseri asbest liflerinin inhalasyonuna bağlı olarak gelişebilmekte ve bu risk kümülatif asbest maruziyetiyle orantılı artmaktadır. Sigara ile beraber asbest maruziyeti akciğer kanseri riskini sinerjistik olarak arttırmaktadır (16). Asbestten başka mesleki olarak radon, krom, nikel, kömür, kadmiyum, uranyum parçalanma ürünleri, demir, arsenik, alüminyum, polisiklik hidrokarbonlar ve formaldehite maruz kalmak akciğer kanseri riskini arttırmaktadır (17).

4. Beslenme

Bazı gıdalar akciğer kanserine karşı koruyucu görev üstlenir. İçerdiği antioksidan ve vitaminler sayesinde bilinen en önemli koruyucu beta karotenlerdir. Elma, greyfurt, kırmızı şarap, domates, havuç, brokoli ve çayda bulunan flavonoidlerin akciğer kanserine karşı koruyucu olabileceği gösterilmiştir. Zeytinyağı, omega-3 ve omega-6 yağ asitlerinden zengin diyetin akciğer kanserini azalttığı tespit edilmiştir (18). Sigara içiminin diyetle alınan vitaminlerin seviyesini özellikle de vitamin C'nin seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. Taze sebze ve meyve, vitamin C, karotenoidlerin (özellikle beta karotenin) akciğer kanseri riskini sigara içicilerde ve içmeyenlerde, tüm histopatolojik tipler için ve her iki cinsiyette azalttığı bilinmektedir (18, 19). Yeşil çayın kanserden koruyucu özelliği olduğu ve metastazı önlediği,

doymuş yağlardan ve kolesterolden zengin diyetin akciğer kanseri riskini arttırdığı, folat eksikliğinin de bronşiyal epitelde premalign lezyonlara neden olduğu ileri sürülmektedir (18, 19).

5. Hava Kirliliği

Hava kirliliğinin akciğer kanseri üzerinde etkisini ölçmek, maruziyet miktarının ölçülmesi güç olduğundan dolayı zordur. Şehirlerde yaşayanlarda akciğer kanseri insidansı kırsal kesimde yaşayanlara göre 1,2-1,3 kat daha fazladır. Başta poliaromatik hidrokarbonlar, arsenik, nikel, krom gibi metaller olmak üzere fosil yakıt ürünleri, motorlu araçların egzoz dumanı ve kömür dumanı hava kirliliği yapan karsinojenik etkenlerdir (20).

6. Geçirilmiş Akciğer Hastalıkları

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), tüberküloz, silikozis ve akciğer fibrozisi akciğer kanseri riskini arttıran hastalıklardır. Karsinojenlerin hücrelere penetrasyonu sonucu akciğer dokusunda meydana gelen inflamasyonun buna neden olabileceği ileri sürülmektedir. Bu hastalıklar içinde akciğer kanseri için en yüksek riskli hastalık % 8,8 ile KOAH'dır (20).

7. Aile öyküsü ve genetik yatkınlık

Ailede akciğer kanserli hastaların varlığı hem sigara içen ve hem de içmeyen akrabalarında akciğer kanseri riskinin 2,4 kat arttırdığı bildirilmektedir. Artmış ailesel riskin, yaş, cinsiyet, mesleksi maruziyet ve sigara içiciliğinden bağımsız olduğu, akciğer kanserine predispozisyon yaratan nadir bir otozomal genin Mendelyen kodominant kalıtımı ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (15). Aslında, tüm sigara içicilerin % 10-20'sinde akciğer kanseri gelişimi, genetik yatkınlığın önemine işaret etmektedir. Genetik aktarım, sigaradan sonra en önemli risk faktörüdür. Genetik aktarım temelde iki enzimatik grupla ilişkilidir. Bunlar multipl genler tarafından kodlanan faz I ve faz II enzim sistemleridir. Temelde sitokrom p450 süperailisi, glutatyon S-transferaz ve N-asetil transferaz süperailisi bu gen gruplarını oluşturmaktadır. Faz I enzim sistemi, ekzojen maddeleri reaktif bileşenlere dönüştürme yeteneğine sahiptir. Faz II enzim sistemi ise, konjugasyon veya suda çözünürlüğü değiştirerek bu maddelerin eliminasyonunu sağlayabilmektedir. Bu enzim sistemlerinin karsinojenlere

karşı az veya daha fazla başarılı olmasının genetik aktarım ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir (15, 21).

Akciğer kanseri ile ilişkili olan gen grupları; faz I genleri olan CYP1A1, CYP2D6, CYP2A6, CYP2C9, CYP3A4, CYP2E1 ve faz II genleri olan GSTM1, GSTT1, GSTP olup en çok suçlanan genler ise CYP1A1, CYP2D6 ve GSTM1'dir (15, 21).

Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Son 20 yıl içinde akciğer kanserinin moleküler biyolojisindeki gelişmeler sonucunda belirli hasta gruplarında adjuvan tedavi, konvansiyonel sitotoksik kemoterapi ve özel hedeflenmiş ajanların tedavide kullanımları gündeme gelmiştir. Bu nedenle artık uzun süreli sağ kalımı belirleyecek moleküler biyolojik bilgilere dayanan yeni evreleme sistemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (22).

Akciğer kanserinin gelişmesinde rol oynayan başlıca moleküler mekanizmalar şöyle sıralanabilir (22):

- I- Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu
- II- Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu
- III- Hücre siklus regülasyonunda görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler
- IV- DNA tamirinde görev alan genlerde ortaya çıkan değişiklikler
- V- Büyüme faktörleri ve reseptörlerine ilişkin değişiklikler.

Akciğer Hücrelerinin Karsinogenezisi

1. Ras ailesi

Ras ailesi; H-ras, K-ras ve N-ras genlerinden oluşmaktadır ve özellikle bu genlerdeki nokta mutasyonlar kanser gelişiminde rol oynamaktadır. Bu mutasyonlar, ras ailesinin GTPaz aktivitesini değiştirebilmekte ve bunun sonucu olarak sürekli sinyal aktiviteleri ortaya çıkmaktadır. Sinyal kaskadında oluşan bu mitojenik uyarılar, malign transformasyona neden olmaktadır (23, 24). Bunlardan K-ras mutasyonu çoğunlukla 12. kodonda görülmektedir. En sık görülen K-ras mutasyonu küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinin (KHDAK) % 15-50'sinde saptanmaktadır. K-ras mutasyonu görülenlerde sağ kalımda azalma, erken relaps ve kötü prognoz görülmektedir. K-ras mutasyonu sigara içimi ile ilişkilidir. Sigara içen akciğer

kanserli olgularda, hiç içmemiş olanlara göre K-ras mutasyonu daha sık görülmektedir (22, 23).

2. Myc Ailesi

Myc genleri, DNA'ya bağlanan üç nükleer fosfoproteini kodlar. Bu proteinler hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında etkili olup DNA sentezinin başlamasında rol almaktadırlar. C-myc, N-myc ve L-myc'den oluşan myc geni sıklıkla amplifikasyon ve transkripsiyonel disregülasyon ile onkogen haline dönüşmektedir. Küçük hücreli akciğer kanserlerinin (KHAK) % 18-31'i, KHDAK'lerinin ise % 8-20'sinde myc aktivasyonu izlenmektedir. C-myc'in, tümör büyüme hızında artış ve sağ kalımda kısalma ile ilişkili olduğu öne sürülmektedir (25, 26).

3. Retinoblastom (RB) Geni

Retinoblastom (RB) geni hücrel farklılaşmada çok önemli bir role sahiptir. Normalde RB ailesi hücre siklusunu G1 fazında inhibe etmektedir. Bu yoldaki proteinlerin fonksiyon bozukluğu mitojenik aktivite ile sonlanmaktadır. Retinoblastom protein yokluğu KHAK'lerinin hemen hepsinde görülürken, KHDAK'lerinin sadece % 10-30'unda görülmektedir. Retinoblastom gen inaktivasyonu, özellikle RB ve osteosarkom tümör hücrelerinde gösterilmiştir. Mutasyon ve delesyonlara bağlı olarak inaktive oldukları diğer maligniteler arasında özofagus ve meme kanserleri de sayılabilir (24, 27).

4. Apoptoz Genleri: p53 ve Bcl-2

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış, ilk olarak nekroz tanımlanmıştır. 1972 yılında, ilk defa Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patologlar iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdaki daha farklı bir yolla ölen hücreleri fark etmişler ve buna, ağaç yapraklarının koparak dökülmesi anlamına gelen apoptoz adını vermişlerdir (28). Nekroza giden hücreler plazma membran bütünlüğünü kaybederken, apoptotik hücrelerin membranı sağlamdır. Nekrozda hücre şişerken apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekrozda hücrelerin kromatin paterni hemen hemen normal iken apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanmış ve yoğunlaşmış şekildedir. Apoptozun en önemli özgül yönü DNA'nın

internükleozomal bölgelerden parçalanmasıdır. Nekrotik hücre sonradan lizise uğrar, apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanarak apoptotik cisimcikler oluşur. Nekroz sonucunda inflamatuvar yanıt oluşurken apoptoz inflamasyona yol açmaz (29-31).

Hücresinin apoptoza gidebilmesi için ilk önce ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir uyarana karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içinden veya dışından gelebilir (32). Hücre dışı uyarılar arasında hücre ölüm proteinleri, tümör nekrozis faktör, koloni uyarıcı faktörler, nöron büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü, interlökinler gibi maddelerin ortamdaki düzeylerinin değişmesi, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler ve virüsler vardır. Apoptozu etkileyen hücre içi uyarılar arasında sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarında artış, tümör nekrozis faktör (TNF), DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpresör gen olan p53'ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar, glukokortikoidler ve onkojenlerin yer aldığı bilinmektedir. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler düşük dozlarda apoptoza yol açabilmektedir. Apoptozda hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de bazen apoptoz dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersi nekroz apoptoz gelişmesine yol açabilir. Bunlara ilaveten organizmada apoptozu uyarıcı veya düzenleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (33).

Apoptoz sürecinde belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bunlar; Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 proteindir. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur (34).

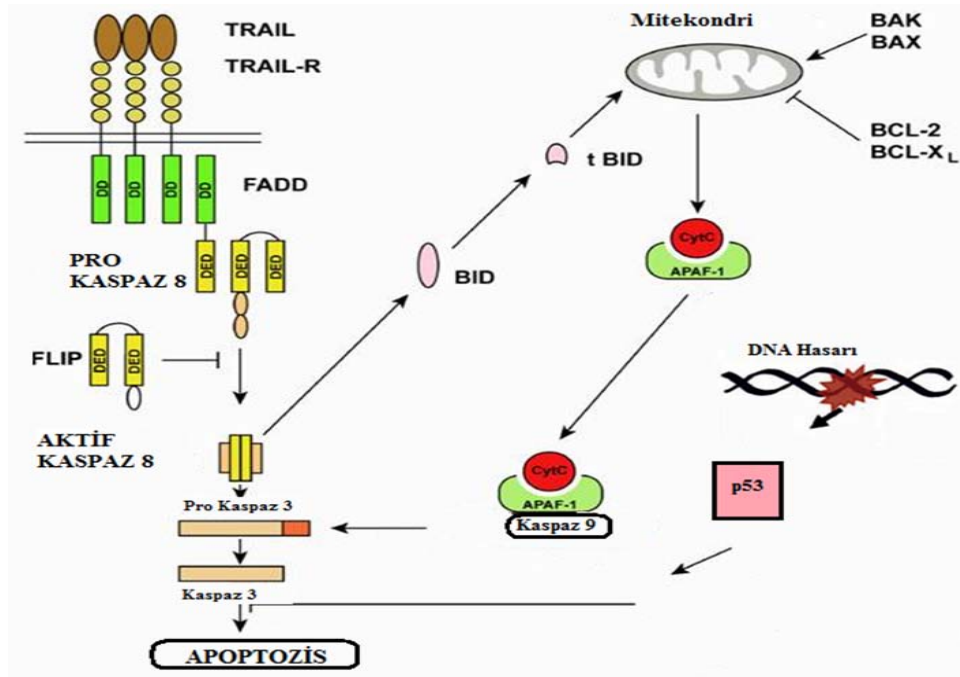
Kaspazlar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein içeren, sistein proteazlar olarak adlandırılan enzimlerdir. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozda rol almaktadır. Bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek preteolitik bir kaskada (şelale tarzı reaksiyon dizisi) neden olurlar.

Hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas'ın (diğer isimleriyle APO-1, CD95) FasL ve tümör nekrozis faktör reseptörü-1 (TNFR-1)'in TNF ile etkileşime girmesi (uyarılması) sonucu apoptoz indüklenir. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde,

akciğerlerde, hatta miyokarda bulunur. FasL özellikle sitotoksik T hücreleri ve NK hücreleri üzerinde bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein-protein etkileşimi gerçekleşir. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri adı verilen TRADD ve FADD ile etkileşime girerler. Bu ölüm bölgeleri ise kaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar. Aktive olan kaspaz 8 daha sonra gelen diğer uygulayıcı kaspazları aktive eder (35). Kaspaz 8, ya sitokrom c'nin mitokondriden salgılanmasına ya da kaspaz 3'ü aktive ederek DNA fragmentasyonuna neden olur (36). Bu mekanizmalar kaspaz-bağımlı apoptoza özgüdür, oysa kaspaz-bağımsız apoptozun varlığı da bilinmektedir. Kaspaz-bağımsız apoptoz yine mitokondriden salınan bir faktör olan apoptoz indükleyici faktörün etkisiyle gerçekleştirilir (37).

Bcl-2 ailesi; üyelerinin bir kısmının apoptozu indüklediği (pro-apoptotik: Bax, Bad, Bid, Bcl-X_s), bir kısmının ise inhibe ettiği (anti-apoptotik: Bcl-2, Bcl-X_l) geniş bir ailedir. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu bu ailenin pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozun inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Bax sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada küçük delikçikler oluşumuna neden olur, böylece normalde selektif olan iyon permeabilitesi kaybolur, sonuçta sitokrom c ve apoptoz indükleyici faktörün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar. Sitokrom C, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması apoptoz yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğinin işaretidir. Sitokrom c sitoplazmik protein olan Apaf-1'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz 9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder. Oluşan aktif kaspaz 3 sayesinde deoksiribonükleaz serbestleşir ve bu da apoptozun karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur. KHAK'lerinin % 70-90'ında Bcl-2 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bcl-2 salınımının kemosenitivite, uzun süreli sağ kalım ile ilişkisi ortaya konulmuştur. Bcl-2/Bax oranı, hücrenin apoptotik duyarlılığını belirlemede de kullanılabilir (24, 38).

Apoptoz p53 proteininin indüklenmesi ile de başlatılabilmektedir. p53, hücrede bir şekilde (radyasyon, kemoterapi etkisiyle) DNA hasarı (tek ya da çift zincir kırıkları, nükleotid eksikliği) oluştuğunda, eğer hasar onarılabilecek düzeyde ise hücre siklusunu G1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse bu durumda p53 apoptozu indükler. p53'ün apoptozu indüklemesi Bax'ın ekspresyonunu artırması böylece Bcl-2/Bax oranını değiştirmesi yoluyla gerçekleşir (Şekil -2).



Şekil-2: Apoptozun moleküler mekanizmaları (39).

Hücrelerin normal apoptotik ölümden kaçmalarını sağlayan bir yetenek kazanmaları hemen bütün kanser hücrelerinde gözlenen bir özelliktir. Tümör hücreleri ya anti-apoptotik proteinlerin aşırı üretimi ya da pro-apoptotik proteinlerin üretim ya da etkilerinin azalmasıyla apoptoza dirençli bir nitelik kazanırlar. p53 yoluyla başlatılan apoptoz yolundaki proteinlerin üretim ya da işlevlerindeki bozukluklar insanlardaki kanserlerin neredeyse yarısında etkili olmaktadır (40). Bu gen insan kanserlerinde görülen en sık mutant gen olup, 17p13 lokusunda yerleşmiştir. p53 mutasyonları tüm kanserlerin % 50'sinde görülürken, KHAK'lerinin % 90'ında, yassı hücreli akciğer kanserlerinin % 65'inde, büyük hücreli kanserlerin % 60'ında ve

adeno kanserlerin % 33'ünde gösterilmiştir. Genellikle karsinogenezin erken basamaklarında görülen p53 mutasyonlarında hücreler bölünmeye devam ederler. K-ras geninde belli bir noktada mutasyon olurken, p53 mutasyonları 17. kromozom üzerinde tüm gen boyunca oluşabilmektedir. Bunlar genellikle allelik kayıplar ve somatik missense mutasyonlar şeklindedir. Bu mutasyonlar sonucunda, hem tümör süpresyon fonksiyonlarında kayıp, hem de onkojenik fonksiyon kazanma şeklinde çift etki ortaya çıkabilmektedir (26, 27). Çalışmalarda klinik olarak akciğer kanseri tanısı konmadan bir yıl önce alınan balgam örneklerinde p53 ve ras mutasyonlarının varlığı gösterilmiştir. Bu nedenle erken tanıda önem taşıdıkları ileri sürülmektedir (26, 27). Akciğer kanserindeki p53 mutasyonları sigara içimi ile ilişkilidir. Sigara dumanı maruziyeti, p53 mutasyonu gelişme riskini artırmaktadır. Mutasyonların çoğu sigara dumanındaki karsinojenlerin oluşturduğu G-T transversiyonudur. Sigara içen akciğer kanserli olgularda G-T transversiyonu içmeyenlere göre daha yüksek bulunmuştur (24, 27).

5. Nikotin ve Opioid Reseptörleri

Akciğer kanseri hücrelerinde nikotin ve opioid reseptör ekspresyonu mevcuttur. Opioidler, kanser hücrelerini baskılamakta ve apoptozisi uyarmaktadırlar. Aksine nikotin reseptörleri, opioidlerin apoptotik etkilerini antagonize etmektedirler. Nikotin-opioid etkileşiminin, akciğer kanserinin 3/4'ünde görüldüğü ileri sürülmektedir (24, 38).

6. Gastrin Salan Peptid (GRP)

Akciğer kanserinin en iyi tanımlanan otokrin sistemi, gastrin salan peptid (GRP), diğer bombesine benzer peptidler (GRP/BN) ve bunların reseptörlerini içermektedir. Bunlar büyüme ve nöromodülasyon gibi fizyolojik etkilere sahiptir. İmmünohistokimyasal çalışmalar, KHAK'lerinin yaklaşık % 20-60'ının GRP eksprese ettiğini, oysa KHDAK'lerinde bunun çok az olduğunu göstermektedir. Uzun süre sigara dumanına maruz kalan bireylerin solunum sistemi epitelinde GRP reseptör mRNA'nın ekspresyonunun artması ve BN- benzeri peptidlerin *in vitro* mitojenik etkilere karşı solunum yolu epitel hücrelerinin verdiği yanıtı eşlik etmesi, bu sistemin akciğer kanseri patogenezinin erken döneminde rolü olduğunu ortaya koymaktadır. Bu etkilerin sigara içimi bırakıldıktan sonra da sürdüğü gösterilmiştir (27, 38).

7. ERBB-2

KHDAK'inde nörogulin reseptörleri olan ERBB-1 ve ERBB-2, transmembran reseptörü tirozin kinazların bir ailesidir. Nörogulinler ve ERBB ailesi akciğer kanserindeki diğer potansiyel büyümeyi uyaran halkaları oluşturabilirler. KHDAK'lerinin % 30'undan fazlasında, özellikle adeno karsinomlarda ERBB-2 oldukça yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Yüksek ERBB-2 düzeyleri çoklu ilaç direnci fenotipi ve KHDAK'lerinde artmış metastatik potansiyel ile ilişkilidir (27, 38).

Akciğer Kanserinin Patolojisi

Primer akciğer tümörlerinin % 95'i adenokarsinom, epidermoid karsinom, KHAK, büyük hücreli karsinom ve bunların kombinasyonlarından oluşmaktadır (41).

Akciğer kanseri insidansının aniden artmaya başladığı 1930'lu yıllardan itibaren skuamöz hücreli karsinom en çok görülen histolojik tiptir. Adenokarsinoma ise 1970'li yıllardan itibaren her iki cinsiyette ve her üç ırkta artış göstermiştir. Günümüzde Avrupa'da skuamöz hücreli karsinom, Amerika Birleşik Devletleri ve Japonya'da en sık adenokarsinoma görülmektedir (11).

Akciğer kanserleri geniş bir histopatolojik sınıflamaya sahip olsa da temelde iki tipe ayrılır: Küçük hücreli akciğer kanserleri (KHAK) ve küçük hücre dışı akciğer kanserleri (KHDAK).

Küçük Hücreli Akciğer Kanserleri (KHAK)

Tüm akciğer kanserlerinin %15-25'ini oluşturur. Lokalize kabul edilen tümörlerde bile çoğunlukla subklinik sistemik yayılım vardır. Tümör hızla büyür ve kısa sürede metastaz yapar. En sık kemik, kemik iliği, karaciğer, beyin, adrenal bez, mediastinal ve retroperitoneal lenf bezlerine metastaz yapar. Ancak, her organa metastaz mümkündür.

Tedavi primer olarak kemoterapidir ve %80-90 oranında yanıt alınır. Ancak bunların yaklaşık %40-50'si tam yanıt şeklindedir. Sınırlı hastalık olan kişilerde kısmi cevap sonrasında tümör yatağına 5000cGy dozunda küratif amaçlı RT verilir. Bu uygulama ile lokal nüks azalır. KT ve RT ile genel sağ kalım uzar ancak tedavinin toksisitesi yüksektir. KT sonrası kısmi cevap görülen hastaların bir kısmına cerrahi uygulanabilir. Tam cevap halinde

ise profilaktik kraniyel ışınlama yapılarak sağ kalım uzatılır. Yaygın hastalık durumunda uygun KT yapılır. Tümör yerleşimine ve semptomlara göre palyatif RT de yapılabilir (42).

Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)

İnsidansı 100.000’de 40’dır. Epidermoid tipte karsinom erkekte yaygın ve sigara etiyojisi kesin iken, kadınlarda adenokarsinom sıklığı ve sigara ile ilişkisi gösterilememiştir.

Tercih edilecek tedavi öncelikle cerrahidir. Yaygın N2 beraberliğinde Evre IIIA varsa, Evre IIIB ve IV hastalar inoperabl kabul edilerek KT ve/veya RT uygulanır. Evre IIIB hastalarda neoadjuvan KT ve/veya RT sonrası tümör küçülürse cerrahi denir (42).

Akciğer Kanseri Tedavisinde Kullanılan İlaçların Farmosötik Özellikleri

1. Sisplatin

Bir platin diaminoklorürdür (cis-diamindikloro platinum, CDDP). DNA çift zincirlerine zincir arası ve zincir içi çapraz bağlanır. Bu nedenle etki mekanizması bifonksiyonel alkilleyici ilaçlara benzemektedir. DNA’nın replikasyon ve transkripsiyonunu bozar. Sadece intravenöz olarak uygulanır. Plazma proteinlerine %90 oranında kısmen irreversibl olarak bağlanır. Plazma yarılanma ömrü 60 saattir. Böbrek yoluyla vücuttan atılır. Ancak uygulanmasından 4 ay sonra bile böbrek dokusunda varlığı saptanabilir. Geniş spektrumlu bir antineoplastik ajandır. Testis, over, mesane, prostat, serviks, özefagus, akciğer, baş-boyun, osteojenik osteosarkom ve nöroblastom gibi solid tümörlerin tedavisinde kullanılır. Miyelosüpresif etkisi orta derecede olup kombinasyonlar için elverişli bir ilaçtır. En ciddi yan etkisi doza bağımlı nefrotoksisitedir. Bunun dışında ototoksisite, hipomagnezemi, hipokalsemi, periferik nöropati gibi yan etkileri mevcuttur. Doza bağımlı bulantı kusma yapabilir. Ayrıca mutajenik, teratojenik ve karsinojenik bir ilaçtır. Alerjik reaksiyonlara da neden olabilir (43).

Sisplatine karşı direnç mekanizmaları:

- 1- İlacın membrandan taşınımında değişiklik
- 2- Glutasyon’un hücre içi düzeyindeki değişiklik
- 3- Sülfidril içeren proteinlerin düzeyindeki değişiklik
- 4- Sisplatinin neden olduğu DNA hasarının onarımı düzeyindeki değişiklik (44)

2. Karboplatin

Sisplatin kadar güçlü bir antineoplastik ilaçtır. Ancak renal toksisite, ototoksisite, nörotoksisite ve emetik etkisi daha düşüktür. Miyelosüpresif etkisi sisplatine nazaran daha fazladır ve özellikle trombositopeniye yol açar. Sisplatinin etkin olduğu tüm hastalıklarda kullanılabilir (43). Klinik olarak sisplatin ile karboplatin çapraz direnç gösterebilir.

3. Gemsitabin

Bir nükleozid analogudur. Hücre döngüsü fazına spesifik olup özellikle S fazındaki hücreleri öldürür. Hücreleri S fazında tutarak G1 fazına ilerlemesine engel olur. Hücre içinde aktif difosfata ve trifosfata metabolize olur. Ribonükleotid redüktazı inhibe eder. DNA yapısına katılmak için deoksisitidin trifosfatla (dCTP) yarışır. Hemen hemen tamamı aktif ilaç ve metabolitleri şeklinde idrarla atılır. Miyelosüpresyon doz kısıtlayıcı toksisitesidir. Bunun dışında grip benzeri tabloyla beraber ateş, bulantı, kusma, diare, stomatit, döküntü gibi yan etkilere neden olabilir (44). Ön ilacın hücre içine taşınma sistemlerinde ve/veya ilaç metabolizmasında rol oynayan enzimlerin düzeylerinde meydana gelen değişiklikler bu ilaca karşı direnç gelişmesinde rol oynayabilir (43).

4. Paklitaksel

Taxus brevifolia bitkisinden elde edilmiş taksan türevi kompleks diterpen esterleridir. Tümör hücrelerinde tübülün sentezinin temel taşları olan oligomerik ve polimerik substratlara bağlanarak tübülün polimerizasyonunu hızlandırır. Hücrede mikrotübülün sentezini arttırmaları. Oluşan ek mikrotübüller mevcut olan mikrotübüllere bağlanarak onları stabilize eder. Sonuçta tübülün-mikrotübülün dengesi bozulur ve sitotoksik etki ortaya çıkar. Geniş spektrumlu bir antineoplastik ajandır, birçok solid tümörde kullanılır (43). Nötropeni, hipersensitivite, periferik nöropati ve alopesi gibi yan etkilere yol açar (44).

5. Dosetaksel

Porsuk ağacının iğnelerinden elde edilen öncül maddelerin semisentetik türevidir. Mikrotübüllere bağlanır ayrıca mikrotübüllerin toplanmasını arttırarak depolimerizasyona

dirençli hale getirir. Yan etkileri paklitaksele benzer miyelosüpresyon ve ciddi sıvı retansiyonuna neden olur (43, 44).

6. Vinorelbin

Vinca rosacea bitkisinin dimerik alkaloidlerinin yarı-sentetik bir türevidir. Mikrotübüler proteinlere bağlanarak mikrotübül toplanmasını inhibe eder. Sonuçta mitotik iplikçik yapısı dağılır. Belirgin miyelotoksik etkisi vardır.

Tümör Mikroçevresi

Tümör dokuları (özellikle solid tümörler) normal dokulardan farklı mikroçevre özelliklerine sahiptir (45). Kanser hücrelerinin ve kanser dokusundaki zayıf damarlanmanın etkileşimi sonucu şekillenen tümör mikroçevresinin 3 karakteristik özelliği vardır:

- 1- Yüksek İnterstisyel Sıvı Basıncı (İSB)
- 2- Hipoksi
- 3- Düşük ekstrasellüler pH

Normal dokularda vasküler sistem, organizmanın ihtiyacına göre proanjiyojenik ve antianjiyojenik moleküller tarafından düzenlenir. Vasküler sisteme ek olarak intertisyumdan metabolik ve hücresele atıkları uzaklaştıran bir lenfatik ağ bulunur. Kanserli dokularda büyüme faktörlerinin etkisiyle düzensiz ve yapısal anormallikler içeren bir vasküler sistem bulunur, fakat lenfatikler yoktur (46, 47). Bu farklı yapı tümör dokusunun besinsel ihtiyaçlarının karşılanması ve atıkların uzaklaştırılması açısından yetersiz kalmasına neden olmaktadır. Tümör damarları çoğunlukla devamlılık göstermeyen endotel yapısına ve perisit tabakasına sahiptir. İntakt bir bazal membran yapısından yoksundurlar ve düzensiz bir yapı gösterirler. Bu durum tümör damarlarının normalden daha geçirgen olmasına neden olmaktadır (45, 48). Tümör damarlarının düzensiz yapısına çoğunlukla uzun ve geniş çaplı olmaları gibi özellikler de katılır. Heterojen yapıya sahip bu damarlara zaman zaman kör sonlanmalar, arteriovenöz şantlar ve eritrositten yoksun plazma kanalları eşlik eder (49). İnterstisyum, dokudan damara damardan dokuya çeşitli moleküllerin transportu için hayati önem taşır. Normal interstisyel basınç atmosferik basınca yakın iken, normal transkapiller basınç çözülmüş maddelerin damarlardan interstisyuma geçmesine izin verecek şekilde hafifçe yüksektir (1-3 mmHg). Solid tümörlerin önemli oranda artmış bir ISB'agv sahip olduğu uzun

zamandan beri bilinmektedir (50). Tümör damarlarının fenestralı yapısı, lenfatiklerden yoksunluğu vasküler içeriğin, atık maddelerin dokuda birikimine ve ISB'nin artmasına neden olur (51, 52). Bu artışa, dokuya sızan solutlerin yarattığı osmotik güçler ve tümör stromasının karakteristik özelliği olan kontraktıl yapı da katkıda bulunur (52, 53). Bu süreç trombosit derive büyüme faktörü (Platelet Derived Growth Factor; PDGF) (54), transforme edici büyüme faktörü- β (Transforming Growth Factor- β ; TGF- β) reseptörleri (55), β 1 integrin ve kollajen ilişkisi (56) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Tüm bu faktörler tümör dokusu ISB'nin 100 mmHg kadar artmasına yol açar (57-59).

Bozulmuş kan akımı tümör hücrelerine giden oksijenin azalmasına ve hipoksik alanlar oluşmasına da neden olur. Normal doku parsiyel oksijen basıncı (pO_2) doku tipine göre 10-80 mmHg arasında iken, tümör dokusundaki pO_2 yaklaşık 5 mmHg'dır (60, 61). Bu kronik hipoksik alanlar tümör hücrelerinin en yakın damardan diffüzyonla oksijen alabilecekleri mesafeden (100-200 μ m) daha uzakta bulunmalarından kaynaklanmaktadır ve bu mesafe tümörler arasında hatta tümör içerisinde de çok değişkenlik gösterir (62, 63).

Solid tümörlerin pH'sının direkt olarak elektrod-temelli tekniklerle ölçüldüğünde normal dokulara kıyasla daha asidik olduğu gözlenmiştir (64). Kanser progresyonunda ve tümör kemosenitivitesinde hipoksi ve asiditenin rolü olduğuna dair kanıtlar giderek artmaktadır. Hipoksik ve asidik olan tümör mikroçevresi bu tercih edilmeyen ortamda varlığını sürdürebilen hücrelerin seçilmesine yol açmakta, dolayısıyla benignenden maligne doğru dönüşümü tetiklemektedir.

- Asiditenin 1) Kemoterapi direncinde (65)
- 2) Proliferasyonda (66)
- 3) Metastatik dönüşümde (67) rol aldığı gösterilmiştir.

Asidik tümör mikroçevresinin oluşmasına neden olan en önemli faktör, anaerobik metabolizma sırasında hipoksi ile faktör 1-alfanın indüklenmesi ve laktat üretimine izin veren glikolitik fenotip adaptasyonunun gerçekleşmesidir (68). Ancak laktat üretiminin azalmış olduğu durumlarda da asidik tümör mikroçevresi gözlenebilmektedir (69, 70).

Tümör hücrelerinin eksprese ettiği çeşitli iyon değiştircilerin de asidik tümör mikroçevresinin oluşumunda anahtar rol oynadığı düşünölmektedir. Bu transmembranöz proteinler, iyonları hücre içinden dışına pompalar bazen de ekstrasellöler ve intrasellöler ortamdaki iyonları birbirleriyle değiştirmektedirler. Bu sayede tümör hücreleri, hücre içinde

birlikte kendileri için toksik olabilecek ve litik enzim kaskadını başlatabilecek tehlikeli H⁺ iyonlarını hücre dışına atarak kurtulmaktadır. Bu mekanizmadan en çok sorumlu tutulan ve proton pompaları içinde üzerinde en çok çalışılan vakuoler H⁺ATPaz'lardır (V-ATPaz).

Vakuoler H⁺ATPaz'lar (V-ATPaz)

V-ATP'azlar ATP bağımlı H⁺ iyonu taşıyıcılarıdır. H⁺ iyonlarını sitoplazmadan ekstrasellüler kompartmana veya intrasellüler organellerin içine, lümenine taşır. V-ATP'azlar periferal kısım (V1) ve integral kısım (V0) olmak üzere 2 önemli parçadan oluşur. Periferal kısım 8 subüniteden meydana gelir ve ATP hidrolizini gerçekleştirir. İntegral kısım ise 6 subüniteden oluşur ve proton değişiminden sorumlu olan ana kısımdır (71-74).

V-ATPaz aktivitesinin *in vivo* regülasyonundan sorumlu iki önemli mekanizma mevcuttur:

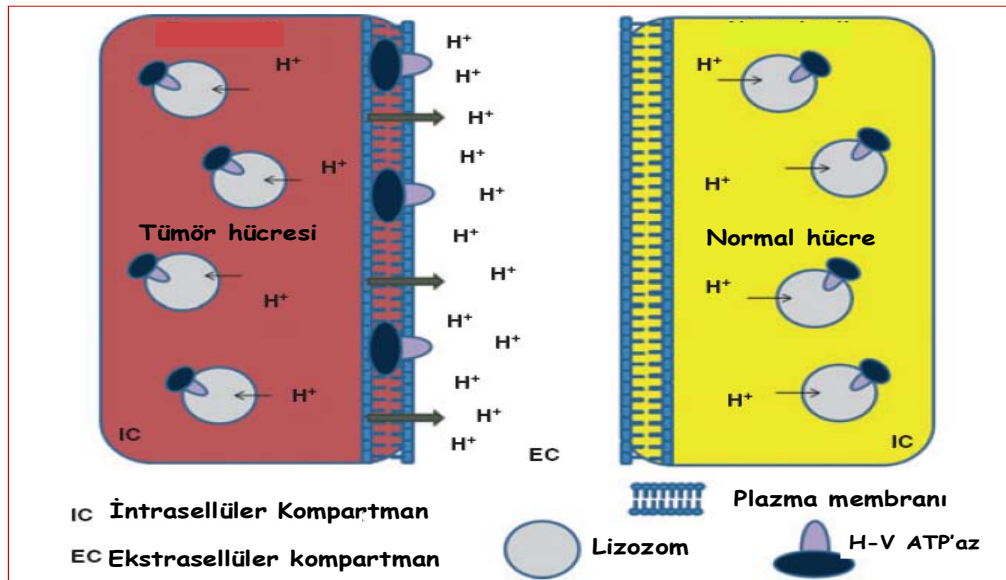
- 1- V1 ve V0 parçaların geri dönüşümlü olarak ayrışması ve proton taşınmasının etkilenmesi
- 2- ATP hidrolizi (75-82).

V-ATPaz'ların Tümör Yayılmındaki Rolü

Ekstrasellüler matriks yıkımının engellenmesinin hedeflenmesi kanser tedavisinde düşünülen yeni stratejilerden biridir. Ancak yapılan çalışmalara göre matriks metalloproteinaz (MMP) inhibitörleri yeterli derecede iyi sonuca yol açamamıştır. Bunun nedenlerinden biri de MMP ailesinin 20 üyesinin bulunması ve tüm MMP'ları engelleyen bir inhibitörün bulunamamış olmasıdır (19). Çalışmalara göre kanser metastazlarındaki artmış proteaz aktivasyonunun baskılanmasının bir yolu da ekstrasellüler ortamdaki pH'yı arttırmaktır (8,11,16). Nitekim yapılan bir çalışmada V-ATPazların gen düzeyinde ekspresyonunun inhibisyonu ile proteaz aktivasyonunun aşağı çekilmesi ve proton çıkışının azalması ile kanser metastazlarının etkili bir şekilde baskılandığı gösterilmiştir (16). Metastaz malign tümörlerin tedavisini imkansız kılan bir durumdur (17). Kanser metastazlarının tüm sürecinde ekstrasellüler matriksin yıkım ve yeniden yapılanması gerçekleşmektedir (18). Değişik iyon değiştiricilerin, tümör hücrelerinin metastatik davranışını değiştirebildiği gösterilmiştir (9). Meme kanseri hücreleri gibi bazı düşük metastaz potansiyeline sahip kanserler Na⁺/H⁺ iyon

değiştiricileri veya $\text{HCO}_3\text{-H}^+$ gibi taşıyıcı mekanizmaları tercih etse de çoğu yüksek metastatik potansiyele sahip hücreler plazma V-ATPazları kullanırlar.

V-ATPazlar, intrasellüler rölatif nötral pH'nın, ekstrasellüler ve lüminal asidik pH'nın idamesinde iyon değiştirici mekanizmalarla veya H^+ iyonlarının daha sonra atılmak üzere organeller içerisine pompalanması yoluyla etkili olur (83). Pek çok kanserde V-ATPazların ekspresyonlarındaki artış, tümörün metastaz ve invazyon yeteneği ile ilişkili bulunmuştur (9-10). Kanser dokularında protonlar V-ATP'azlar aracılığıyla hücre dışına atılarak, ekstrasellüler ortam asidifikasyonu gerçekleşmektedir. Bu da alkali sitozol ile asidik olan ekstrasellüler çevre arasındaki büyük pH gradiyentinin idamesini sağlamaktadır (84)(Şekil-3).



Şekil-3: Normal hücrelerde ve tümör hücrelerinde pH gradienti ve V-ATPaz aktivitesindeki farklılıklar. Tümör hücreleri normal hücrelerden farklı olarak alkalin bir sitozolik pH ve asidik bir hücre dışı pH ile karakterizedir. Bu pH gradienti protonların V-ATPazlar aracılığıyla hücre dışına atılması sonucu oluşmaktadır (84).

Tümör invazyonu, tümörün çeşitli sınıf proteazların salınımı ve aktivasyonuna neden olan asidifikasyon kabiliyetine bağlıdır (85, 86). Tümör mikroçevresindeki asidik pH artmış proteaz aktivasyonuna ve sekresyonuna yol açarken ekstrasellüler matriksin degradasyonunu ve yeniden şekillendirilmesini de destekler. Böylece kanser invazyonu ve metastazına zemin hazırlar (3,11). Ekstrasellüller matriksin tüm yapısal komponentlerini yıkma ve yeniden yapılandırma yeteneğine sahip MMP'lar da dahil olmak üzere pek çok proteaz optimum aktivasyon için düşük pH'ya ihtiyaç duyar (12-15).

V-ATPazlar sadece potansiyel anti-kanser ilaçların hedefi değildir. Tümör biyopsilerinde immünohistokimyasal analiz ile hücresel dağılımlarının ve ekspresyonlarının değerlendirilmesi kanserin davranışını ve progresyonunu ön görmede ve izlemede yararlı olabilir (87-89).

Ekstrasellüler ile intrasellüler kompartmanlar veya sitoplazma ile intrasellüler organeller arasında meydana gelen pH değişiklikleri sonucu gelişen asidik tümör mikroçevresi ilaç direncinde de önemli rol oynayabilir (90, 91). Asidik mikroçevre nedeniyle gelişen ilaç direncine yol açabilecek çeşitli mekanizmalar: İlaç alımının azalması, zayıf bazik ilaçların nötralizasyonu ve lizozomal veziküllere ilaçların sekestrasyonudur (91-94).

Tümör pH'sını daha iyi karakterize etmek için hayvan modellerinde çoğunlukla görüntüleme yöntemlerine dayanan çeşitli çalışmalar yapılmıştır (95, 96). Sonuçta düşük pH ortamını değiştirerek ilaç etkinliğini arttırmaya yönelik yeni yaklaşımlar geliştirilmiştir (65, 97-99). Tüm bu yeni *in vitro* ve *in vivo* bulgular V-ATPazların, kanser tedavisinde tümör mikroçevresindeki pH gradiyentini direkt olarak regüle etme ve indirekt olarak ekstrasellüler matriks proteazların aktivasyonunu önleme özelliği ile yeni bir hedef olabileceğini düşündürmektedir.

Anti-tümör İlaç Olarak Proton Pompa İnhibitörleri (PPI)

Proton pompa inhibitörleri (PPI) asit ilişkili bozuklukların tedavisindeki yerini 1980 sonlarından bugüne kadar korumaktadır. PPI'ler asit sekresyonunu, pariyetal hücrede asit sekresyonunun son basamağını üstlenen H^+/K^+ ATPaz enzimini inhibe ederek bloke ederler. En potent mide asit sekresyonunu inhibe eden ajanlar olup bugün kullanılan PPI'ler omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol ve esomeprazol'dür (100). Kullanım alanları arasında gastroözofajiyal reflü hastalığı, peptik ülser, eroziv özofajit, *Helicobacter pylori* eradikasyonu, non-steroid anti-inflamatuvar ilaçlara bağlı gastrik ülser riskinin azaltılması, ülser dışı dispepsi, yoğun bakım hastalarında gastrointestinal kanama riskinin azaltılması ve Zollinger-Ellison sendromu gibi hastalıkların yanı sıra mast hücre tümörleri sayılabilir (101, 102). Çalışmamızda kullanılan esomeprazol (Nexium™), omeprazolün S izomeridir ve mide asit sekresyonunu özgün bir etki mekanizmasıyla azaltır. Esomeprazol, pariyetal hücrelerdeki asit pompasının spesifik bir inhibitörüdür. Sağlıklı insanlarda kararlı konsantrasyonlarda

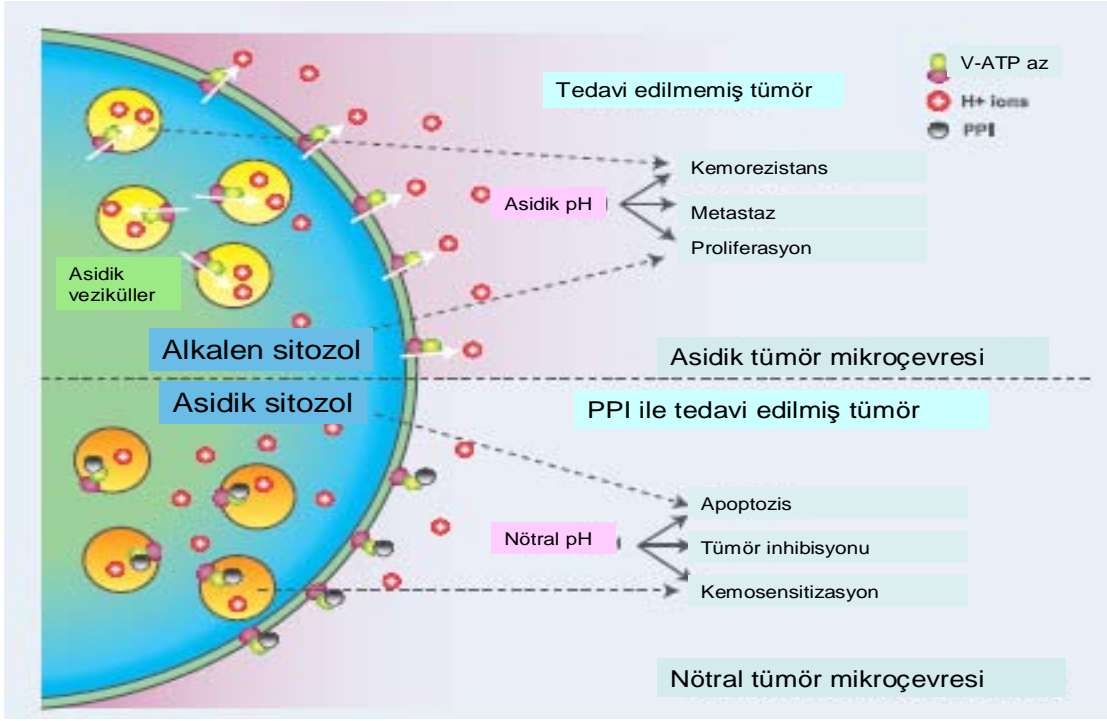
dağılım hacmi 0,22 L/kg'dır. Proteinlere %97 oranında bağlanır. Esomeprazol sitokrom P450 sistemi ile tamamen metabolize olur (103).

Tümör hücrelerindeki V-ATP'azlar proliferasyon, tümörogenesis, ilaç direnci, tümör progresyonu ve anti-kanser ilaçlarla indüklenmiş dirençli fenotiplerin ortaya çıkması gibi birçok fonksiyonda rol almakta ve araştırmacılar için potansiyel hedef haline gelmektedir (104-106). PPI V-ATPazları *in vitro* etkili bir şekilde inhibe ettiği, sıçan ve fare modellerinde yapılan çalışmalarda da iyi tolere edildiği, tümör kontrolünü ve kemoterapi etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (107-109).

Kanser hücrelerinin PPI ile tedavisi H⁺ iyonlarının kanser hücreleri içerisinde birikimine yol açarak ölümüne neden olmaktadır Neredeyse tüm kanser hücreleri PPI ile tedaviye kemosensitizasyon veya sitotoksosite yanıtı göstermektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar Tablo-2'de özetlenmiştir. Mekanizma da Şekil-4'de gösterilmiştir.

Tablo-2: İnsan tümör hücreleri ve proton pompalarına duyarlı tümörler.

Tümör histotipi	Kemosensitizasyon	Anti-tümör etki	Referanslar
Melanoma	Sisplatin/5-FU/Vinblastin/Doksorubisin	Kaspaz bağımlı sitotoksosite	(107, 109, 111)
B Hücreli Lenfoma	Vinblastin/Doksorubisin	Kaspaz bağımlı sitotoksosite	(107, 108)
Meme Kanseri	Sisplatin/5-FU/Vinblastin		(93, 107)
Kolon Kanseri	Sisplatin/5-FU/Vinblastin		(107)
Gastrik Ca	Sisplatin/5-FU/Doksorubisin	Sitotoksosite ve apoptoz	(110, 112)
Over Kanseri	Sisplatin/5-FU/Vinblastin		(107)
Karaciğer Kanseri	--	Proliferasyonun inhibisyonu	(113, 114)
Kolanjiyokarsinom	--	Sitotoksosite ve apoptoz	(115)



Şekil- 4: Asidik tümör mikroçevresinin PPI ile modifikasyonu (116).

Bu çalışmanın amacı, bir PPI olan esomeprazol ile akciğer kanseri tedavisinde kullanılan ilaçlar birlikte kullanıldığında A549 hücrelerinin (akciğer kanseri hücre dizisi) bu ilaçlara olan duyarlılığının artıp artmadığını araştırmaktır. Bu amaçla akciğer kanseri tedavisinde kullanılan klasik ilaçlar olan sisplatin, karboplatin, paklitaksel, dosetaksel, gemsitabin ve vinorelbin'in esomeprazol ile kombinasyonları A549 hücreleri üzerine uygulanmış, oluşturduğu sitotoksikite farklı metodlarla araştırılmıştır. Ayrıca esomeprazol ile kanser kemoterapisinde kullanılan ilaçlar kombine edildiğinde sağlıklı normal lenfositler üzerine sitotoksik etkilerinin olup olmadığı da incelenmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Ticari olarak Amerika Hücre Kültür Koleksiyonundan satın alınan A549 insan akciğer kanseri hücreler soyları (ATCC CCL-185, ABD) kriyovial (Cryogenic vial, Corning, ABD) denen kaplar içerisinde sıvı nitrojen tankında (yaklaşık -196 °C) saklandı.

Hücreler çoğaltılmak amacıyla sıvı nitrojen tankından alınarak 56 °C'deki sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözüldü. Kriyovialin içindeki hücre süspansiyonu 5 ml besiyeri içeren falkon tüpe (15 ml sterile polypropylene conical bottom Screw cap tube 92159, Biolab, Macaristan) yavaşça aktarıldı. Tüp 800 rpm'de 5 dk santrifüj (Hettich Rotina 35R, Almanya) edildikten sonra üst sıvı kısmı atıldı. Hücre pelleti 1 ml hücre besiyeri ortamı içerisinde iyice karıştırılarak süspansiyon haline getirildikten sonra üzerlerine 4 ml besiyeri eklendi. 5 ml'lik hücre süspansiyonları 25 cm²'lik kültür kabına (25 cm², Tissue culture flasks, TTP, İsviçre) aktarıldı. 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde (Sanyo, Japonya) inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün hücre besiyeri ortamı yenilenerek hücrelerin büyümeleri sağlandı. Kültür kabı her gün mikroskop (İnverted microscope, CKX41, Olympus, Almanya) altında kontrol edildi ve hücrelerin kültür kap yüzeylerini tamamen kaplamış (konfluent) olduklarında tripsinizasyon işlemi ile (bakınız ekler) daha büyük hacimli 75 cm² kültür kaplarına (75 cm², Tissue culture flasks, TTP, İsviçre) aktarıldı. Bu şekilde hücrelerin istenilen sayıya ulaşmaya kadar çoğalmaları sağlandı.

Hücre kültürü deneylerinin tümü laminar akım kabinlerinde (Esco Airstream Class II Biological Safety Cabinet, Singapur) gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan Besiyerleri, Sıvıların Hazırlanması

A549 insan akciğer kanseri hücreleri, %1 penicillin G (100 U/ml)/streptomycin (100 µg/ml) (Hyclone, USA), %1 L-glutamine (292.3 mg/ml) (EuroClone Europe), ve %10'luk newborn calf serum (Hyclone USA) içeren Ham's / F12 (Ham's/ F12 without Glutamine, PAN, Biotech, GmbH, Almanya) besiyerinde 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde klasik yöntemlerle kültüre edildi.

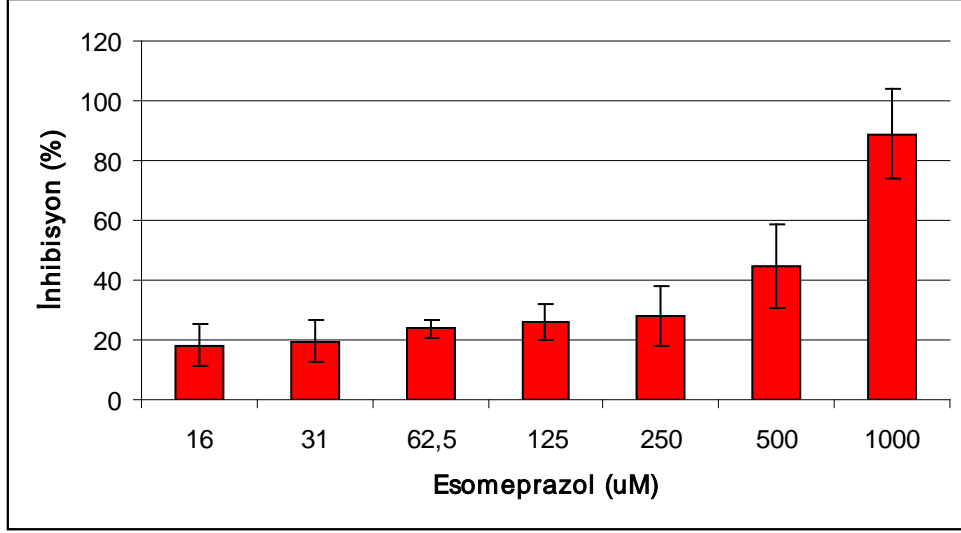
Hücrelerin Sayılması ve İlaçların Uygulanması

Hücreleri sayabilmek amacıyla tripsinizasyon işlemi sonucunda elde edilen hücre süspansiyonundan 20 µl alınarak ependorf tüpe alındı. Üzerine eşit miktarda Tripan Mavi (Trypan Blue Solution % 0.5, Biological Industries, Israil) boyası konarak iyice karışması sağlandı. Bu karışımdan 12 µl alıp Toma lamına konarak thoma lamının ortasında bulunan 16 bölme sayıldı. Bulunan sayı sulandırma katsayısı ile çarpılarak 1 ml medyumda ne kadar hücre olduğu bulundu.

Esomeprazol'un İlk Toksik Dozun Belirlenmesi

Esomeprazolün uygulama konsantrasyonları daha önce yayınlanmış veriler (107) ve zaman-konsantrasyon yanıt deneyleri ışığında belirlendi. Başlangıç deneyinde esomeprazol'un farklı konsantrasyonlarının (1000, 500, 250, 125, 62.5 µM) A549 hücrelerinde oluşturduğu inhibisyon (%) saptandı (Şekil-5). İlaç uygulamasından 72 saat sonra hücre ölümü (sitotoksosite) Metil Tiazol Tetrazolium (MTT) metodu ile değerlendirilerek hücrelerin %50'sinin çoğalmasını inhibe eden konsantrasyon (IC50) ve subletal dozlar belirlendi. Sonraki deneylerde esomeprazol için IC50 dozu olarak saptanan 500 µM'ın klinikte uygulanabilecek dozun çok üzerinde (suprafarmakolojik) olabileceği düşünülerek subletal doz olan 250 µM esomeprazol tek başına veya akciğer kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçlarla (Gemsitabin, Vinorelbinin, Paklitaksel, Dosetaksel, Karboplatin, Sisplatin) kombine edilerek, akciğer kanseri hücrelerine uygulanmasına ve tümör hücrelerindeki sitotoksitenin (% inhibisyon değerleri) karşılaştırılmasına karar verildi.

Belirlenen dozlarda MTT metodu ile sitotoksosite çalışıldı.



Şekil-5: Çeşitli konsantrasyonlarda esomeprazolün A549 hücreleri üzerinde yarattığı inhibisyonlar (%) gösterilmektedir.

Uygulanan İlaç Grupları

1. Kontrol Grubu

2. Sadece esomeprazol (Nexium® infüzyon solüsyonu, AstraZeneca, Türkiye), içeren grup

3. Sadece anti-kanser ilaç içeren grup

-Sisplatin (Sisplatin® iv flakon, Koçak Farma, Türkiye)

-Karboplatin (Carboplatin® flakon, Eczacıbaşı, Türkiye)

-Paklitaksel (Taxol® flakon, Bristol-Myers Squibb, Türkiye)

-Dosetaksel (Taxotere® flakon, Sanofi-Aventis Farma, Türkiye)

-Gemsitabin (Gemzar®, Lilly, Türkiye)

-Vinorelbin (Navelbine® enjektabl flakon, Pierre Fabre, Türkiye)

4. Antikanser ilaç + esomeprazol grubu

-Sisplatin + esomeprazol

-Karboplatin + esomeprazol

-Paklitaksel + esomeprazol

-Dosetaksel + esomeprazol

-Gemsitabin + esomeprazol

-Vinorelbin + esomeprazol

MTT metodu ile etkili olduğu gözlenen kombinasyonlarda (250µM esomeprazol ve antineoplastik ilaç) etkinin nasıl gerçekleştiğini saptamaya yönelik (nekroz mu apoptoz mu?) ileri araştırmaya geçildi.

Deneylerde Kullanılan İlaç Konsantrasyonları

Esomeprazol ; 250µM, 125µM, 62,5µM dozlarında kullanıldı.

Antikanser İlaç Konsantrasyonları; Kan konsantrasyonuna tekabül eden 100 Test İlaç Konsantrasyonu (TİK) temel alınarak 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 TİK'larında uygulandı. Tüm ilaç konsantrasyonları besiyerinde seyreltilerek hazırlandı.

100 TİK Sisplatin = 7,6 µg/ml

100 TİK Karboplatin = 15,8 µg/ml

100 TİK Paklitaksel = 13,6 µg/ml

100 TİK Dosetaksel = 11,3 µg/ml

100 TİK Gemsitabin= 25 µg/ml

100 TİK Vinorelbin=1,86 µg/ml

MTT Metodu

Yaşayan hücrelerdeki dehidrogenaz enzim aktivitesini saptamaya yönelik olan bu yöntemde öncelikle A549 hücreleri sayılarak 5000 hücre/200 µl kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu düz plaklara (Tissue Culture Testplates, 96 wells Flat, Orange Scientific, Belçika) ekildi. 24 saat 37°C'lik %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben yapışmış olan hücreler zedelenmeden üzerlerinden 100 µl (mikrolitre) besiyeri aspire edildi. Çeşitli dozlarda kemoterapötikler ve esomeprazol (25µM) 100 µl şeklinde üzerlerine uygulandı. İlaç uygulamasını takiben hücreler 72 saat inkübasyona bırakıldı. 72. saatin sonunda MTT solüsyonu (bakınız ekler) 25 µl olacak şekilde tüm kuyucuklara ilave edilerek karanlıkta 37°C ve %5 CO₂'li etüvde 4 saat inkübe edildi. Oluşan koyu mavi renkli farmazon bileşiklerini çözünür hale getirebilmek için üzerlerine Sodyum Dodecyl Sülfat (SDS) solüsyonundan (bakınız ekler) 100'er µl bütün kuyucuklara eklendi. 18 saat 37°C %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Oluşturdukları renk şiddeti spektrofotometre (FLASHScan S12, Analytik Jena AG, Almanya) ile 570 nm dalga boyunda ölçüldü. Aynı sayıda ekilmiş ve hiç ilaç uygulanmamış kontrol hücrelerindeki absorbans değeri ile tedavi uygulanmış hücrelerdeki absorbans

değerleri oranlanarak tedaviye maruz bırakılmış hücrelerdeki ölüm oranı (yüzdesi) hesaplandı. Hücrelerde 1M H₂O₂, ölümün negatif kontrolü (Minimum canlılık, MinC) olarak kullanıldı. Pozitif kontrol (Maksimum canlılık, MaksC) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı.

% İnhibisyon hesabı:

MTT testi sonunda yaşayan hücrelerde koyu mavi farmazon kristalleri gözlemlendi, buna karşılık ölen hücrelerde bu kristaller gözlenmedi. İlaç uygulanan hücrelerin canlılıkları (Örnek C) ilaç uygulanmamış kontrol hücreleri referans alınarak hesaplandı ve bu değer %100 canlılık (MaksC) olarak belirlendi. Hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulanan hücreler, minimum canlılık seviyesinin (MinC) hesaplanmasında referans olarak alındı. Tüm bu değerler ile aşağıdaki formül kullanılarak hücrelerde inkübasyon süresi sonunda oluşan % canlılık oranları hesaplandı.

$$\text{Canlılık (\%)} = [100 \times (\text{ÖrnekC} - \text{MinC}) / (\text{MaksC} - \text{MinC})].$$

$$\text{İnhibisyon (\%)} = 100 - \text{Canlılık (\%)}$$

Tüm deneyler en az 6 kez tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar 6 numunenin ortalaması alınarak değerlendirilmiştir.

Canlı Hücrelerin Fotoğraflanması

Hücreler 6 kuyulu plaklara (Cell culture test plate 6, TTP, İsviçre) 1 milyon hücre/ 2ml kuyu olacak şekilde ekildi. 24 saat süreyle hücrelerin yapışması temin edildikten sonra çeşitli konsantrasyonlarda (250µM, 125 µM, 62,5 µM)esomeprazol tek başına; sisplatin tek başına (25 TİK) dozunda ve esomeprazol ile kombinasyonu şeklinde uygulandı. 48. saat ve 72. saat görüntüleri 10 x objektif ile inverted mikroskop altında fotoğraflandı.

M30 Antijen Ölçümü

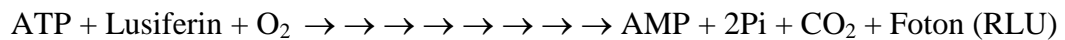
Apoptoza özgü bir belirteç olan kırılmış sitokeratin 18 (CK18)'i saptamak üzere ELISA yöntemiyle M30 antijen ölçümü yapıldı. Total CK18, proliferasyon halindeki hücrelerde bol miktarda üretilen ve nekroz sırasında membran bütünlüğü bozulunca dolaşıma salgılanan bir proteindir. Apoptoz esnasında hücre iskeletinin önemli bir bileşeni olan CK18

sadece apoptotik hücrelerde aktifleşen bir enzim grubu olan kaspazların etkisiyle kırılarak kırılmış CK18'i (CK18-Asp396) oluşturmaktadır (117). M30 monoklonal antikor, özellikle CK18'in Asp396'da kırılan fragmanını (M30 antijen) tanıyarak CK'lerin apoptotik bir belirteç olarak kullanımını sağlamaktadır (118). Bu özel CK18'i tanıyan M30 antikor hücrelerin bulunduğu ortamla temas ettirilirse ve eğer ortamda apoptotik hücreler de varsa, apoptozun varlığı gösterilmiş olmaktadır. Bunun için öncelikle A549 hücreleri sayılarak 5000 hücre/200 µl kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu düz plaklara (Tissue Culture Testplates, 96 wells Flat, Orange Scientific, Belçika) ekildi. 24 saat 37°C'lik %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben yapılmış olan hücreler zedelenmeden üzerlerinden 100'er µl besiyeri aspire edildi. Takiben 100'er µl sisplatin (100 TİK), karboplatin (100 TİK) tek başına, esomeprazol (250, 125 ve 62,5 µM) tek başına ve kombinasyonları üzerlerine uygulandı. Uygulamadan 48 saat (37°C'lik %5 CO₂'li ortamda inkübasyon) sonra tüm kuyucuklara hücre membranlarını parçalamak amacıyla Triton X 100 (T8787 Sigma-Aldrich, ABD) (%10, distile suda) 10 µl ilave edildi. 15 dk oda sıcaklığında çalkalayıcıda (Heidolph Titramax 1000, Heidolph Instrumensts GmbH & Co.KG, Almanya) 600 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kuyucuklardaki sıvılar ependorflara toplandı, 2000 rpm'de 30 sn. santrifüj edilip (Minispin plus, Eppendorf, Almanya) süpernatantlarda M30 antijen ölçümü, M30 Apoptosense ELISA (PEVİVA, İsviçre) kiti ile kit prospektüsüne uygun olarak çalışılarak gerçekleştirildi. Oluşan renk şiddeti spektrofotometrik olarak 450 nm'de (FLASHScan S12, Analytik Jena AG, Almanya) okundu. M30 çalışmasında pozitif kontrol olarak 200 TİK'larında sisplatin kullanıldı.

ATP-TCA Metodu

ATP-TCA Tümör Kemosenitivite Testi kemoterapötik ilaçların tümör hücre büyümesi inhibisyonundaki etkinliğini *in vitro* ortamda ölçmeye yönelik bir metoddur. Metodun prensibi canlı hücrelerdeki ATP'nin lusiferin ile reaksiyonunu takiben ortaya çıkan floresan ışımının ölçümüne dayanmaktadır.

Lusiferaz



Bu yöntemde öncelikle A549 hücreleri sayılarak 10000 hücre/200 µl kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu düz plaklara (Tissue Culture Testplates, 96 wells Flat, Orange Scientific, Belçika) ekildi. 24 saat 37°C'lik %5 CO₂'li ortamda inkübasyonu takiben yapışmış olan hücreler zedelenmeden üzerlerinden 100 µl (mikrolitre) besiyeri aspire edildi. Sisplatin, karboplatin 25, 50,100 TİK'nda tek başına, esomeprazol (250, 125 ve 62,5µM) te k başına ve kombinasyonları 100'er µl şeklinde üzerlerine uygulandı. İlaç uygulamasını takiben hücreler 72 saat 37°C'lik %5 CO₂'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Takiben ATP ölçümü ATP-TCA kiti (DCS Innovative Diagnostica-Systeme, Hamburg, Almanya) ile gerçekleştirildi. Bunun için üreticinin talimatları doğrultusunda tümör hücrelerinin içeriğindeki ATP'nin ortaya çıkarılması için kuyucuk başına 50µl olacak şekilde tümör hücre ekstraksiyon ayırıcı (kit içerisinde bulunmakta) ilave edildi. Oda sıcaklığında 45 dakika inkübasyonu takiben kuyucukların içerisinden 50'şer µl ~~ml~~ luminometrik ölçüme uygun beyaz plaklara (Microfluor 2 white,flat bottom 96 well microtiter plates, ThermoLab Systems, İngiltere) aktarıldı. Üzerlerine yine kitin içerisinden çıkan lusiferin-lusiferaz karışımı 50'er µl eklendi. Beklemeden luminometrik ölçüm (FLX800 Mikroplak luminesans ve floresans okuyucu; BioTek, ABD) yapıldı. Elde edilen değer, ATP ve canlı hücre sayısı ile direkt orantılı bir değerdir.

Tüm deneyler en az 3 kez tekrarlanmıştır. Sonuçlar ortalamalar üzerinden değerlendirilmiştir.

Periferik Kan Mononükleer Hücrelerinin İzolasyonu

Yaşları 25 ila 45 arasında değişen herhangi bir hastalığı bulunmayan ve ilaç kullanmayan sağlıklı 20 gönüllü kişiden 10'ar ml heparinli venöz kan alındı. Çalışmaya katılan tüm gönüllülerden onam alınmıştır. (Etik kurulu toplantısı, 19 Şubat 2008, 2008-4/20 nolu karar, bakınız ekler) Ficoll (Biochrom, Berlin, Almanya) ile dansite gradient santrifüj yöntemi kullanılarak mononükleer hücreler elde edildi. Hücreler 3 kez yıkandı ve zenginleştirilmiş RPMI-1640 (cRPMI-1640) (Bakınız Ekler) ile sulandırılarak hücre sayımı yapıldı. Hücre sayısı $5 \times 10^5 / 500$ µl olacak şekilde hazırlanan hücre süspansiyonlarından; 48 kuyulu mikroplaklara, her örnek için 6 kuyu kullanılmak üzere 500'er µl dağıtıldı. Antikanser ilaçlar kuyulara belirtilen konsantrasyonlarda (Esomeprazol 250µM, Esomeprazol 125 µM,

Esomeprazol 250 μ M + Sisplatin100 TİK, Esomeprazol 125 μ M+ Sisplatin100 TİK, Sisplatin 100 TİK) eklendi ve 37°C'lik %5 CO₂ içeren etüvde 3 gün süreyle inkübe edildi. İlaç içermeyen kuyudaki hücreler ise kontrol amacıyla kullanıldı. Apoptoza uğramış hücre oranları DNA siklus analiz kiti (Cycle TEST™ PLUS DNA Reagent Kit Cat. No. 340242 BECTON DICKINSON, ABD) ile kit prospektine uygun olarak hazırlandıktan sonra akım sitometrede (BD FACSCanto, Becton Dickinson, ABD) değerlendirildi. Apoptoza uğramış hücre oranları ModFit LT (Becton Dickinson, ABD) bilgisayar programı kullanılarak saptandı.

DNA Siklus Analizi ve Apoptozun Değerlendirilmesi

Hücreler 3. günün sonunda tripsinizasyon işlemi (bakınız ekler) ile toplandı. Taze cRPMI-1640 ile toplam hacmi ~ 500 μ l olacak şekilde yeniden süspanse edildi ve 12x75mm polistren tüplere aktarıldı. Oda sıcaklığında 300g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant, pellete zarar vermeyecek ve yaklaşık 50 μ l sıvı kalacak şekilde aspire edildi. Üzerine 1 ml cRPMI çözeltisi ilave edildikten sonra düşük devirde vortekslendi. Takiben 300g.'de 5 dk santrifüj edilerek 2 kez yıkandı. Hücre sayısı ml' de 1×10^6 hücre olacak şekilde hazırlanan hücre süspanسیونu 400g'de 5 dk.oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant dikkatlice döküldü. Kalan pelletin üzerine oda sıcaklığına gelmiş olan 250 μ l Solüsyon A (Trypsin tampon) ilave edilerek yavaşça karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Takiben üzerine 200 μ l oda sıcaklığına gelmiş olan Solüsyon B (Trypsin inhibitor ve RNAaz tampon) ilave edilerek yavaşça karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dk'lık inkübasyondan sonra 200 μ l soğuk solüsyon C (Propidium iodid içeren boyama çözeltisi) ilave edildi. On dakika + 4°C'de karanlıkta inkübe edildi. Akım sitometri değerlendirmesi için hazır hale getirildi.

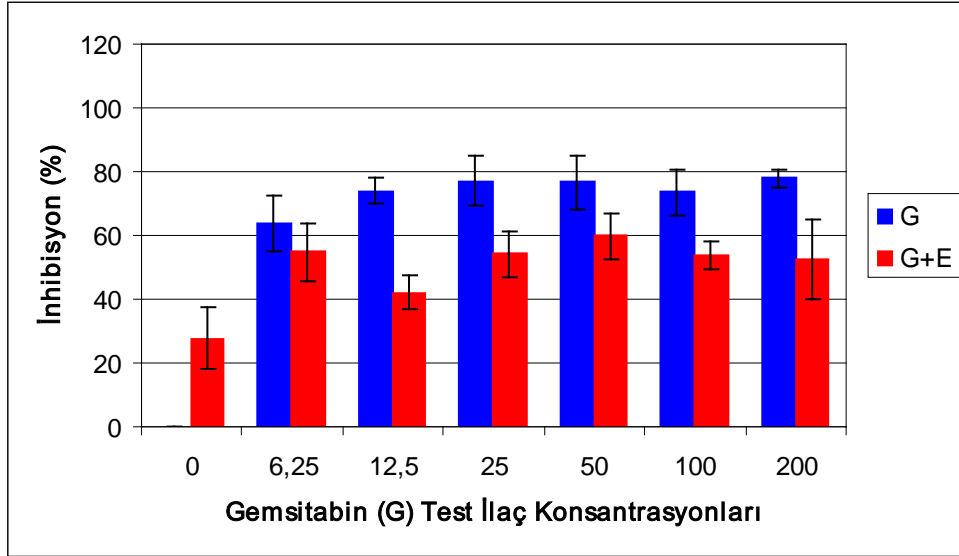
İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel analizi SPSS16.0 istatistik paket programında yapıldı. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Normal dağılım göstermeyen bağımlı verilerin karşılaştırılmasında Wilcoxon İşaret Sıra testi, bağımsız grupların karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Testi kullanıldı. İlaç grupları ve dozlar arasındaki istatistiksel farklılık iki yönlü varyans analizi ile incelendi. İstatistiksel anlamlılık bulunması durumunda çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $\alpha=0.05$ olarak belirlendi.

BULGULAR

A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinin Gemsitabine Verdiği Yanıt

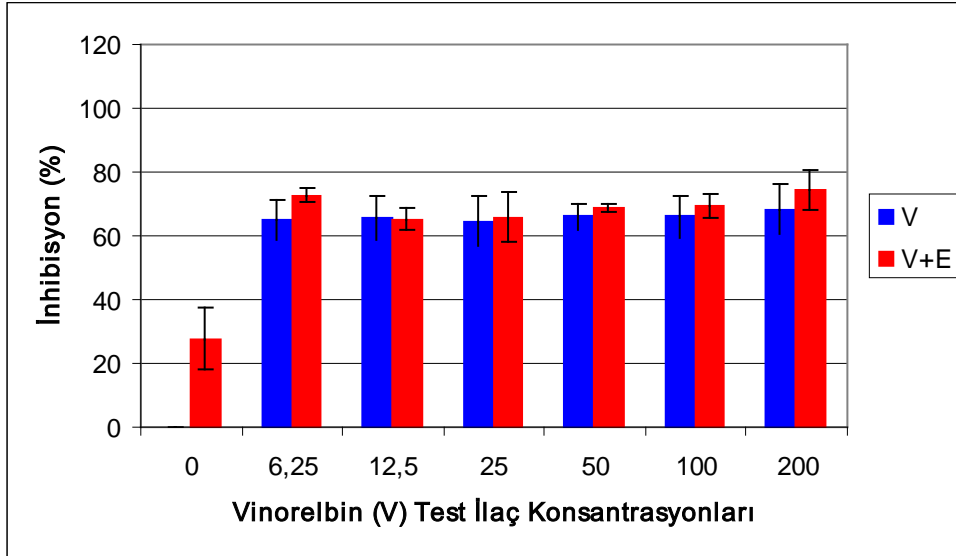
A549 hücrelerine çeşitli TİK'larında (200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25) gemsitabin tek başına ve esomeprazol (250µM) ile kombine edilerek uygulandı. Uygulamadan 72 saat sonra hücre ölümü (sitotoksosite) MTT metodu ile değerlendirildi. Gemsitabinin tek başına uygulanması ile gemsitabin+esomeprazol (G+E) kombinasyonları karşılaştırıldığında tümör hücrelerinin inhibisyon (%) değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p>0,05$) (Şekil-6).



Şekil-6: Gemsitabin çeşitli TİK konsantrasyonlarında tek başına ve 250µM esomeprazol ile kombinasyonlarının A549 hücreleri üzerindeki etkisi inhibisyon (%) olarak gösterilmiştir ($p>0,05$). G: Gemsitabin, E: Eesomeprazol.

A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinin Vinorelbine Verdiği Yanıt;

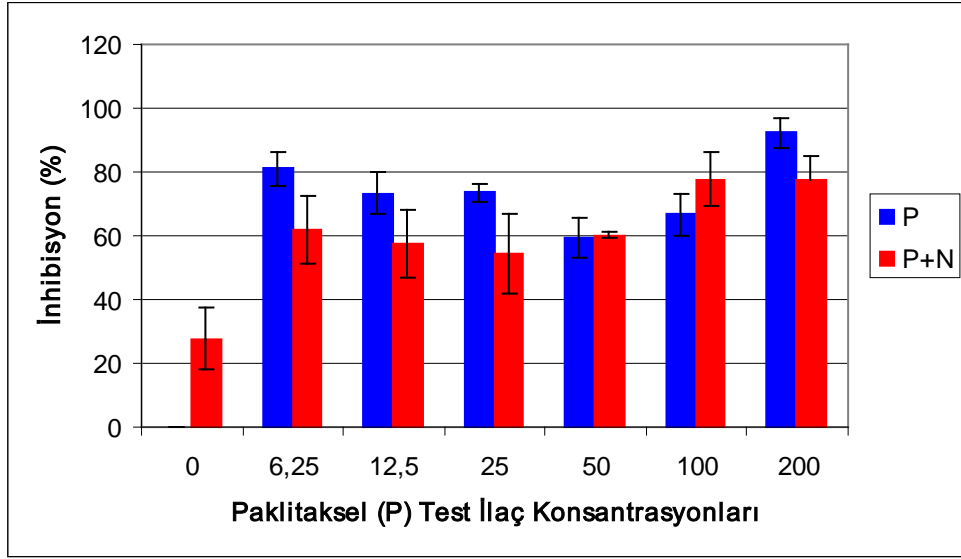
A549 hücrelerine vinorelbin (200, 100, 50, 25, 12.5, 6,25) dozlarında tek başına ve esomeprazol (250µM) ile kombine edilerek uygulandı. Uygulamadan 72 saat sonra hücre ölümü (sitotoksisite) MTT metodu ile değerlendirildi. Vinorelbinin tek başına uygulanması ile vinorelbin+esomeprazol (V+E) kombinasyonları karşılaştırıldığında tümör hücrelerinin A549 hücreleri üzerinde % inhibisyon değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0,05$) (Şekil-7).



Şekil-7: Vinorelbine çeşitli TİK konsantrasyonlarında tek başına ve 250µM esomeprazol ile kombinasyonlarının A549 hücreleri üzerindeki etkisi % inhibisyon olarak gösterilmiştir ($p>0,05$). V: Vinorelbine, E: Eesomeprazol.

A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinin Paklitaksele Verdiği Yanıt;

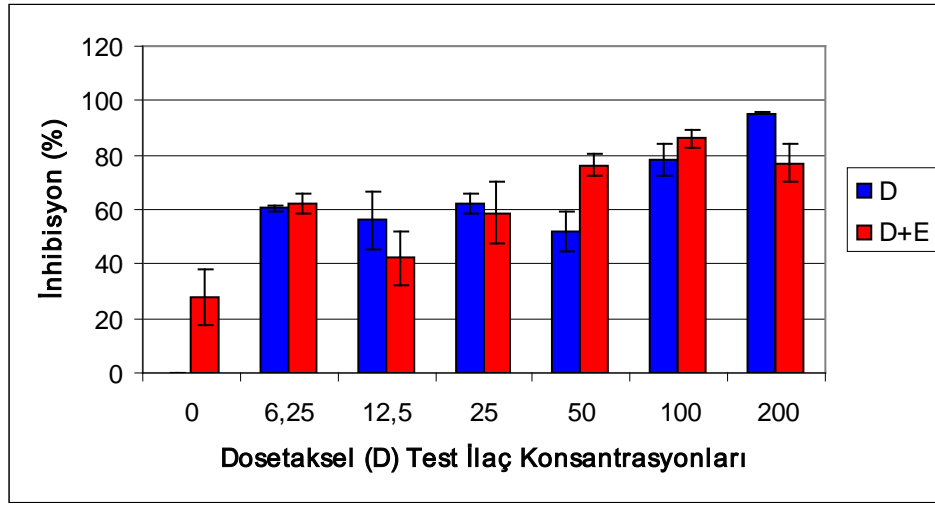
A549 hücrelerine 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 TİK'ında paklitaksel tek başına ve esomeprazol (250µM) ile kombine edilerek uygulandı. 72 saat sonra hücre ölümü MTT metodu ile değerlendirildi. Paklitaksel'in tek başına uygulanması ile paklitaksel+esomeprazol (P+E) kombinasyonları karşılaştırıldığında, tümör hücrelerinin % inhibisyon değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0,05$) (Şekil-8).



Şekil-8: Paklitaksel çeşitli TİK konsantrasyonlarında tek başına ve 250µM esomeprazol ile kombinasyonlarının A549 hücreleri üzerindeki etkisi % inhibisyon olarak gösterilmiştir ($p>0,05$). P: Paklitaksel, E: Esomeprazol.

A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinin Dosetaksel Verdiği Yanıt;

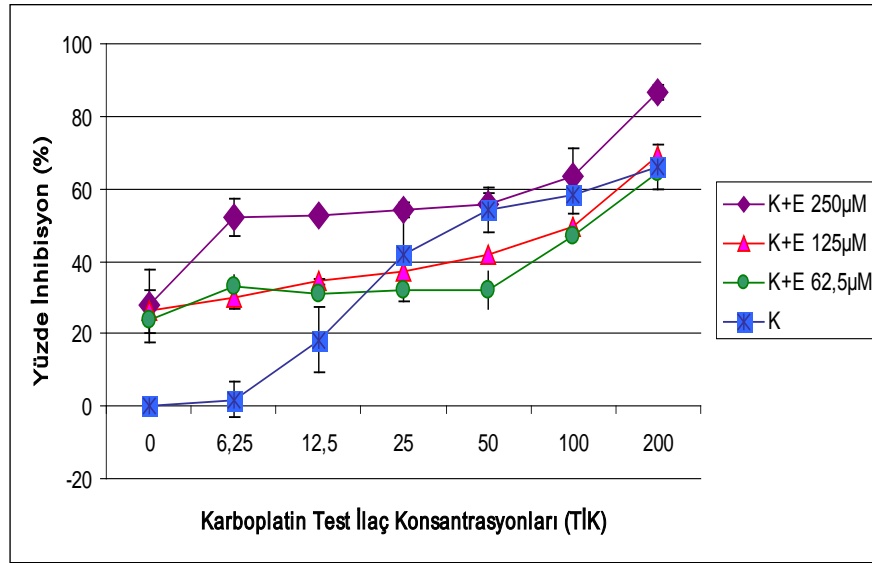
A549 hücrelerine farklı dozlarda (200, 100, 50, 25, 12.5, 6,25 TİK) dosetaksel tek başına ve esomeprazol (250µM) ile kombine edilerek uygulandı. 72 saat sonra hücre ölümü MTT metodu ile değerlendirildi. Dosetakselin tek başına uygulanması ile dosetaksel+esomeprazol (D+E) kombinasyonları karşılaştırıldığında tümör hücrelerinin % inhibisyon değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0,05$) (Şekil-9).



Şekil-9: Dosetaksel çeşitli TİK konsantrasyonlarında tek başına ve 250µM esomeprazol ile kombinasyonlarının A549 hücreleri üzerindeki etkisi % inhibisyon olarak gösterilmiştir ($p>0,05$). D: Dosetaksel, E: Eesomeprazol.

MTT metodu ile A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinin Karboplatine Verdiği Yanıt;

A549 hücrelerine çeşitli dozlarda (200, 100, 50, 25, 12.5, 6,25 TİK) karboplatin tek başına ve esomeprazol (250 µM) ile kombine olarak uygulandı. İlaç uygulamasından 72 saat sonra hücre ölümü MTT metodu ile değerlendirildi. Karboplatin, esomeprazol ile kombine olarak uygulandığında tümör hücrelerinin inhibisyonunda (%) anlamlı oranda bir artışa yol açtığı gözlemlendi ($p<0.001$). Bunun üzerine, esomeprazolün daha düşük dozları (125 ve 62,5 µM) ile karboplatinin çeşitli TİK'ları kombine edilerek A549 hücrelerine sitotoksik etkisi araştırıldı. Esomeprazol karboplatin ile kombine olarak kullanıldığında doza bağımlı olarak (artan dozlarda) % inhibisyonun arttığı gözlemlendi ($p<0.001$) (Şekil-10). Hücre ölümündeki bu artış özellikle düşük dozlarda karboplatin kullanıldığında daha belirgindi. Esomeprazolün karboplatin ile birlikte yol açtığı artmış hücre ölümünün apoptozla mı nekrozla mı gerçekleştiği ATP-TCA ve M30 metodları kullanılarak araştırıldı.

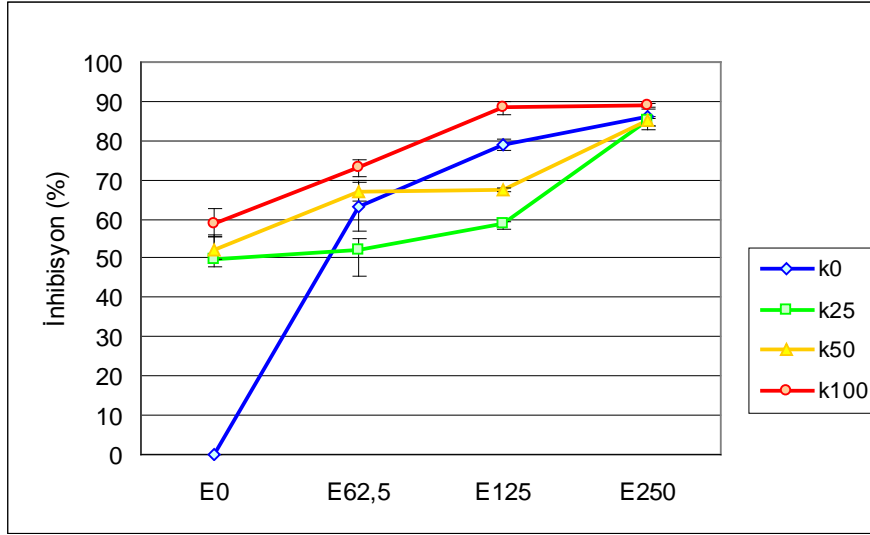


Şekil-10: Karboplatin çeşitli TİK konsantrasyonlarında tek başına ve 250, 125, 62,5µM esomeprazol ile kombinasyonlarının A549 hücreleri üzerindeki etkisi % inhibisyon olarak gösterilmiştir. K-250 E ($p<0.001$), K-125 E ($p<0.001$) ve K-62,5E ($p<0.001$). K: Karboplatin, E: Esomeprazol.

ATP-TCA Metodu ile A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinin Karboplatine Verdiği

Yanıt;

A549 hücreleri üzerine karboplatin 25, 50 ve 100 TİK'nda tek başına, esomeprazol 250 µM, 125 µM ve 62,5 µM konsantrasyonlarında tek başına ve kombinasyonları uygulandı. 72 saatlik inkübasyonu takiben ATP ölçümü yapıldı. İlaç grupları tümör hücreleri üzerindeki % inhibisyon değerleri açısından istatistiksel olarak incelendiğinde karboplatinin tek başına kullanımı ile karboplatin + 250 µM esomeprazol ile kombinasyonu arasında anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi ($p < 0.05$) (Şekil-11).



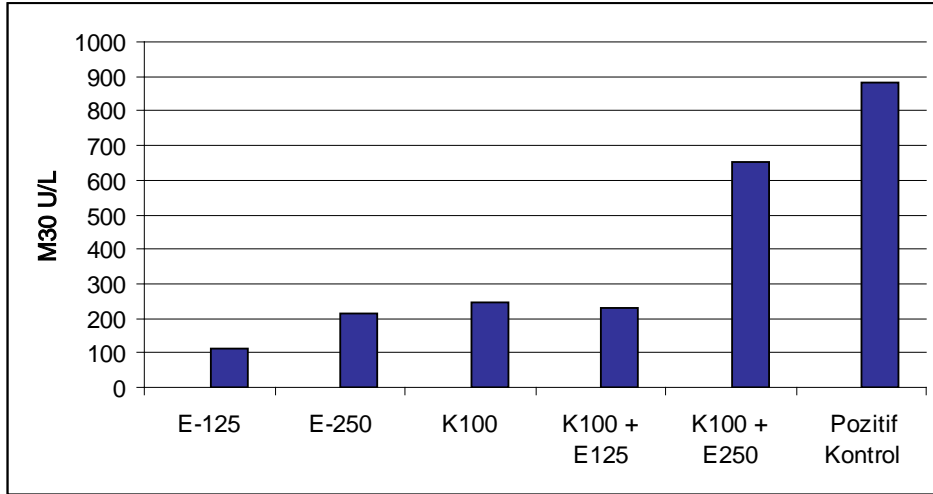
Şekil-11; A549 hücrelerinin, karboplatinin çeşitli TİK konsantrasyonlarında (25, 50, 100) tek başına ve 250, 125 ve 62,5 µM esomeprazol tek başına ve K-E ile kombinasyonlarının A549 hücreleri üzerindeki etkisi % inhibisyon olarak gösterilmiştir.

K= Karboplatin, E= Esomeprazol,

A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinin Karboplatin Uygulaması Sonrası M30

Antijen Düzeyleri ;

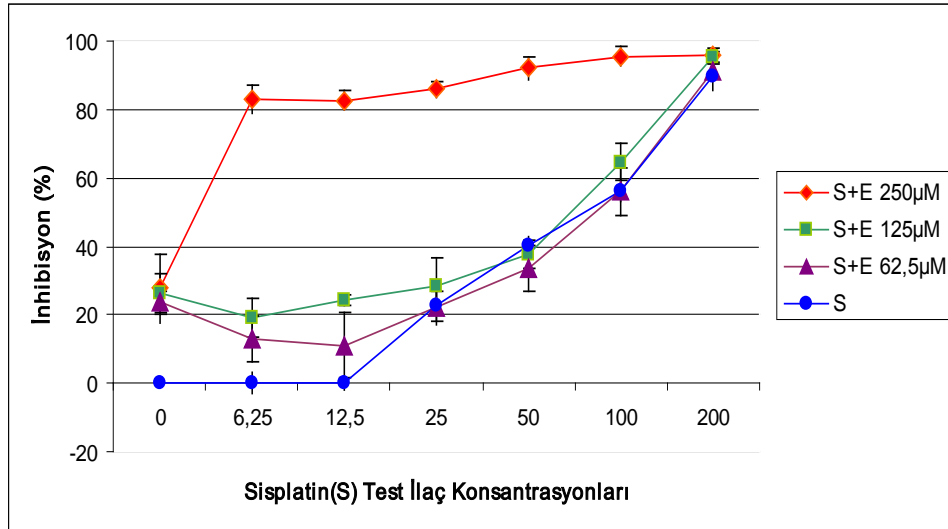
Esomeprazolün karboplatin ile birlikte yol açtığı artmış hücre ölümünün apoptozla mı yoksa nekrozla mı gerçekleştiğini ortaya koymak amacıyla M30 uygulandı. A549 hücrelerine karboplatin (100 TİK) kan düzeyine denk gelen dozda tek başına, esomeprazol (250 µM) ve (125 µM) konsantrasyonlarında tek başına ve iki ilacın kombinasyonları uygulandı. Uygulamadan 48 saat sonra M30 düzeylerine bakıldı (M30 düzeyi ne kadar yüksekse o kadar çok apoptotik ölüm vardır). Karboplatin ile esomeprazol 125 µM ve 250 µM konsantrasyonları tek başına uygulandıklarında M 30 düzeyleri açısından fark gözlenmedi. Karboplatin ve 250 µM esomeprazol birlikte uygulandığında gözlenen M30 düzeylerinin tek başına karboplatin veya esomeprazol (250 µM) uygulanmasına nazaran çok daha yüksek olduğu gözlendi (Şekil-12). Bu sonuçlar ışığında esomeprazolün apoptoz yoluyla tümör hücrelerinin ölümüne katkıda bulunduğu yada karboplatinin apoptotik etkisini arttırdığı ve bu etkinin de 250 µM 'lık dozda belirgin olduğunu söylenebilir.



Şekil-12: A549 hücrelerinin, karboplatinin 100 TİK konsantrasyonunda (kan konsantrasyonu) tek başına ve 250, 125 µM esomeprazol tek başına ve K-E ile kombinasyonlarının M30 Ag düzeyleri üzerindeki etkisi (U/L) gösterilmiştir. K: Karboplatin ve E: Esomeprazol.

MTT metodu ile A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinin Sisplatine Verdiği Yanıt;

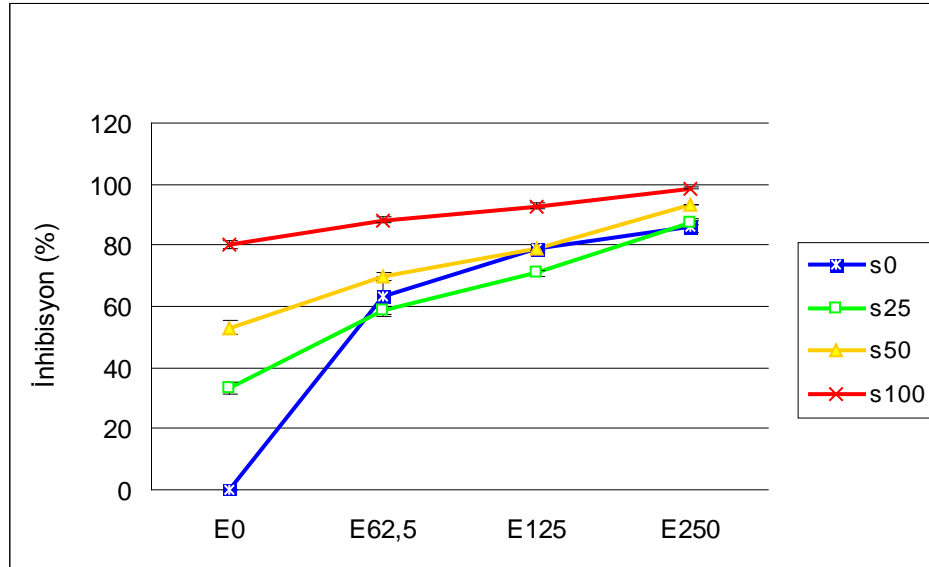
A549 hücrelerine çeşitli dozlarda sisplatin (200, 100, 50, 25, 12.5, 6,25 TİK) tek başına ve esomeprazol (250 µM, 125 µM, 62.5 µM) ile kombine edilerek uygulandı. Uygulanmadan 72 saat sonra hücre ölümü MTT metodu ile değerlendirildi. Tümör hücreleri üzerine sisplatinin çeşitli TİK'larda tek başına uygulanması ve esomeprazolün değişik konsantrasyonları olan 250 µM, 125 µM, 62.5 µM dozları ile kombinasyonlarının etkisi tek tek karşılaştırıldığında sisplatin + 250 µM esomeprazol kombinasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı oranda bir artmış inhibisyon gözlemlendi ($p < 0.001$) (Şekil-13). Bu artış sisplatinin en düşük dozu olan 6,25 TİK'da belirgindi. 6,25 TİK'da sisplatin uygulaması A549 hücreleri üzerinde ortalama -%3'lük (inhibisyonun aksine proliferatif bir etki) inhibisyona yol açarken, 250 µM esomeprazol ile aynı dozda sisplatin kombinasyonunda ise bu değer %83 gibi yüksek bir orana ulaştığı saptandı.



Şekil-13: Sisplatinin çeşitli TİK konsantrasyonlarında tek başına ve 250, 125, 62,5µM esomeprazol ile kombinasyonlarının A549 hücreleri üzerindeki etkisi % inhibisyon olarak gösterilmiştir. S-250 E ($p < 0.001$), S-125 E ($p > 0.05$), S-62,5E ($p > 0.05$). S: Sisplatin, E: Esomeprazol.

ATP-TCA Metodu ile A549 Akciğer Kanser Hücrelerinin Sisplatine Verdiği Yanıt;

A549 hücreleri üzerine sisplatin 25, 50 ve 100 TİK'nda tek başına, esomeprazol 250 µM, 125 µM ve 62,5 µM konsantrasyonlarında tek başına ve kombine edilerek uygulandı. 72 saatlik inkübasyonu takiben gerçekleştirilen ATP ölçümü sonucunda ilaç grupları arasında tümör hücreleri üzerindeki % inhibisyon değerleri karşılaştırıldığında sisplatinin tek başına kullanımı ile 250 µM esomeprazol ile kombinasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlemlendi. ($p < 0.05$). Sisplatinin 25 TİK'nda tek başına kullanımında akciğer kanseri hücrelerinin % inhibisyon değerleri ortalama 33 iken 250 µM esomeprazol ile kombinasyonda bu değerin % 88'lere varan oranda arttığı gözlemlendi (Şekil-14).

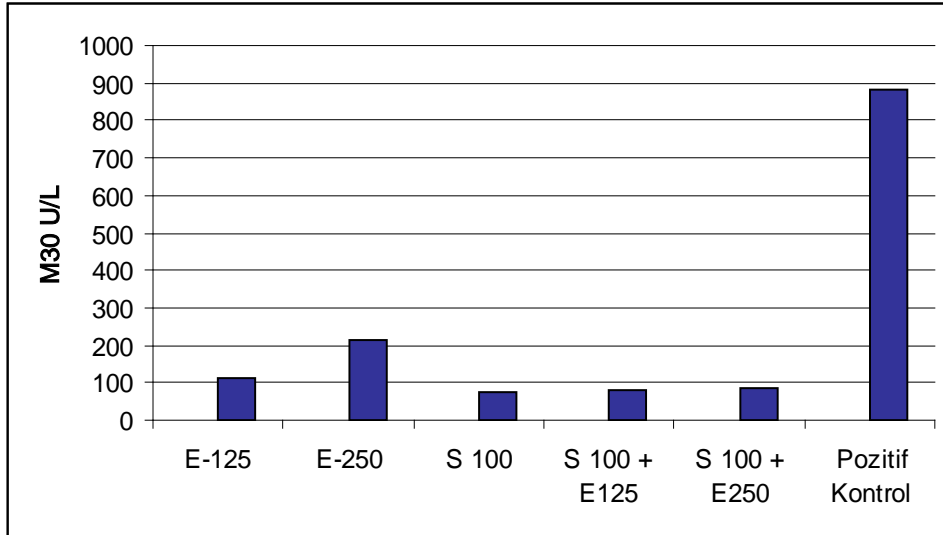


Şekil-14: A549 hücrelerine, sisplatinin (25, 50, 100) TİK konsantrasyonlarında tek başına ve 250, 125 ve 62,5 µM esomeprazol tek başına ve S-E ile kombinasyonlarının etkisi ATP-TCA metodu ile % inhibisyon değerleri olarak gösterilmiştir. S= Sisplatin, E= Esomeprazol,

A549 Akciğer Kanseri Hücrelerinin Sisplatin Uygulaması Sonrası M30 Antijen

Düzeyleri

A549 akciğer kanseri hücrelerine sisplatin (100 TİK) tek başına, esomeprazol 250 μ M ve 125 μ M konsantrasyonlarında tek başına ve kombine edilerek uygulandı. Sisplatin tek başına ve sisplatin+esomeprazol kombinasyonları uygulamasından 48 saat sonra M30 düzeylerine bakıldığında sisplatinin tek başına kullanılmasının veya esomeprazol ile kombinasyonlarının M30 düzeyleri üzerine herhangi bir katkısının olmadığı hatta esomeprazolün tek başına uygulanmasıyla özellikle 250 μ M'lık dozda M30 düzeyinin diğer seçeneklere göre artmış olduğu gözlemlendi. Her ne kadar veri sayısının azlığı nedeniyle istatistiksel anlamlılık analiz edilememiş olsa da pozitif kontrolle kıyaslandığında bu artışın pek anlamlı olmadığı söylenebilir (Şekil-15).



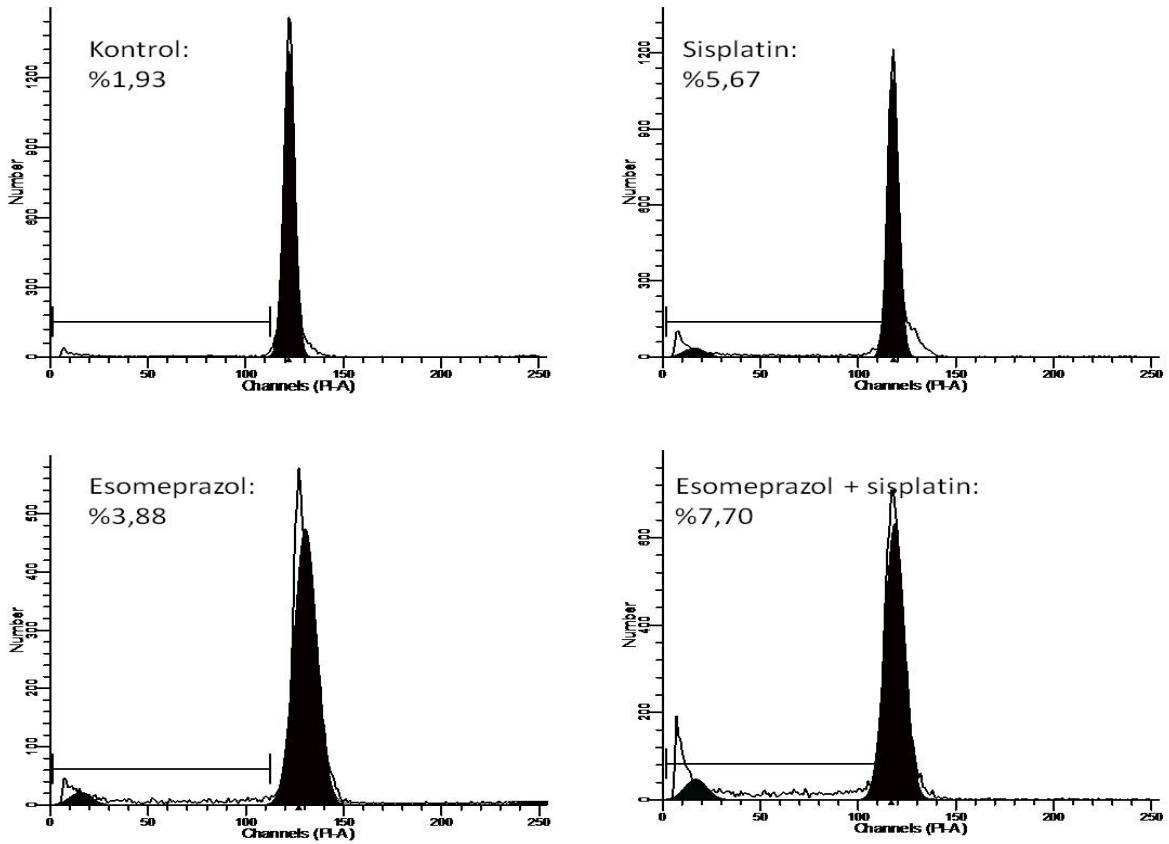
Şekil-15: A549 hücrelerinin, sisplatinin 100 TİK konsantrasyonunda tek başına, 250, 125 μ M esomeprazol tek başına ve S-E ile kombinasyonlarının M30 Ag düzeyleri üzerindeki etkisi (U/L) gösterilmiştir. S: Sisplatin, E: Eesomeprazol.

Sağlıklı Kontrol Lenfositlerde Sisplatin ve Esomeprazol Uygulaması Sonrası %

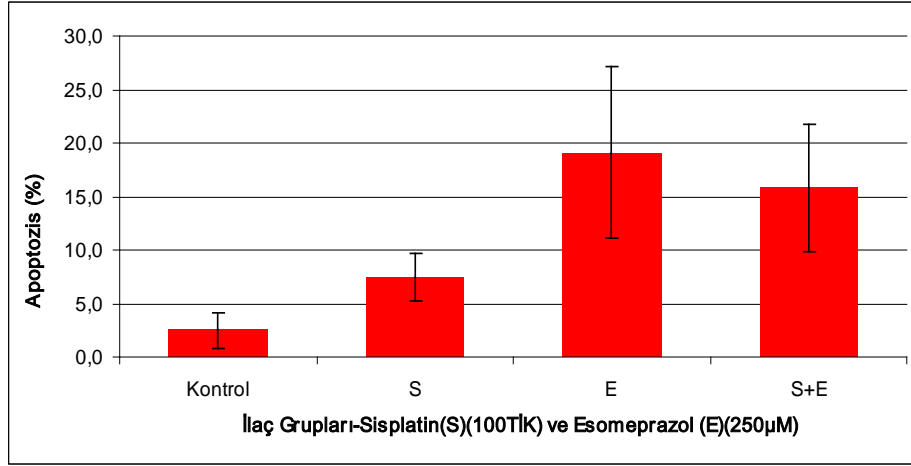
Apoptoz;

Sağlıklı kontrol vakalardan izole edilen lenfositlere esomeprazol 250 μ M ve 125 μ M konsantrasyonlarında ve sisplatin 100 TİK'larında tek başına ve kombine edilerek uygulandı. 72 saatlik inkübasyonu takiben akım sitometri ile % apoptoz değerlendirildi. İlaç uygulanmayan kontrol grubuna (K) ve sisplatinin tek başına kullanımına kıyasla hem esomeprazol 250 μ M (Şekil-16), hem de 125 μ M (Şekil-17) ile kombinasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı oranda artmış bir apoptoz saptandı ($p < 0.05$).

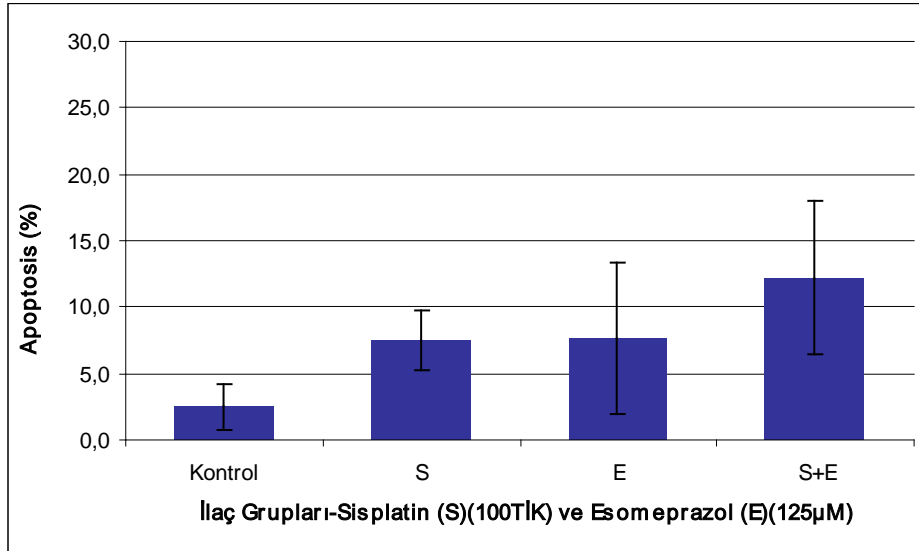
Sisplatin, esomeprazol ve sisplatin + esomeprazol kombinasyonlarının sağlıklı lenfositlere olan apoptotik etkisinin akım sitometrik hücre siklus analizi şekil-18'de gösterilmiştir.



Şekil-18: Sisplatin, esomeprazol ve sisplatin + esomeprazol kombinasyonlarının sağlıklı lenfositlere olan apoptotik etkisinin akım sitometrik hücre siklus analizi



Şekil-16: Sisplatin 100 TİK konsantrasyonunda tek başına, 250 µM esomeprazol tek başına ve S-E ile kombinasyonlarının lenfosit hücreleri üzerindeki etkileri (%) apoptoz olarak gösterilmiştir. S-(S+E 250)(p <0.05). (K: Kontrol S: Sisplatin, E: Esomeprazol).

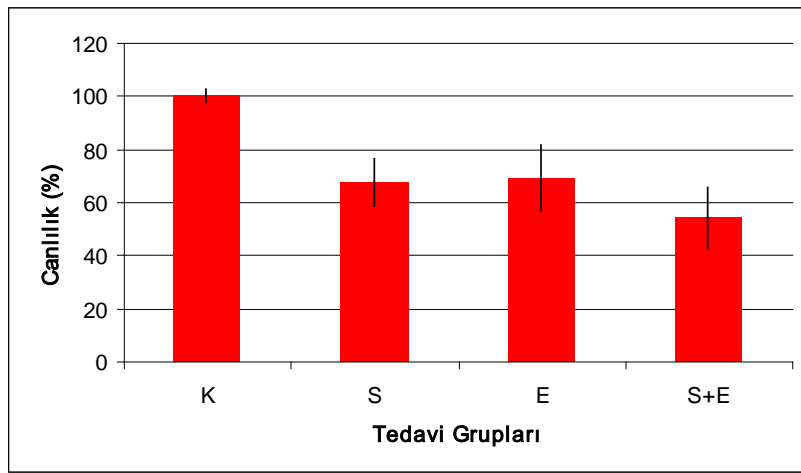


Şekil-17: Sisplatin 100 TİK konsantrasyonunda tek başına, 125µM esomeprazol tek başına ve S-E ile kombinasyonlarının lenfosit hücreleri üzerindeki etkileri (%) apoptoz olarak gösterilmiştir. S-(S+E 125)(p <0.05) K: Kontrol S: Sisplatin, E: Esomeprazol.

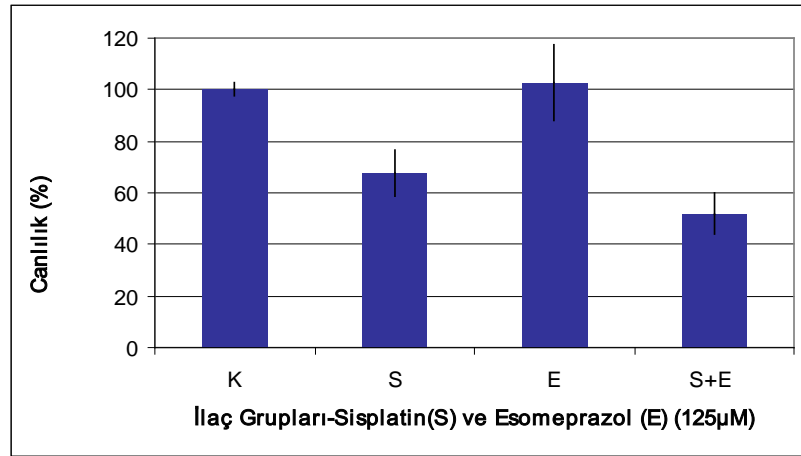
Sağlıklı Kontrol Lenfositler'de Sisplatin ve Esomeprazol Uygulaması Sonrası MTT

Metodu ile % Canlılık;

Sağlıklı kontrol vakalarının lenfositlerine esomeprazol 250 μ M ve 125 μ M ve sisplatin 100 TİK dozlarında ve kombine edilerek uygulandı. MTT metodu ile % canlılık değerlendirildi. İlaç uygulanmayan kontrol grubuna göre ve sisplatin tek başına kullanımına kıyasla hem 250 μ M hem 125 μ M esomeprazol ile olan kombinasyonlarda istatistiksel olarak anlamlı oranda azalmış bir % canlılık saptandı ($p < 0.000$), ($p < 0.000$) (Şekil-19, Şekil- 20).

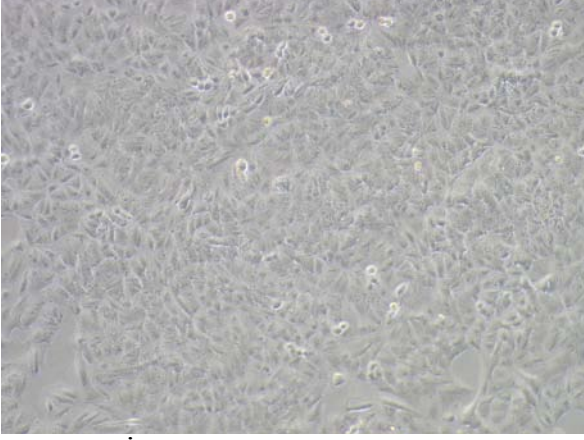


Şekil-19: Sisplatin 100 TİK konsantrasyonunda tek başına, 250 μ M esomeprazol tek başına ve S-E ile kombinasyonlarının lenfosit hücreleri üzerindeki etkisi (%) canlılık olarak gösterilmiştir. K: Kontrol S: Sisplatin, E: Esomeprazol.

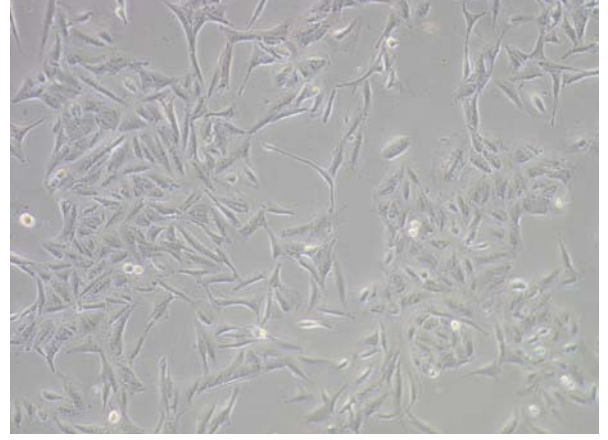


Şekil-20: Sisplatin 100 TİK konsantrasyonunda tek başına, 125 μ M esomeprazol tek başına ve S-E ile kombinasyonların lenfosit hücreleri üzerindeki etkisi (%) canlılık olarak gösterilmiştir. K: Kontrol, S: Sisplatin, E: Esomeprazol

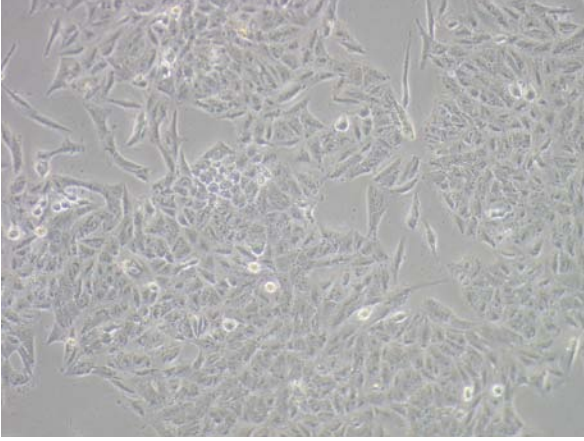
İlaç uygulanan hücrelerdeki hücre ölümü inverted mikroskopta ile 10X objektif altında görüntülenmiştir (Şekil-21- 28).



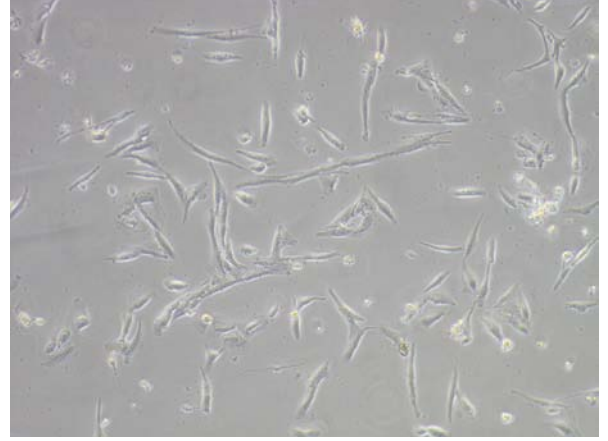
Şekil 21: İlaç uygulanmamış A549 kontrol hücreleri (x10)



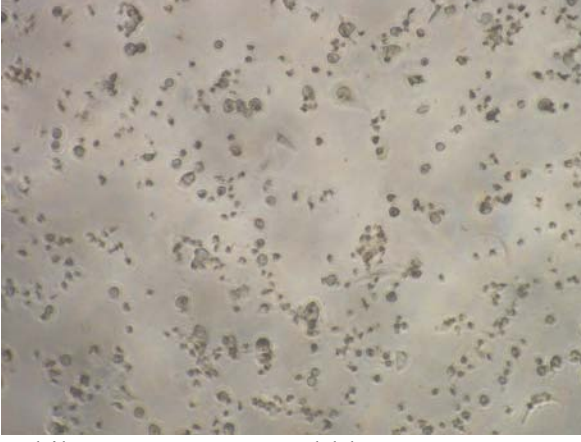
Şekil 23: 125µM esomeprazol uygulamasından 72 saat sonra A549 Hücreleri (x10)



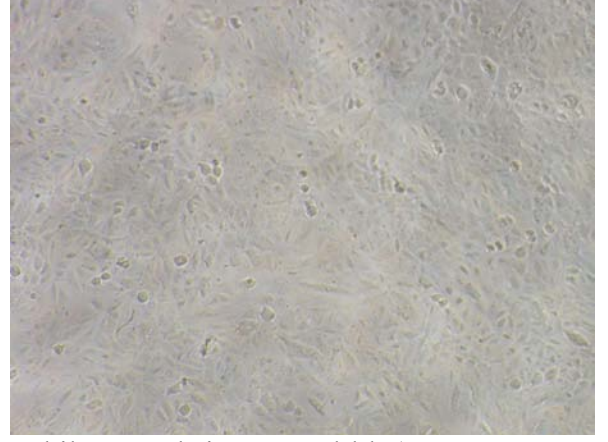
Şekil 22: 62,5µM esomeprazol uygulamasından 72 saat sonra A549 Hücreleri (x10)



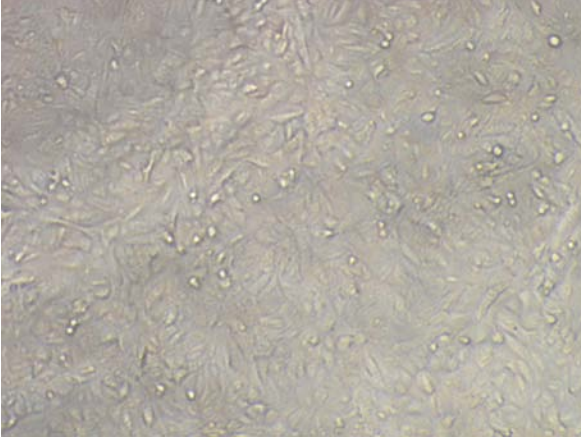
Şekil 24: 250µM esomeprazol uygulamasından 72 saat sonra A549 Hücreleri (x10)



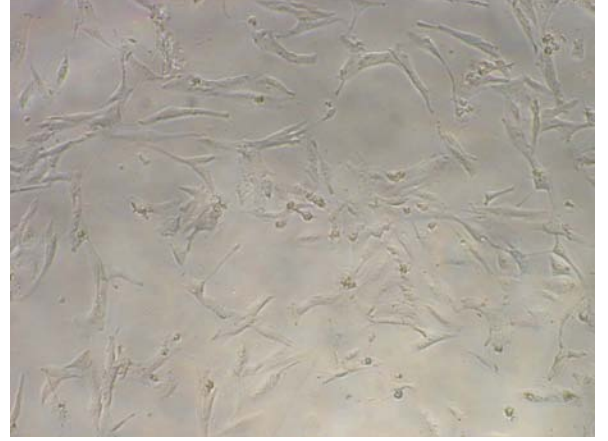
Şekil 25: Minimum canlılık (MinC) görülen A549 Hücreleri (x10)



Şekil 26: Maksimum canlılık (MaksC) görülen A549 Hücreleri (x10)



Şekil 27: 25 TIK'da cisplatin uygulamasından 72 saat sonra A549 Hücreleri (x10)



Şekil 28: 25 TIK cisplatin+250µM esomeprazol uygulamasından 72 saat sonra A549 Hücreleri (x10)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Malign tümörlerde hücre içi ile hücre dışı ortam arasındaki belirgin pH gradiyent varlığını ortaya koyan çalışmalar (93, 119, 120) ve asidik mikroçevrenin ve asidik veziküllerin (90, 91, 94, 97, 121) tümör hücrelerinin sitotoksik ilaçlara karşı rezistansında major rol oynadığının gösterilmesi tümör mikroçevredeki şartların değiştirilerek kemoterapiye duyarlılığın arttırılabileceği fikrini gündeme getirmiştir. Çalışmamızdaki ana hipotez akciğer kanser hücrelerinin sitotoksik ilaçlara karşı olan direncinin nedeni olarak gösterilen hücrel pH gradiyentlerinin PPI yardımıyla aşılabilceceği fikrine dayanmaktadır.

Bu çalışmada tümör hücrelerinde yüksek oranda eksprese olduğu (83, 87, 93, 120, 122) saptanan V-H ATPazları inhibe ettiği bilinen (123-125) PPI'den biri olan esomeprazol kullanılmıştır.

Başlangıç deneylerinde Luciani ve arkadaşlarının (107) kullandığı esomeprazol dozu temel alınarak optimal dozu saptamaya yönelik ön deneyler yapılmıştır. Bu deneylerde ilaçların yol açtığı sitotoksisiteyi ölçmek için hücrelerdeki dehidrogenaz aktivitesini ölçen kolorimetrik bir yöntem olan MTT metodu uygulanmıştır. Total dehidrogenaz aktivitesi ile hücre sayısı arasında doğru ilişki olduğu ilk kez Mossman ve ark. tarafından gösterilmiş (126) ve günümüze kadar hem proliferasyon hem de sitotoksisite deneylerinde yaygın olarak kullanılmıştır. Bu ilk deneylerimizin sonucunda A549 hücrelerini %50'sinin üremesini inhibe eden konsantrasyon (IC50) 500 µM olarak belirlenmiş ancak bu dozun suprafarmakolojik olabileceği düşünülerek 250 µM veya daha düşük esomeprazol dozları ile deneylerin yapılmasına karar verilmiştir. Esomeprazol tek başına veya akciğer kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan ilaçlarla (gemsitabin, vinorelbin, paklitaksel, dosetaksel, karboplatin, sisplatin) kombine edilerek deneylerimizde kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar hücre içerisindeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanan yüksek duyarlılığa sahip bir yöntem olan ATP-TCA kullanılarak doğrulanmıştır. Metodun prensibi canlı hücrelerdeki ATP'nin lusiferin ile reaksiyonunu takiben ortaya çıkan luminesan ışımının ölçümüne dayanmaktadır. Oluşan ATP canlı hücre sayısı ile direkt orantılı bir değerdir (127).

Çalışmamızın ilk sonuçları olarak gemsitabin, vinorelbin, paklitaksel ile dosetaksel yapılan esomeprazol kombinasyonlarında herhangi bir etki gözlenmemiştir. Sadece sisplatin veya karboplatin ile yapılan esomeprazol kombinasyonlarında etki gözlenmiştir. Esomeprazol ile sisplatin veya karboplatin kombine edildiğinde sitotoksisitede belirgin ve istatistiksel

olarak anlamlı bir artış izlenmiştir. Luciani ve arkadaşlarının (107) akciğer kanserinin yer almadığı solid tümör hücre dizilerinde (22 melanoma, 2 kolon adenokarsinoma, 2 meme kanseri, 2 over kanseri, 1 endometrium kanseri ve 1 T-lenfoblastoid hücre dizileri) yaptıkları bir çalışmada diğer bir PPI olan omeprazol kemoterapötiklerden 24 saat önce uygulanmış ve kemoterapötiklere olan duyarlılığı belirgin şekilde arttırdığı gösterilmiştir. Bizim bulgularımızdan farklı olarak, bu çalışmada omeprazol ilaçlarla aynı anda uyguladığında ilaç duyarlılığı üzerinde bir etki görülmemiştir. Bu durum kanser tipleri arasında V-ATPazların PPI'ne verdikleri cevaplar açısından farklılıklar olabileceğini düşündürdü.

Bizim çalışmamız da önceki çalışmalarda gösterildiği gibi (94, 97, 121, 128-131) tümör hücrelerinin etkisiz hale getiren birbiriyle ilişkili iki mekanizmadan oluşan hipotezlerini destekler niteliktedir. Bunlardan biri zayıf bazik özellik gösteren kanser ilaçlarının tümör hücrelerinin mikroçevresindeki asidik ortamla nötralizasyonu ve diğeri kanser ilaçların asidik veziküllere sekestrasyonu yoluyla eliminasyonudur. Bir PPI olan esomeprazol ile sisplatin ve karboplatin gibi zayıf bazik özellik gösteren kanser ilaçlarının (107) kombinasyonlarında hücre ölüm artışı gözlenmiştir. Bu artmış ölüm zayıf asidik özellik gösteren ilaçlar olan gemsitabin, vinorelbin, dosetaksel ve paklitaksel ile kombinasyonlarda gözlenmemiştir. Özellikle akciğer kanseri hücre dizilerinde zayıf asidik özelliğe sahip ilaçlarla PPI kombinasyonlarının additif bir etki sağlamadığı düşünülmüştür.

Çalışmamızda ardı ardına yapılan deneylerle esomeprazolün oluşturduğu sinerjik etki kanıtlandıktan sonra tümör hücre ölümünün mekanizmasını konusunda fikir sahibi olmak için kan konsantrasyonları düzeyinde karboplatin ve sisplatin tek başına ve esomeprazol ile kombinasyonlar şeklinde A549 hücrelerine uygulandı. Apoptoza özgü bir belirteç olan kırılmış sitokeratin 18 (CK18)'i saptamak üzere ELISA ile M30 antijeni araştırıldı. Total CK18, proliferasyon halindeki hücrelerde bol miktarda üretilen ve nekroz sırasında membran bütünlüğü bozulunca dolaşıma salgılanan bir proteindir. Çalışmamızda karboplatinin tek başına ve 250 µM esomeprazol ile kombinasyonunda gözlenen M30 artışı karboplatinin apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olduğunu düşündürmüştür. 250 µM Esomeprazolün sisplatin ile kombinasyonunda ise M30 artışı gözlenmemesi sisplatinin karboplatinden farklı olarak nekroz yoluyla hücre ölümüne yol açtığını destekler niteliktedir. Ancak, zaman ve doza bağımlı olarak apoptotik yolların devreye girebileceği ve bu durumun değişebileceği akılda tutulmalıdır. Nitekim sisplatin'in zamana ve doza bağımlı olarak akciğer kanser hücrelerinde

apoptozla hücre ölümüne yol açtığı birçok çalışmada rapor edilmiştir (132, 133). Sisplatin tarafından indüklenen apoptozda iki olası yolağın rol aldığı gösterilmiştir. Bunlardan biri sisplatine yanıt olarak hücrelerin yüzeyinde CD95 ve TRAIL denen ölüm reseptör sistemlerinin ekspresyonlarının artışı (134-136) ve sonuçta kaspaz-8'in aktive olarak apoptozu tetiklemesidir (137-139). İkinci olası yolağ ise sisplatin tarafından mitokondriyal fonksiyonların bozulması (140, 141) sonucunda sitokrom c ve Apaf-1'in salınarak pro-kaspaz 9'un aktivasyonudur (142). Çalışmamızda ilginç olarak pozitif kontrol olarak kullanılan 200 TİK dozunda sisplatin ile çok yüksek M30 düzeyleri elde edilirken 100 TİK dozlarında M30 saptanamaması buna karşın MTT ile yüksek hücre ölümü görülmesi, yüksek dozlarda sisplatinin apoptozu indüklediği daha düşük dozlarda ise nekrotik ölümü başlattığını düşündürmüştür.

Her ne kadar PPI'leri milyonlarca peptik ülserli hastanın tedavisinde minimal yan etki ve ilaç etkileşimi ile güvenle kullanılan bir ilaç grubu olmasına rağmen (83, 143) ve bazı çalışmalarda PPI'lerinin (lansoprazol ve omeprazol) lenfosit apoptozuna yol açtığı rapor edilmiştir (144, 145). Bir başka çalışmada ise omeprazolün insan makrofaj ve lenfositlerinin fonksiyonunu bozucu etkisi olmadığı iddia edilmiştir (93). Bizim çalışmamızda da sisplatin ve karboplatin ile kombinasyonda kullandığımız esomeprazol dozunun periferik kan lenfositleri üzerinde toksik etkilerinin bulunup bulunmadığının incelenmesi amaçlanmıştır. Sağlıklı kişilerden izole edilen periferik kan mononükleer hücrelerine plazma düzeylerine karşılık gelen konsantrasyonda sisplatin ile esomeprazolün çeşitli dozlarını tek başına ve kombine olarak uygulandıktan sonra apoptozu uğrayan hücrelerin oranları akım sitometrisi ile saptanmıştır. Herhangi bir ilaç uygulanmayan kontrol grubu veya tek başına sisplatin kullanımı ile karşılaştırıldığında esomeprazol kombinasyonlarında dozun artışına bağlı olarak apoptotik hücrelerde artış olduğu gösterilmiştir. Esomeprazol ile ilgili bu ilk verinin daha sonraki çalışmalarımızda farklı apoptoz saptama yöntemleri ile de doğrulanması amaçlanmaktadır.

Bu tezde elde edilen veriler, esomeprazolün tümörün kemoterapötiklere karşı duyarlılığını arttırdığını ve kanser ilaçlarının yüksek dozda kullanılmasının yaratacağı yan etkilerden koruyabileceğini düşündürmektedir. Ancak, saptamış olduğumuz lenfositlerdeki artmış sitotoksik etki esomeprazolün kemoterapötiklerle birlikte kombine kullanılmasını

sınırlayıcı bir durumdur. Bu konuda hücre ölüm mekanizmalarını ortaya koymaya yönelik deneyler ileriki çalışmalarımızda gerçekleştirilecektir.

EKLER

Zenginleştirilmiş RPMI-1640 (cRPMI-1640)

Zenginleştirilmiş RPMI-1640, 5080 ml RPMI 1640 besiyeri (Biochrom Ag, Almanya, Katalog no: F 1215) içerisine;

- 50 ml Fetal Calf Serum (FCS) (Biological Industries, Israel, Katalog no:04-001-1A)

- 10 ml Penicillin/Streptomycin/Kanamycin karışımı (5 ml Penicillin/Streptomycin, (10000), Gibco Katalog no: 15140-122+ 5 ml Kanamycin (100x) Gibco, Katalog no: 15160-047)

- 10 ml MEM Vitamin/L- Glutamine karışımı (5 ml Vitamin (100x), Gibco Katalog no:11120-037+ 5 ml L- Glutamine 200mM, Gibco, Katalog no: 25030-024)

- 10 ml Na-Pyruvate/Non essential AS (MEM non essential amino acids (100x) Gibco, Katalog no: 11140-035+5 ml Na pyruvate MEM 100mM, Gibco, Katalog no: 11360-039)

ilave edilerek kullanım hazır hale getirildi.

PBS Hazırlanması:

1 X PBS hazırlamak için ticari temin edilen Dulbecco's Tuzlu Fosfatlı Tamponu (Dulbecco's Phosphat Buffered Saline 10x; Sigma, D1283, ABD) steril distile su ile 10 kat sulandırıldı.

Tripsinizasyon İşlemi ve Pasaj:

Tripsinizasyon işlemi için 25 cm²'lik kültür kabındaki konfluent hücrelerin üzerindeki besiyeri aspire edilerek uzaklaştırıldı. Hücreler 5ml steril PBS (bakınız ekler) ile yıkandı. PBS aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra hücelere 0.5 ml tripsin solüsyonu (Tripsin/EDTA, Multicell, Wisent Inc, Quebec, Kanada) eklenerek 37⁰C'de, %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi. Mikroskop altında hücre kabından ayrıldığı kontrol edilen hücelere 5 ml besiyeri ortamı eklenerek hücre süspansiyonu falkon tüpe aktarıldı. Tüp 800 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı kısmı atıldı. Elde edilen hücre pelleti 1 ml hücre besiyeri ortamı içerisinde iyice

özöldükten sonra üzerlerine 13 ml besiyeri eklendi. 14 ml'lik hücre süspansiyonları 75 cm²'lik költür kabına aktarıldı. 37⁰C'de, %5 CO₂'li etüvde költüre edildi.

MTT Çözeltisi:

MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, M5655, Sigma, ABD) kimyasalı 5 mg/ml PBS tamponu içerisinde pH 7.2 olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan MTT çözeltisi 0,22 µm'lik filtreden (Sterile, endotoxin-free, hydrophilic cellulose asetat membrane GyroDisc CA-PC, Cat No: 1520012, Orange Scientific; Belçika) geçirilerek steril hale getirildi.

SDS Çözeltisi:

Sodyum Dodecyl Sülfat (SDS, Molecular grade, AppliChem, Almanya) kullanılarak 0,01N HCl içeren %10'luk solüsyon distile su ile hazırlandı.



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

BURSA

Sayı : B.30.2.ULU.0.01.00.01.02.020/ 2454

08-03-2008

Konu : Etik Kurul Kararı.

Sayın
Prof.Dr.H.Barbaros ORAL
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Fakültemiz Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulunun 19 Şubat 2008 tarih ve 2008-4/20 no'lu kararı ile usul ve esas yönünden uygun görülen "**Esomeprazol'un Klasik Kemoterapötiklerle Kombinasyonlarının Akciğer Kanseri Hücreleri ve Periferik Kan Mononükleer Hücreleri Üzerine Olan Etkilerinin İncelenmesi**" isimli çalışmanız Dekanlığımızca da uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr.Müfit PARLAK
D e k a n

NOT: Başvuru,AHO ve Kriterler formu Uzm.Dr.Arzu Yılmaztepe Oral'a gönderilmiştir.

EK:
-Etik Kurul kararı (1 adet)

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ULUDAG UNIVERSITY
Görüle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI


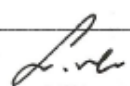

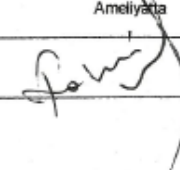
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	Esomeprazol'un Klasik Kemoterapötiklerle Kombinasyonlarının Akciğer Kanseri Hücreleri ve Periferik Kan Mononükleer Hücreleri Üzerine Olan Etkilerinin İncelenmesi
	ARAŞTIRMA SORUMLULARI	Uzm.Dr.Arzu YILMAZTEPE ORAL, Prof.Dr.H.Barbaros ORAL
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Doç.Dr.Engin Ulukaya
	ARAŞTIRMA YARDIMCILARI	-
	ARAŞTIRMANIN TAHMİNİ SÜRESİ	1 yıl
	KATILACAK GÖNÜLLÜ SAYISI	20 (sağlıklı gönüllü)
	DESTEKLEYİCİ KURULUŞ	-
ARAŞTIRMANIN TÜRÜ / NİTELİĞİ	Laboratuvar / Doktora Tez çalışması	

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Değişiklik No. sı
		ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	19.02.2008
	AYDINLATILMIŞ HASTA ONAM FORMU	19.02.2008	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2008-4/20	Tarih : 19 Şubat 2008
	<p>Fakültemiz Mikrobiyoloji AD Uzmanı Dr.Arzu Yılmaztepe Oral ve Öğretim Üyesi Prof.Dr.H.Barbaros Oral'ın sorumluluğunda yürütülmesi planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgelerin araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda yapılmasının uygun olduğuna ve araştırmanın aşağıda belirtilen hususlar göz önüne alınarak yürütülmesi gerektiğinin sorumlu araştırmacılara bildirilmesine oybirliği ile karar verildi.</p> <p>1.Çalışmanın başlama tarihinin bildirilmesine ve çalışma tamamlandığına özet bir sonuç raporunun hazırlanarak kurulumuza iletilmesi. 2.Çalışmaya alınan gönüllülerin (sağlıklı gönüllüler) adı-soyadı ve varsa protokol numaralarının 4 ayda bir kurulumuza yazılı olarak bildirilmesi.</p>	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU
---------------	---------------------------------

ÜYELER						
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Levent BÜYÜKUYUSAL Başkan	Farmakoloji	U.Ü.T.F. Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Mine Sibel GÜRÜN Başkan Yardımcısı	Farmakoloji	U.Ü.T.F. Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	İznil
Prof.Dr.Selâm Giray NAK Raportör	İç Hastalıklardan	U.Ü.T.F. İç Hastalıklardan AD. Gastroenteroloji BD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Ayşegül DEMİRHAN Üye	Deontoloji	U.Ü.T.F. Deontoloji AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. İrfan KIRIŞTIOĞLU Üye	Çocuk Cerrahisi	U.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	Ameliyatta
Prof.Dr.Fahir ÖZKALEMKAŞ Üye	İç Hastalıklardan Hematoloji	U.Ü.T.F. İç Hastalıklardan AD. Hematoloji BD	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	

* Araştırma ile İlişki

** Toplantıda Bulunma

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ULUDAG UNIVERSITY
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

Prof.Dr.Ömer YERCI Üye	Patoloji	U.Ü.T.F. Patoloji AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<i>Ömer Yerci</i>
Doç. Dr. Zehra SERDAR Üye	Biyokimya	U.Ü.T.F. Biyokimya AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<i>Zehra Serdar</i>
Doç.Dr.Betül Berrin SEVİNİR Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıklardan	U.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıklardan AD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	Kongrede
Doç.Dr.Davit SABA Üye	Kalp ve Damar Cerrahisi	U.Ü.T.F. Kalp ve Damar Cerrahisi AD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<i>Davit Saba</i>
Av. E.Dilek HARÇCI Üye	Hukuk	U.Ü.Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	<i>E. Dilek Harçcı</i>

KAYNAKLAR

1. GINSBERG MS. Epidemiology of lung cancer. *Seminars in Roentgenology*, 40: 83-89, 2005.
2. JEMAL A, THOMAS A, MURRAY T, THUN M. Cancer statistics, 2002. *CA: A cancer Journal for Clinicians*, 52: 23-47, 2002.
3. SHIELDS TW. Carcinoma of the lung. Editors: SHIELDS TW, LOCICERO J, PONN RB, *General Thoracic Surgery*, 5th edition. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, page 1215-1442, 2000.
4. PEARSON FG. Lung Cancer. Editors: PEARSON FG, COOPER JD, DESLAURIERS J, GINSBERG RJ, HIEBERT C, PATTERSON GA, URSCHHEL HC, *Thoracic Surgery*, 2nd edition, Churchill Livingstone, Philadelphia, page 772-924, 2002.
5. GINSBERG RJ, RUBINSTEIN LV. Randomized trial of lobectomy versus limited resection for T1 N0 non-small cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *The Annals of Thoracic Surgery*, 60: 615-622, 1995.
6. MYRDAL G, GUSTAFSSON G, LAMBE M, HORTE LG, STAHL E. Outcome after lung cancer surgery. Factors predicting early mortality and major morbidity. *European Journal of Cardiothoracic Surgery*, 20: 694-699, 2001.
7. DARLING G, DRESLER CM. Clinical Presentation of Lung Cancer. Editors: PEARSON FG, COOPER JD, DESLAURIERS J, GINSBERG RJ, HIEBERT C, PATTERSON GA, URSCHHEL HC, *Thoracic Surgery*, 2nd editon, Churchill Livingstone, Philadelphia, page 1269-1271, 2002.
8. SHIELDS TW. Surgical Treatment of nonsmall cell lung cancer. Editors: SHIELDS TW, LOCICERO J, PONN RB , *General Thoracic Surgery*, 5th edition, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, page 1311-1341, 2000.
9. PAUK N, KUBIK A, ZATLOUKAL P, KREPELA E. Lung cancer in women. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 48: 1-9, 2005.
10. TC Sağlık Bakanlığı: Kanser istatistikleri, (<http://www.kanser.gov.tr/index.php?cat=11>).
11. ALBERG AJ, SAMET JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest*, 123: 21S-49S, 2003.
12. MULSHINE JL. Reducing lung cancer risk: early detection. *Chest*, 116: 493S-496S, 1999.
13. KÖKTÜRK N, ÖZTÜRK C, KIRISOĞLU C. Sigara ve akciğer kanseri. *Solunum*, 5: sayfa 139-145, 2003.
14. SARDARI NIA P, WEYLER J, COLPAERT C, VERMEULEN P, VAN MARCK E, VAN SCHIL P. Prognostic value of smoking status in operated non-small cell lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 47: 351-359, 2005.
15. WEI Q, SPITZ MR. The role of DNA repair capacity in susceptibility to lung cancer: a review. *Cancer Metastasis Reviews*, 16: 295-307, 1997.
16. ROM W. Asbestos related lung disease. In: FISHMAN A, ELIAS J, FISHMAN J, GRIPPI M, KAISER L, SENIOR R (eds.): *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders (3rd ed)* New York: Mc Graw Hill, page 877-891, 1998.
17. RUANO-RAVINA A, FIGUEIRAS A, BARROS-DIOS JM. Lung cancer and related risk factors: an update of the literature. *Public Health*, 117: 149-156, 2003.

18. SMITH TJ, YANG GY, SERIL DN, LIAO J, KIM S. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene. *Carcinogenesis*, 19: 703-706, 1998.
19. ALKOÇLU A, ÖZKURT S. Akciğer kanserini önleyici ilaç tedavisi. In: HASTÜRK S, YÜKSEL M (eds.): Akciğer kanseri İstanbul: Özlem Grafik Matbaacılık, sayfa 351–358, 2000.
20. SCHOTTENFELD D. Etiology and epidemiology of lung cancer. In: PASS H, MITCHELL J, JOHNSON D, TURRISI A, MINNA J (eds.): Lung Cancer (2nd ed) Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, page 367-388, 2000.
21. BOUCHARDY C, BENHAMOU S, JOURENKOVA N, DAYER P, HIRVONEN A. Metabolic genetic polymorphisms and susceptibility to lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 32: page 109-112, 2001.
22. KÖKTÜRK N, KIRIŞOĞLU C, ÖZTÜRK C. Akciğer kanseri moleküler biyolojisi. *Solunum*, 5: sayfa 127-138, 2003.
23. JACOBSON D. Ras mutations in lung cancer. In: BRAMBILLA C, BRAMBILLA E (eds.): Lung tumors: fundamental biology and clinical management. New York: Marcel Dekker Inc., page 139–156, 1999.
24. FONG KM, SEKIDO Y, MINNA JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 118: 1136-1152, 1999.
25. MABRY M. Activating oncogenes in lung cancer. In: KANE M, BUNN P (eds.): Biology of lung cancer. New York.: Marcel Dekker Inc., page 391–412, 1998.
26. HUSSAIN SP, HARRIS CC. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. *Mutation Research*, 462: 311-322, 2000.
27. FONG KM, MINNA JD. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clinics in Chest Medicine*, 23: 83-101, 2002.
28. KERR JF, WYLLIE AH, CURRIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26: 239-257, 1972.
29. BARISIC K, PETRIK J, RUMORA L. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharmaceutica (Zagreb, Croatia)*, 53: 151-164, 2003.
30. BROUCKAERT G, KALAI M, KRYSKO DV, SAELENS X, VERCAMMEN D, NDLOVU M, HAEGEMAN G, D'HERDE K, VANDENABEELE P. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Molecular Biology of the Cell*, 15: 1089-1100, 2004.
31. HUPPERTZ B, FRANK HG, KAUFMANN P. The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization. *Anatomy and Embryology*, 200: 1-18, 1999.
32. HIROSE Y, YOSHIMI N, SUZUI M, KAWABATA K, TANAKA T, MORI H. Expression of bcl-2, bax, and bcl-XL proteins in azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas. *Molecular Carcinogenesis*, 19: 25-30, 1997.
33. ÖKTEM S, ÖZHAN MH, ÖZOL D. Apoptozisin Önemi. *Toraks Dergisi*, 2: 91-95, 2001.
34. STALEY K, BLASCHKE AJ, CHUN J. Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semi-quantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. *Cell Death and Differentiation*, 4: 66-75, 1997.
35. ISRAELS LG, ISRAELS ED. Apoptosis. *The Oncologist*, 4: 332-339, 1999.
36. MCCARTHY NJ, BENNET MR. Death signalling by the CD95/TNFR family of death domain-containing receptors. In: JACOBSON MD, MCCARTHY NJ (eds.): Apoptosis: the

molecular biology of programmed cell death. Oxford: Oxford University Press, page 200-234, 2002.

37. HUNOT S, FLAVELL RA. Apoptosis. Death of a monopoly? *Science* (New York, NY, 292: 865-866, 2001.

38. HASTÜRK S. Akciğer kanserinin moleküler biyolojisi. In: HASTÜRK S, YÜKSEL M (eds.): Akciğer Kanseri. İstanbul: Özlem Grafik Matbaacılık, sayfa 1–27, 2000.

39. PASQUINI L, PETRUCCI E, RICCIONI R, PETRONELLI A, TESTA U. Sensitivity and Resistance of Human Cancer Cells to TRAIL: Mechanisms and Therapeutical Perspectives. *Cancer Therapy*, 4: 47-52, 2006.

40. FADEEL B, ORRENIUS S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine*, 258: 479-517, 2005.

41. ZEREN E. Akciğer Kanserine Patolojik Yaklaşım. Editörler: HASTÜRK S, YÜKSEL M Akciğer Kanseri. İstanbul, Özlem Grafik Matbaacılık, sayfa 29-45, 2000.

42. ALTINBAŞ M. Onkoloji El Kitabı, 2. Baskı, Ankara, MN MedikaNobel Ltd. Şti, sayfa 18-30, 2000.

43. KAYAALP O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 11. Baskı, Ankara, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd Şti., sayfa 168, 2005.

44. CASCIATO DA, TERRITO MC. Manual of Clinical Oncology (Klinik Onkoloji El Kitabı) Çeviri Editorü: MANAVOĞLU O. 1. baskı Palme Yayıncılık, Ankara, sayfa 55-95, 2004.

45. VAUPEL P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Seminars in Radiation Oncology*, 14: 198-206, 2004.

46. LEU AJ, BERK DA, LYMBOUSSAKI A, ALITALO K, JAIN RK. Absence of functional lymphatics within a murine sarcoma: a molecular and functional evaluation. *Cancer Research*, 60: 4324-4327, 2000.

47. PADERA TP, KADAMBI A, DI TOMASO E, CARREIRA CM, BROWN EB, BOUCHER Y, CHOI NC, MATHISEN D, WAIN J, MARK EJ, MUNN LL, JAIN RK. Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. *Science* (New York, NY, 296: 1883-1886, 2002.

48. KUMAGAI Y, TOI M, INOUE H. Dynamism of tumour vasculature in the early phase of cancer progression: outcomes from oesophageal cancer research. *The Lancet Oncology*, 3: 604-610, 2002.

49. DEWHIRST MW, KIMURA H, REHMUS SW, BRAUN RD, PAPAHDJOPOULOS D, HONG K, SECOMB TW. Microvascular studies on the origins of perfusion-limited hypoxia. *The British Journal of Cancer*, 27: S247-251, 1996.

50. YOUNG JS, LUMSDEN CE, STALKER AL. The significance of the tissue pressure of normal testicular and of neoplastic (Brown-Pearce carcinoma) tissue in the rabbit. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 62: 313-333, 1950.

51. JAIN RK. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Research*, 47: 3039-3051, 1987.

52. HELDIN CH, RUBIN K, PIETRAS K, OSTMAN A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 4: 806-813, 2004.

53. AUKLAND K, REED RK. Interstitial-lymphatic mechanisms in the control of extracellular fluid volume. *Physiological Reviews*, 73: 1-78, 1993.

54. CLARK RA, FOLKVORD JM, HART CE, MURRAY MJ, MCPHERSON JM. Platelet isoforms of platelet-derived growth factor stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. *The Journal of Clinical Investigation*, 84: 1036-1040, 1989.

55. NAKAMURA Y, HIRANO S, SUZUKI K, SEKI K, SAGARA T, NISHIDA T. Signaling mechanism of TGF-beta1-induced collagen contraction mediated by bovine trabecular meshwork cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43: 3465-3472, 2002.
56. SUNDBERG C, RUBIN K. Stimulation of beta1 integrins on fibroblasts induces PDGF independent tyrosine phosphorylation of PDGF beta-receptors. *The Journal of Cell Biology*, 132: 741-752, 1996.
57. GUTMANN R, LEUNIG M, FEYH J, GOETZ AE, MESSMER K, KASTENBAUER E, JAIN RK. Interstitial hypertension in head and neck tumors in patients: correlation with tumor size. *Cancer Research*, 52: 1993-1995, 1992.
58. MILOSEVIC M, FYLES A, HEDLEY D, PINTILIE M, LEVIN W, MANCHUL L, HILL R. Interstitial fluid pressure predicts survival in patients with cervix cancer independent of clinical prognostic factors and tumor oxygen measurements. *Cancer Research*, 61: 6400-6405, 2001.
59. LESS JR, POSNER MC, BOUCHER Y, BOROCHOVITZ D, WOLMARK N, JAIN RK. Interstitial hypertension in human breast and colorectal tumors. *Cancer Research*, 52: 6371-6374, 1992.
60. VAUPEL P, SCHLENGER K, KNOOP C, HOCKEL M. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. *Cancer Research*, 51: 3316-3322, 1991.
61. KALLINOWSKI F, ZANDER R, HOECKEL M, VAUPEL P. Tumor tissue oxygenation as evaluated by computerized-pO₂-histography. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 19: 953-961, 1990.
62. KOCH CJ. Measurement of absolute oxygen levels in cells and tissues using oxygen sensors and 2-nitroimidazole EF5. *Methods in Enzymology*, 352: 3-31, 2002.
63. CARDENAS-NAVIA LI, YU D, BRAUN RD, BRIZEL DM, SECOMB TW, DEWHIRST MW. Tumor-dependent kinetics of partial pressure of oxygen fluctuations during air and oxygen breathing. *Cancer Research*, 64: 6010-6017, 2004.
64. VAN DEN BERG AP, WIKE-HOOLEY JL, VAN DEN BERG-BLOK AE, VAN DER ZEE J, REINHOLD HS. Tumour pH in human mammary carcinoma. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology*, 18: 457-462, 1982.
65. RAGHUNAND N, MAHONEY B, VAN SLUIS R, BAGGETT B, GILLIES RJ. Acute metabolic alkalosis enhances response of C3H mouse mammary tumors to the weak base mitoxantrone. *Neoplasia (New York, NY)*, 3: 227-235, 2001.
66. MORITA T, NAGAKI T, FUKUDA I, OKUMURA K. Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells. *Mutation Research*, 268: 297-305, 1992.
67. MARTINEZ-ZAGUILAN R, SEFTOR EA, SEFTOR RE, CHU YW, GILLIES RJ, HENDRIX MJ. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, 14: 176-186, 1996.
68. GATENBY RA, GILLIES RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature Reviews Cancer*, 4: 891-899, 2004.
69. NEWELL K, FRANCHI A, POUYSSEGUR J, TANNOCK I. Studies with glycolysis-deficient cells suggest that production of lactic acid is not the only cause of tumor acidity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 1127-1131, 1993.

70. YAMAGATA M, HASUDA K, STAMATO T, TANNOCK IF. The contribution of lactic acid to acidification of tumours: studies of variant cells lacking lactate dehydrogenase. *British Journal of Cancer*, 77: 1726-1731, 1998.
71. FINBOW ME, HARRISON MA. The vacuolar H⁺-ATPase: a universal proton pump of eukaryotes. *The Biochemical Journal*, 324 (Pt 3): 697-712, 1997.
72. FORGAC M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Cancer*, 8: 917-929, 2007.
73. CIPRIANO DJ, WANG Y, BOND S, HINTON A, JEFFERIES KC, QI J, FORGAC M. Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1777: 599-604, 2008.
74. JEFFERIES KC, CIPRIANO DJ, FORGAC M. Function, structure and regulation of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476: 33-42, 2008.
75. SAUTIN YY, LU M, GAUGLER A, ZHANG L, GLUCK SL. Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated effects of glucose on vacuolar H⁺-ATPase assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells. *Molecular and Cellular Biology*, 25: 575-589, 2005.
76. TROMBETTA ES, EBERSOLD M, GARRETT W, PYPAERT M, MELLMAN I. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science (New York, NY)*, 299: 1400-1403, 2003.
77. FENG Y, FORGAC M. A novel mechanism for regulation of vacuolar acidification. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 19769-19772, 1992.
78. FENG Y, FORGAC M. Cysteine 254 of the 73-kDa A subunit is responsible for inhibition of the coated vesicle (H⁺)-ATPase upon modification by sulfhydryl reagents. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 5817-5822, 1992.
79. FENG Y, FORGAC M. Inhibition of vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase by disulfide bond formation between cysteine 254 and cysteine 532 in subunit A. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 13224-13230, 1994.
80. FORGAC M. The vacuolar H⁺-ATPase of clathrin-coated vesicles is reversibly inhibited by S-nitrosoglutathione. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 1301-1305, 1999.
81. XU T, FORGAC M. Subunit D (Vma8p) of the yeast vacuolar H⁺-ATPase plays a role in coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 22075-22081, 2000.
82. KAWASAKI-NISHI S, BOWERS K, NISHI T, FORGAC M, STEVENS TH. The amino-terminal domain of the vacuolar proton-translocating ATPase a subunit controls targeting and in vivo dissociation, and the carboxyl-terminal domain affects coupling of proton transport and ATP hydrolysis. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 47411-47420, 2001.
83. NISHI T, FORGAC M. The vacuolar (H⁺)-ATPases--nature's most versatile proton pumps. *Nature Reviews Cancer*, 3: 94-103, 2002.
84. FAIS S. Proton pump inhibitor-induced tumour cell death by inhibition of a detoxification mechanism. *Journal of Internal Medicine*, 267: 515-525.
85. RAZAQ S, WILKINS RJ, URBAN JP. The effect of extracellular pH on matrix turnover by cells of the bovine nucleus pulposus. *European Spine Journal*, 12: 341-349, 2003.
86. WEBB SD, SHERRATT JA, FISH RG. Modelling tumour acidity and invasion. *Novartis Foundation Symposium*, 240: 169-181, 2001.
87. SENNOUNE SR, BAKUNTS K, MARTINEZ GM, CHUA-TUAN JL, KEBIR Y, ATTAYA MN, MARTINEZ-ZAGUILAN R. Vacuolar H⁺-ATPase in human breast cancer

cells with distinct metastatic potential: distribution and functional activity. *American Journal of Physiology*, 286: C1443-1452, 2004.

88. ROJAS JD, SENNOUNE SR, MAITI D, BAKUNTS K, REUVENI M, SANKA SC, MARTINEZ GM, SEFTOR EA, MEININGER CJ, WU G, WESSON DE, HENDRIX MJ, MARTINEZ-ZAGUILAN R. Vacuolar-type H⁺-ATPases at the plasma membrane regulate pH and cell migration in microvascular endothelial cells. *American Journal of Physiology Heart Circulatory Physiology*, 291: H1147-1157, 2006.

89. HINTON A, SENNOUNE SR, BOND S, FANG M, REUVENI M, SAHAGIAN GG, JAY D, MARTINEZ-ZAGUILAN R, FORGAC M. Function of a subunit isoforms of the V-ATPase in pH homeostasis and in vitro invasion of MDA-MB231 human breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 284: 16400-16408, 2009.

90. MAHONEY BP, RAGHUNAND N, BAGGETT B, GILLIES RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 66: 1207-1218, 2003.

91. SIMON S, ROY D, SCHINDLER M. Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 1128-1132, 1994.

92. RAGHUNAND N, MAHONEY BP, GILLIES RJ. Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics. II. pH-dependent partition coefficients predict importance of ion trapping on pharmacokinetics of weakly basic chemotherapeutic agents. *Biochemical Pharmacology*, 66: 1219-1229, 2003.

93. MARTINEZ-ZAGUILAN R, RAGHUNAND N, LYNCH RM, BELLAMY W, MARTINEZ GM, ROJAS B, SMITH D, DALTON WS, GILLIES RJ. pH and drug resistance. I. Functional expression of plasmalemmal V-type H⁺-ATPase in drug-resistant human breast carcinoma cell lines. *Biochemical Pharmacology*, 57: 1037-1046, 1999.

94. RAGHUNAND N, MARTINEZ-ZAGUILAN R, WRIGHT SH, GILLIES RJ. pH and drug resistance. II. Turnover of acidic vesicles and resistance to weakly basic chemotherapeutic drugs. *Biochemical Pharmacology*, 57: 1047-1058, 1999.

95. RAGHUNAND N, ALTBACH MI, VAN SLUIS R, BAGGETT B, TAYLOR CW, BHUJWALLA ZM, GILLIES RJ. Plasmalemmal pH-gradients in drug-sensitive and drug-resistant MCF-7 human breast carcinoma xenografts measured by ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *Biochemical Pharmacology*, 57: 309-312, 1999.

96. RAGHUNAND N. Tissue pH measurement by magnetic resonance spectroscopy and imaging. *Methods in Molecular Medicine*, 124: 347-364, 2006.

97. RAGHUNAND N, HE X, VAN SLUIS R, MAHONEY B, BAGGETT B, TAYLOR CW, PAINE-MURRIETA G, ROE D, BHUJWALLA ZM, GILLIES RJ. Enhancement of chemotherapy by manipulation of tumour pH. *British Journal of Cancer*, 80: 1005-1011, 1999.

98. YOU H, JIN J, SHU H, YU B, DE MILITO A, LOZUPONE F, DENG Y, TANG N, YAO G, FAIS S, GU J, QIN W. Small interfering RNA targeting the subunit ATP6L of proton pump V-ATPase overcomes chemoresistance of breast cancer cells. *Cancer Letters*, 280: 110-119, 2009.

99. ROBEY IF, BAGGETT BK, KIRKPATRICK ND, ROE DJ, DOSESCU J, SLOANE BF, HASHIM AI, MORSE DL, RAGHUNAND N, GATENBY RA, GILLIES RJ. Bicarbonate increases tumor pH and inhibits spontaneous metastases. *Cancer Research*, 69: 2260-2268, 2009.

100. KORKUT E, ÖZDEN A. Proton Pompa İnhibitörleri ve Güvenirlikleri. *Güncel Gastroenteroloji*, 14: 24-27, 2010.

101. THAMM DH, VAIL DM. Mast cell tumors. Editors: WITHROW SJ, MACEWEN EG *Small Animal Clinical Oncology*, 4th edition, Philadelphia, WB Saunders Co, page 402-424, 2007.
102. VANDERHOFF BT, TAHBOUB RM. Proton pump inhibitors: an update. *American Family Physician*, 66: 273-280, 2002.
103. ROBINSON M. New-generation proton pump inhibitors: overcoming the limitations of early-generation agents. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 13 Suppl 1: S43-47, 2001.
104. MURAKAMI T, SHIBUYA I, ISE T, CHEN ZS, AKIYAMA S, NAKAGAWA M, IZUMI H, NAKAMURA T, MATSUO K, YAMADA Y, KOHNO K. Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular PH in cisplatin resistance. *International Journal of Cancer*, 93: 869-874, 2001.
105. TORIGOE T, IZUMI H, ISHIGUCHI H, URAMOTO H, MURAKAMI T, ISE T, YOSHIDA Y, TANABE M, NOMOTO M, ITOH H, KOHNO K. Enhanced expression of the human vacuolar H⁺-ATPase c subunit gene (ATP6L) in response to anticancer agents. *The Journal of Biological Chemistry*, 277: 36534-36543, 2002.
106. TORIGOE T, IZUMI H, YOSHIDA Y, ISHIGUCHI H, OKAMOTO T, ITOH H, KOHNO K. Low pH enhances Sp1 DNA binding activity and interaction with TBP. *Nucleic Acids Research*, 31: 4523-4530, 2003.
107. LUCIANI F, SPADA M, DE MILITO A, MOLINARI A, RIVOLTINI L, MONTINARO A, MARRA M, LUGINI L, LOGOZZI M, LOZUPONE F, FEDERICI C, IESSI E, PARMIANI G, ARANCIA G, BELARDELLI F, FAIS S. Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs. *Journal of the National Cancer Institute*, 96: 1702-1713, 2004.
108. DE MILITO A, IESSI E, LOGOZZI M, LOZUPONE F, SPADA M, MARINO ML, FEDERICI C, PERDICCHIO M, MATARRESE P, LUGINI L, NILSSON A, FAIS S. Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. *Cancer Research*, 67: 5408-5417, 2007.
109. DE MILITO A, CANESE R, MARINO ML, BORGHI M, IERO M, VILLA A, VENTURI G, LOZUPONE F, IESSI E, LOGOZZI M, DELLA MINA P, SANTINAMI M, RODOLFO M, PODO F, RIVOLTINI L, FAIS S. pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. *International Journal of Cancer*, 127: 207-219, 2010.
110. ZOU XP, CHEN M, ZHANG XQ, ZHANG B, CAO J, LUO HS. Expression of Vacuolar H⁺-ATPases and the intracellular pH values in three adenocarcinoma cell lines of digestive system. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-Grand, France)*, 56 Suppl: OL1268-1275, 2010.
111. WAHL ML, OWEN JA, BURD R, HERLANDS RA, NOGAMI SS, RODECK U, BERD D, LEEPER DB, OWEN CS. Regulation of intracellular pH in human melanoma: potential therapeutic implications. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1: 617-628, 2002.
112. YEO M, KIM DK, PARK HJ, CHO SW, CHEONG JY, LEE KJ. Blockage of intracellular proton extrusion with proton extrusions with proton pump inhibitor induces apoptosis in gastric cancer. *Cancer Science*, 99: 185, 2008.
113. LU X, QIN W, LI J, TAN N, PAN D, ZHANG H, XIE L, YAO G, SHU H, YAO M, WAN D, GU J, YANG S. The growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma xenografts are inhibited by small interfering RNA targeting to the subunit ATP6L of proton pump. *Cancer Research*, 65: 6843-6849, 2005.

114. MORIMURA T, FUJITA K, AKITA M, NAGASHIMA M, SATOMI A. The proton pump inhibitor inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoblastoma. *Pediatric Surgery International*, 24: 1087-1094, 2008.
115. DI SARIO A, BENDIA E, OMENETTI A, DE MINICIS S, MARZIONI M, KLEEMANN HW, CANDELARESI C, SACCOMANNO S, ALPINI G, BENEDETTI A. Selective inhibition of ion transport mechanisms regulating intracellular pH reduces proliferation and induces apoptosis in cholangiocarcinoma cells. *Digestive Liver Disease*, 39: 60-69, 2007.
116. FAIS S, DE MILITO A, YOU H, QIN W. Targeting vacuolar H⁺-ATPases as a new strategy against cancer. *Cancer Research*, 67: 10627-10630, 2007.
117. LEERS MP, KOLGEN W, BJORKLUND V, BERGMAN T, TRIBBICK G, PERSSON B, BJORKLUND P, RAMAEKERS FC, BJORKLUND B, NAP M, JORNVALL H, SCHUTTE B. Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *The Journal of Pathology*, 187: 567-572, 1999.
118. UENO T, TOI M, BIVEN K, BANDO H, OGAWA T, LINDER S. Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patients. *European Journal of Cancer*, 39: 769-774, 2003.
119. TANNOCK IF, ROTIN D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Research*, 49: 4373-4384, 1989.
120. IZUMI H, TORIGOE T, ISHIGUCHI H, URAMOTO H, YOSHIDA Y, TANABE M, ISE T, MURAKAMI T, YOSHIDA T, NOMOTO M, KOHNO K. Cellular pH regulators: potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treatment Reviews*, 29: 541-549, 2003.
121. ALTAN N, CHEN Y, SCHINDLER M, SIMON SM. Defective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy. *The Journal of Experimental Medicine*, 187: 1583-1598, 1998.
122. TORIGOE T, IZUMI H, ISE T, MURAKAMI T, URAMOTO H, ISHIGUCHI H, YOSHIDA Y, TANABE M, NOMOTO M, KOHNO K. Vacuolar H⁽⁺⁾-ATPase: functional mechanisms and potential as a target for cancer chemotherapy. *Anti-Cancer Drugs*, 13: 237-243, 2002.
123. MIZUNASHI K, FURUKAWA Y, KATANO K, ABE K. Effect of omeprazole, an inhibitor of H⁺,K⁽⁺⁾-ATPase, on bone resorption in humans. *Calcified Tissue International*, 53: 21-25, 1993.
124. GRABER ML, DEVINE P. Omeprazole and SCH 28080 inhibit acid secretion by the turtle urinary bladder. *Renal Physiology and Biochemistry*, 16: 257-267, 1993.
125. SABOLIC I, BROWN D, VERBAVATZ JM, KLEINMAN J. H⁽⁺⁾-ATPases of renal cortical and medullary endosomes are differentially sensitive to Sch-28080 and omeprazole. *The American Journal of Physiology*, 266: F868-877, 1994.
126. MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63, 1983.
127. ANDREOTTI PE, CREE IA, KURBACHER CM, HARTMANN DM, LINDER D, HAREL G, GLEIBERMAN I, CARUSO PA, RICKS SH, UNTCH M, ET AL. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Research*, 55: 5276-5282, 1995.

128. HURWITZ SJ, TERASHIMA M, MIZUNUMA N, SLAPAK CA. Vesicular anthracycline accumulation in doxorubicin-selected U-937 cells: participation of lysosomes. *Blood*, 89: 3745-3754, 1997.
129. SCHINDLER M, GRABSKI S, HOFF E, SIMON SM. Defective pH regulation of acidic compartments in human breast cancer cells (MCF-7) is normalized in adriamycin-resistant cells (MCF-7adr). *Biochemistry*, 35: 2811-2817, 1996.
130. LARSEN AK, ESCARGUEIL AE, SKLADANOWSKI A. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 85: 217-229, 2000.
131. OUAR Z, LACAVE R, BENS M, VANDEWALLE A. Mechanisms of altered sequestration and efflux of chemotherapeutic drugs by multidrug-resistant cells. *Cell Biology and Toxicology*, 15: 91-100, 1999.
132. DUVERGER V, SARTORIUS U, KLEIN-BAUERNSCHMITT P, KRAMMER PH, SCHLEHOFER JR. Enhancement of cisplatin-induced apoptosis by infection with adeno-associated virus type 2. *International Journal of Cancer*, 97: 706-712, 2002.
133. RAYNAL S, NOCENTINI S, CROISY A, LAWRENCE DA, JULLIEN P. Transforming growth factor-beta1 enhances the lethal effects of DNA-damaging agents in a human lung-cancer cell line. *International Journal of Cancer*, 72: 356-361, 1997.
134. MICHEAU O, SOLARY E, HAMMANN A, MARTIN F, DIMANCHE-BOITREL MT. Sensitization of cancer cells treated with cytotoxic drugs to fas-mediated cytotoxicity. *Journal of the National Cancer Institute*, 89: 783-789, 1997.
135. MOERS C, WARSKULAT U, MUSCHEN M, EVEN J, NIEDERACHER D, JOSIEN R, KOLDOVSKY U, BECKMANN MW, HAUSSINGER D. Regulation of CD95 (Apo-1/Fas) ligand and receptor expression in squamous-cell carcinoma by interferon-gamma and cisplatin. *International Journal of Cancer*, 80: 564-572, 1999.
136. NAGANE M, PAN G, WEDDLE JJ, DIXIT VM, CAVENEE WK, HUANG HJ. Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. *Cancer Research*, 60: 847-853, 2000.
137. KISCHKEL FC, HELLBARDT S, BEHRMANN I, GERMER M, PAWLITA M, KRAMMER PH, PETER ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal*, 14: 5579-5588, 1995.
138. NAGATA S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 88: 355-365, 1997.
139. WALCZAK H, KRAMMER PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Experimental Cell Research*, 256: 58-66, 2000.
140. KOJIMA H, ENDO K, MORIYAMA H, TANAKA Y, ALNEMRI ES, SLAPAK CA, TEICHER B, KUFE D, DATTA R. Abrogation of mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in acquired multidrug resistance. *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 16647-16650, 1998.
141. KUWAHARA D, TSUTSUMI K, KOBAYASHI T, HASUNUMA T, NISHIOKA K. Caspase-9 regulates cisplatin-induced apoptosis in human head and neck squamous cell carcinoma cells. *Cancer Letters*, 148: 65-71, 2000.
142. KROEMER G, ZAMZAMI N, SUSIN SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today*, 18: 44-51, 1997.
143. BECK WT. The cell biology of multiple drug resistance. *Biochemical Pharmacology*, 36: 2879-2887, 1987.

144. SCARINGI L, CORNACCHIONE P, AYROLDI E, CORAZZI L, CAPODICASA E, ROSSI R, MARCONI P. Omeprazole induces apoptosis in jurkat cells. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 17: 331-342, 2004.
145. OHARA T, KANOY Y, HIGUCHI K, ARAKAWA T, MORISITA T. Eradication therapy of *Helicobacter pylori* directly induces apoptosis in inflammation-related immunocytes in the gastric mucosa--possible mechanism for cure of peptic ulcer disease and MALT lymphoma with a low-grade malignancy. *Hepato-Gastroenterology*, 50: 607-609, 2003.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen ve bizi destekleyen değerli hocam sayın Prof. Dr. Güher Göröl'a, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Okan Töre'ye her zaman bilgilerini bizimle paylaşan, eğitimim ve tezimin oluşumu ve yürütülmesinde emeği olan tez danışmanım sayın Prof. Dr. H. Barbaros Oral'a ve sayın Prof. Dr. Engin Ulukaya'ya, doktora eğitimim boyunca çok şey öğrendiğim tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım esnasındaki yardımları için Doç. Dr. Ferah Budak'a , Araş Gör. Dr. Şeniz Kale'ye, Dr. Ferda Arı'ya tüm immünoloji teknisyenlerine ve verileri değerlendirmede yardımları için Dr. Güven Özkaya'ya teşekkür ederim.

Bölümümüzdeki çalışma arkadaşlarıma da dostlukları için teşekkür ederim. Bu çalışmaya katılmayı kabul eden tüm gönüllülerimize teşekkür ederim.

Hiçbir zaman sevgi ve desteklerini esirgemeyen canım aileme, kardeşlerime, benim için pozitif enerji kaynağı olan biricik kızıma teşekkür ederim.

Son olarak da doktora eğitimime başladığım sırada sadece danışman hocam olan sevgili eşime tüm doktora eğitimim sırasındaki bilimsel ve manevi her türlü desteği için canı gönülden teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

20 Mart 1974 Bursa’da doğdum. İlkokula 1980 yılında Hildesheim’de (Almanya) başladım, 1983 yılına kadar “Drispenstadt Ganztag Schule” de okudum. Bursa’ya döndükten sonra devam ettiğim Hürriyet İlkokulu’ndan 1985 yılında mezun oldum. Ortaokul ve lise öğrenimimi gördüğüm Bursa Kız Lisesi’nden 1991 yılında mezun oldum. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde tıp eğitimime başladım. 1998’de tıp doktoru ünvanını aldım. 2000 yılında U.Ü.T.F. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda uzmanlık eğitimime başladım. Uzmanlık eğitimim sırasında “Akciğer Kanserlerinde Dokudaki VEGFR-1 ve TRAIL-R1 Ekspresyonları ile Serum Solubl VEGFR-1 Düzeylerinin Tedaviye Yanıtla İlişkilerinin İncelenmesi” isimli tez çalışmasını değerli hocalarım Prof. Asuman Tokullugil ve Prof. Dr. Engin Ulukaya’nın danışmalığında tamamlayarak 2004’de Tıbbi Biyokimya Uzmanı ünvanına sahip oldum. 2004-2010 yılları arasında U.Ü.T.F. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda uzman olarak görev yaptım. 2010 yılı sonunda aynı anabilim dalında yardımcı doçent kadrosuna atandım. Uzman olarak görev yaptığım 2005 yılı şubat ayında Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’mızın desteği ve teşvikiyle Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda İmmunoloji Doktora programında eğitimime başladım. Halen Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda öğretim üyesi olarak görev yapmaktayım.

Evli ve bir kız annesiyim.