



T.C.
BURSA ULUDAĞ
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



MİDE KANSERİ HÜCRELERİNDE *Olea europaea* YAPRAK
ÖZÜTÜNÜN TEDAVİ EDİCİ POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI

Çağla TEKİN

(Yüksek Lisans Tezi)

BURSA-2021



T.C.
BURSA ULUDAĞ
ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM
DALI



MİDE KANSERİ HÜCRELERİNDE *Olea europaea* YAPRAK
ÖZÜTÜNÜN TEDAVİ EDİCİ POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI

Çağla TEKİN

(Yüksek Lisans Tezi)

DANIŞMAN:
Prof.Dr. Berrin TUNCA

HDP(İİF)-2020/18-Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje
Birimi

BURSA-2021

**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “Mide Kanseri Hücrelerinde *Olea europaea* Yaprak Özütünün Tedavi Edici Potansiyelinin Araştırılması” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

**Adı Soyadı
Çağla TEKİN**

Tarih ve İmza

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

28/07/2021

Adı Soyadı: Çağla TEKİN

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

Tez Konusu: Mide Kanseri Hücrelerinde Olea europaea Yaprak Özütünün Tedavi Edici Potansiyelinin Araştırılması

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	■	□	
Dış Kapak Sayfası	■	□	
İç Kapak Sayfası	■	□	
Kabul Onay Sayfası	■	□	
Sayfa Düzeni	■	□	
İçindekiler Sayfası	■	□	
Yazı Karakteri	■	□	
Satır Aralıkları	■	□	
Başlıklar	■	□	
Sayfa Numaraları	■	□	
Eklerin Yerleştirilmesi	■	□	
Tabloların Yerleştirilmesi	■	□	
Kaynaklar	■	□	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof.Dr. Berrin TUNCA

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak

İç Kapak

ETİK BEYANI	ii
KABUL ONAY	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TÜRKÇE ÖZET	ix
İNGİLİZCE ÖZET	x
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Mide'nin Anatomik Özellikleri.....	6
2.2. Mide kanseri (Gastrik kanser).....	8
2.2.1. Gastrik Kanserlerin Epidemiyolojisi	9
2.2.2. Gastrik Kanserlerin Etiyolojisi ve Risk Faktörleri.....	12
2.2.3. Gastrik Kanserlerin Sınıflandırılması ve Evreleme.....	14
2.2.4. Gastrik Kanserlerin Tanı ve Tedavisi.....	20
2.2.4.1. 5-Florourasil ve Etki Mekanizması	22
2.2.4.2. Sisplatin ve Etki Mekanizması.....	24
2.3. Genetik ve Epigenetik Yaklaşımlar	27
2.3.1. Genetik Faktörler	27
2.3.1.1. Gastrik Kanserde <i>CDHI</i> (E-Kaderin) Gen Mutasyonunun Rolü	28
2.3.1.2. MSI Moleküler Alt Tipi.....	31
2.3.1.3. Epstein-Barr Virüs Moleküler Alt Tipi	31
2.3.1.4. Kromozomal Karasızlık Moleküler Alt Tipi	33
2.3.1.5. Genomik Kararlılık Moleküler Alt Tipi	33
2.3.1.6. Gastrik Kanser Gelişimi ile İlişkili Sinyal Yolakları	33
2.3.1.6.1. Wnt/ β -Katenin Sinyal Yolağının Gastrik Kanser ile İlişkisi.....	34
2.3.1.6.2. PI3K/Akt/mTOR Yolağı ve Gastrik Kanser Gelişimi	35
2.3.1.6.3. Notch Sinyal Yolağı ve Gastrik Kanser ile İlişkisi	38
2.3.2. Epigenetik Faktörler	40
2.3.2.1. DNA Metilasyonu	41
2.3.2.2. Histon Modifikasyonu.....	42
2.3.2.3. MikroRNA Ekspresyon Seviyelerinin Değişimi	44
2.3.2.4. Long-noncoding RNA Ekspresyon Seviyelerinin Değişimi	45

2.4. Gastrik Kansere Agresifliğine Sebep Olan Moleküler Mekanizmalar	47
2.4.1. Epitelyal–Mezenkimal Geçiş Mekanizması	47
2.4.2. Kansere Kök Hücrelerinin Varlığı	50
2.4.3. Koloni Oluşturma Yeteneği	52
2.4.4. Yara İyileştirme Yeteneğinin Analizi	53
2.5. Gastrik Kansere Tedavisinde Çoklu İlaç Direnci Mekanizmasının Gelişimi	54
2.6. Tümör Boyutunun ve Tümörün Agresifliğinin 3 Boyutlu Tümör Modeli ve Ex vivo Teknik ile Belirlenmesi	56
2.6.1. Tümör Boyutunun ve Tümörün Agresifliğinin Belirlenmesinde 3 Boyutlu Tümör Modelinin Oluşturulması	56
2.6.2. Koriallontoik Zar Analizi	58
2.7. Kansere Tedavisinde Bitkisel Özütlemlerin Kullanımı	59
2.7.1. Olea europaea Yaprak Özütü	59
3. GEREÇ VE YÖNTEM	62
3.1. Gereçler	62
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	62
3.1.2 Kullanılan Aletler ve Cihazlar	64
3.2. Yöntem	67
3.2.1. <i>In vitro</i> Analizler	67
3.2.1.1. Hücre Hattının Temini	67
3.2.1.2. OLE ve Kemoterapötik Ajanların Temin Edilmesi ve Hazırlanışı	68
3.2.1.3. Kültür Ortamının Optimize Edilmesi ve Hücrelerin Çoğaltılması	69
3.2.1.4. Hücrelerin Takibi ve Pasajlanması	69
3.2.1.5. Hücre Sayımı	70
3.2.1.6. Hücrelerin Stoklanması	70
3.2.2. OLE ve Kemoterapötik Ajanların Ana Stoklarının Hazırlanması ve Uygun Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	71
3.2.2.1. OLE Ana Stoğunun Hazırlanması ve WST-1 Analizi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi	71
3.2.2.2. 5 Fluorourasil Ana Stoğunun Hazırlanması ve WST-1 Analizi	72
3.2.2.3. Cisplatin Ana Stoğunun Hazırlanması ve WST-1 Analizi	73
3.2.2.4. OLE'nin Kemoterapötik Ajanlar ile Oluşturacağı Sinerjik, Additive veya Antagonist Etkinin Araştırılması için Deney Gruplarının Oluşturulması ve WST-1 Analizi	74
3.2.2.5. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Hücre Ölümü Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	75

3.2.3. OLE'nin AGS Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkinliğinin Akridin Orange /Propidium İyodür Yöntemi Kullanılarak Analiz edilmesi.....	77
3.2.4. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Tümörün Agresifliği Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi.....	78
3.2.4.1. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Gastrik Kanser Hücreleri Üzerindeki İnvazyon Etkisinin Belirlenmesi	78
3.2.4.2. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Koloni Oluşumu Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi	79
3.2.4.3. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Epitelyal–Mezenkimal Geçiş Mekanizması Üzerine Olası Etkinliğinin İncelenmesi.....	80
3.2.4.3.1. AGS Hücrelerinde RNA İzolasyonu.....	81
3.2.4.3.2. AGS Hücrelerinde Komplementer DNA (Complamenter DNA, cDNA) Sentezi.....	82
3.2.4.3.3. RT-PCR Analizi	83
3.2.4.4. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Kanser Kök Hücre Biyobelirteçlerinin Ekspresyon Seviyelerine Olası Etkinliğinin Analiz Edilmesi.....	83
3.2.4.5. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Tedavi Yanıtı ile İlişkili Çoklu İlaç Direnci Mekanizması Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	84
3.2.5. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Tümör Büyüklüğü ve Damar Oluşumu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	84
3.2.5.1. Asılı Damla Modeli ile Hücrelerin 3 Boyutlu Kültür Ortamında Çoğaltılarak Tümör Boyutunun Belirlenmesi.....	84
3.2.5.2. Ex Vivo Analiz Yöntemi ile Damar Oluşumunun Değerlendirilmesi	87
3.2.6. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Epigenetik Mekanizma Olan LncRNA Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	88
3.2.7. İstatiksel Analiz	89
4. BULGULAR.....	90
4.1. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS ve HUVEC Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	90
4.1.1. OLE'nin AGS Hücreleri ve Kontrol Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	90
4.1.1.1. OLE'nin AGS Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi	90
4.1.2. 5-Fluorourasil'in AGS ve HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	93
4.1.2.1. 5-Fluorourasil'in AGS Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	93

4.1.2.2. 5-Fluorourasil'in HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	94
4.1.3. Cisplatin'in AGS ve Kontrol Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	95
4.1.3.1. Cisplatin'in AGS Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	95
4.1.3.2. Cisplatin'in HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi	97
4.1.4. OLE'nin Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Kombinasyon Durumunun AGS Hücreleri Üzerindeki Oluşturacağı Olası Sinerjik, Additive veya Antagonist Etkinin Belirlenmesi	99
4.1.4.1. OLE ve 5-Fluorourasil Kombinasyonunun AGS Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	99
4.1.4.2. OLE ve Cisplatin Kombinasyonunun AGS Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	100
4.1.4.3. OLE, 5-Fluorourasil ve Cisplatin Üçlü Kombinasyonunun AGS Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	101
4.1.4.4. OLE'nin 5-Fluorourasil ve Cisplatin ile Kombinasyon Halinde Oluşturacağı Sinerjik, Additive veya Antagonist Etkileşimin Web Tabanlı Program Kullanılarak Değerlendirilmesi.....	102
4.2. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerinin Ölümü Üzerindeki Olası Etkinliğinin Belirlenmesi.....	103
4.2.1. OLE'nin Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisi.....	104
4.2.2. 5-Fluorourasil'in Tek Başına ve OLE ile Kombinasyon Durumunda Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisi.....	105
4.2.3. Cisplatin'in Tek Başına ve OLE ile Kombinasyonunun Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisi.....	108
4.2.4. AGS hücrelerinde 5-Fluorourasil+Cisplatin İkili Kombinasyonunun Tek Başına ve OLE ile Kombinasyonu Durumunda Hücre Ölümüne Etkisi	111
4.2.5. OLE'nin AGS Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkinliğinin Belirlenmesi	115
4.3. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerindeki Yara İyileşmesi Üzerindeki Olası Etkinliğinin Belirlenmesi...	116
4.3.1. AGS Hücrelerinde OLE, 5-Fluorourasil, Cisplatin ile Tedavisinin Yara Alanının İyileşmesi Üzerindeki Olası Etkinliğinin Belirlenmesi	116
4.3.2. AGS Hücrelerinde OLE'nin 5-Fluorourasil+Cisplatin ile Kombinasyonu Sonucunda Yara Alanının İyileşmesi Üzerindeki Olası Etkinliğinin Belirlenmesi	121
4.4. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Kombinasyonunun Epideryal-Mezenkimal Geçiş Belirteçleri Üzerindeki Etkisi	128

4.5. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerinin Koloni Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi	137
4.6. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerinde Kanser Kök Hücre Biyobelirteçlerinin Ekspresyon Seviyelerine Etkisinin Belirlenmesi.....	140
4.7. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerinin 3 Boyutlu Tümör Modeline Etkisinin Belirlenmesi	149
4.8. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerinde Çoklu İlaç Direnci Mekanizması ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi.....	170
4.9. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerinin Damar Gelişimi Üzerine Etkileri	174
4.10. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerinin Epigenetik Mekanizma Olan LncRNA Ekspresyon Seviyeleri Üzerindeki Etkisi	176
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	188
6. KAYNAKLAR	204
7. SİMGELER ve KISALTMALAR	221
9. TEŞEKKÜR.....	222
10. ÖZGEÇMİŞ	223

TÜRKÇE ÖZET

Mide kanseri (Gastrik kanser; GK), dünya genelinde en yaygın görülen gastrointestinal sistem kanserlerinden biridir. İleri evre GK'nın mevcut tedavisi cerrahi rezeksiyon ve sonrasında uygulanan radyoterapi ve kemoterapi tedavisidir. İleri evre GK' larda kemoterapi ilacı olarak genellikle 5-Fluorourasil (5-FU) ve sisplatin kullanılmaktadır. Ancak ileri evre GK hastalarında tümörün agresif oluşu ve hastaların ilaca direnç geliştirmesi sebebi ile tedavi olumsuz sonuçlanmaktadır. Günümüzde kanser tedavisinde kullanılmak üzere yeni stratejilerin geliştirilmesinde bitki özütlerinden yararlanılmakta ve çeşitli kanserlerde farklı kemoterapik ilaçlarla birlikte kombin tedavi yöntemlerine odaklanılmaktadır. Mevcut tez çalışmasında, *Olea europea* yaprak özütünün (OLE) tek başına ve kemoterapi ilacı olan 5-FU ve sisplatin ile kombin olarak kullanılmasıyla GK hücrelerinin canlılığı ve ölümü üzerine, tümör hücrelerinin agresifliğini baskılamasına, tümör büyüklüğü ve hücrelerde gelişen tedavi direncinin kırılması ve bu süreçlerde görev alan epigenetik mekanizmalar üzerine olası etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Bu amaç doğrultusunda OLE'nin ilaç direnci ile ilgili MDR genlerine, tümörün agresifliği ile ilişkili EMT ve CSC belirteçlerine ve epigenetik mekanizmalar ile ilişkili LncRNA'ların ekspresyon seviyelerine etkilerinin belirlenmesi için RT-PCR yöntemi kullanılmıştır. OLE'nin GK tümörlerinde hücre proliferasyonu WST, hücre ölümü Annexin V analizleri ile, agresifliği, yara iyileşmesi, koloni oluşumu, tümörün büyüklüğü ve anjiogenez üzerine etkileri ise hücre kültür ortamında fonksiyonel analizler ile gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, OLE'nin hücre proliferasyonunu azalttığı, hücreleri apoptotik yolla öldürdüğü ve kemoterapötikler ile birlikte EMT ve CSC belirteçlerini inhibe ederek tümörün agresifliğini baskıladığı, aynı zamanda MDR genlerinin ekspresyon seviyelerini düşürerek ilaç direncini önlediği tespit edilmiştir. Aynı zamanda OLE'nin tek başına ve kemoterapötikler ile birlikte tümör boyutunda küçülme gösterdiği ve anjiogenez baskıladığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Mide Kanseri, *Olea europaea* yaprak özütü (OLE), Apoptoz, EMT, LncRNA, 3 boyutlu kültür.

İNGİLİZCE ÖZET

INVESTIGATION OF THE TREATMENT POTENTIAL OF "*Olea europaea* LEAF EXTRACT" IN GASTRIC CANCER CELLS

Gastric cancer (Gastric cancer; GK) is one of the most common gastrointestinal system cancers worldwide. The current treatment of advanced stage GK is surgical resection followed by radiotherapy and chemotherapy treatment. 5-Fluorouracil (5-FU) and cisplatin are generally used as chemotherapy drugs in advanced GCs. However, in advanced stage GC patients, the treatment results in negative results due to the aggressiveness of the tumor and the development of drug resistance in the patients. Today, plant extracts are used in the development of new strategies for use in cancer treatment, and combined treatment methods with different chemotherapeutic drugs are focused on in various cancers. In the current thesis, it is aimed to evaluate the possible effects of *Olea europaea* leaf extract (OLE) alone or in combination with the chemotherapy drug 5-FU and cisplatin on the viability and death, suppressing the aggressiveness of tumor cells, breaking the tumor size and treatment resistance developed in the cells and playing a role in these processes and evaluation of possible effects on epigenetic mechanisms of GK cells. For this purpose, RT-PCR method was used to determine the effects of OLE on MDR genes related to drug resistance, EMT and CSC markers associated with tumor aggressiveness, and expression levels of LncRNAs associated with epigenetic mechanisms. The effects of OLE on cell proliferation, WST, cell death, Annexin V analyzes in GK tumors, and the effects of OLE on wound healing, colony formation, tumor size and angiogenesis were performed by functional analyzes in cell culture. As a result, it has been determined that OLE reduces cell proliferation, kills cells apoptotically, suppresses tumor aggressiveness by inhibiting EMT and CSC markers together with chemotherapeutics, and also prevents drug resistance by reducing the expression levels of MDR genes. At the same time, it was determined that OLE alone and in combination with chemotherapeutics reduced tumor size and suppressed angiogenesis.

Keywords: Gastric Cancer, *Olea europaea* leaf extract (OLE), Apoptosis, EMT, LncRNA, 3D culture.

1. GİRİŞ

Mide kanseri (Gastrik kanser; GK); bir takım genetik ve epigenetik mekanizmalardaki düzensizlikleri içeren çok kapsamlı heterojen bir hastalıktır. Her yıl dünya geneline bir milyondan fazla GK tanısı alan vakalar tespit edilmektedir ve bu vakaların yaklaşık 780.000 ölümle sonuçlanmaktadır (Zhou ve ark., 2018). GK yüksek morbitite ve mortalite oranlarına sahip olması nedeniyle kötü prognozla ilişkilendirmekte olup kötü prognozla ilişkilendirmekte olup 5 yıllık sağ kalım oranı oldukça düşüktür (Han ve ark., 2014). GK'nın görülme sıklığı coğrafi bölgelere göre farklılık göstermekle birlikte vakaların büyük bir kısmı Asya'da (% 60) ve Doğu Avrupada meydana gelmektedir (Parkin, Bray, Ferlay & Pisani, 2005; Rawla & Barsouk, 2019). GK'ların büyük bir çoğunluğu sporadik olarak ortaya çıkmakla beraber %1-3' ü kalıtsal kökenlidir. GK gelişimi ve ilerlemesinde beslenme ve Helikobakter pilori (H. pilori) enfeksiyonunda dahil olduğu birçok farklı çevresel etmen ile genetik ve epigenetik mekanizmalardaki düzensizlikler rol oynamaktadır. Genetik değişimler, metabolik yollarda yer alan proteinlerin fonksiyon kaybına veya farklı şekillerde düzenlenmelerine neden olurken epigenetik değişiklikler ise onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyon seviyelerinde farklılaşmalara neden olmaktadır (Zhou ve ark., 2018).

Günümüzde GK'nın mevcut tedavisi Tümör Nod Metastaz (TNM) sistemine göre yapılmakta olup erken evre GK'larda yalnızca cerrahi rezeksiyon uygulanırken ileri evre GK'larda ise rezeksiyon sonrası radyoterapi ve 5 Fluorourasil (5-FU) veya platin tabanlı kemoterapi uygulanmaktadır (Huang ve ark., 2020). Kemoterapi uygulaması hastalığın seyrini iyi yönde etkiliyor olsa da ileri evre GK hastalarında ilaca direnç gelişerek tedavi olumsuz sonuçlanmaktadır. İleri evre GK'larda birinci basamak tedavisi olarak 5-FU ve Cisplatin (Cis) kemoterapi ilaçları tercih edilmektedir. 5-FU ve Cis tabanlı kemoterapi uygulamasının temel prensibi DNA hasarı oluşturarak apoptozu indüklemesine dayanır. Ancak hastalarda gelişen ilaç direnci yüzünden tedavi etkinliği sınırlı kalmaktadır. Günümüzde GK tedavisindeki başarısızlığının temel nedeni bu kemoterapötik ajanlara karşı çoklu ilaç direncinin (MDR) gelişmesidir

(Zhang & Fan, 2007). MDR gelişimi ile ilişkili olan hücrel mekanizmaların bilinmesi klinikte kemoterapötik ajanların oluşturacağı toksik etkilerin azaltılmasını sağlayabilecektir. GK çok kapsamlı heterojen bir patogeneze sahip olduğu için günümüzde hala GK tanısı koyulmada bir takım problemler yaşanmaktadır. Bu yüzden GK gelişimine ve ilerlemesine neden olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması erken tanı, prognoz ve tedavi için büyük önem taşımakta olup yeni tedavi stratejilerinin ve modellerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir.

Epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) mekanizması, hücrelerin epitel özelliklerini yitirdiği evrimsel bir süreçtir (Kalluri & Weinberg, 2009). EMT mekanizmasında tümörler, uyumlu ve sıkı düzenlenmiş epigenetik ve biyokimyasal süreçlerle bir mezenkimal fenotip kazanmaktadırlar. EMT, yara iyileşmesi ve embriyonik gelişim gibi fizyolojik süreçlerde sıklıkla görülmektedir. EMT'nin induksiyonu kanserde, tedaviye direnç göstermesiyle, agresif özellikler sergilemesiyle ve hücreler için invaziv bir fenotip oluşturmasıyla ilişkilidir. EMT, GK'nında dahil olduğu, birçok kanser tipinde tümörün agresifliği ile büyük ölçüde ilişkilidir ve sıklıkla tümör nüksü ve metastaz gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Roche, 2018). Epitelyal fenotipten mezenkimal fenotipe dönüşüm sırasında hücrede birtakım değişiklikler gerçekleşir. Bu değişikliklerin en önemlisi "kaderin değişikliği" olarak bilinen E-kaderin aşağı regüle, N-kaderin yukarı regüle edilmesidir. Ayrıca E-kaderin SNAIL, SLUG, TWIST ve ZEB1 gibi transkripsiyon faktörlerini baskılayarak EMT geçişinde önemli bir rol oynar (Araki ve ark., 2011). GK tümörlerinin agresifliği, EMT oluşumu ile geniş ölçüde ilişkilendirilmiştir. Bu sebeple EMT ana regülatör genlerinin (SNAIL, TWIST, ZEB1, N-Kaderin ve E-Kaderin) GK'daki etkilerinin araştırılmasına ve mezenkimal geçişin inhibisyonunu sağlayan yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesinin GK tedavisinde başarı tedavi etkinliğini artırabilecektir.

Kanser Kök Hücreleri (CSC), kendi kendini yenileme, farklılaşma ve metastatik potansiyeli sürdürme gibi yetenekleri olan tümör hücrelerinin heterojenitesini sağlayan alt popülasyon grubudur (Yu ve ark., 2012). Tümörlerin agresifliği ve tedavi direnci ile ilişkili CSC varlığının araştırılması kanser tedavilerinin başarısı için önemlidir (Walcher ve ark., 2020). GK'ların kemoterapötik ajanlara karşı direnç göstermesindeki temel mekanizmalardan birisi CSC'lerin varlığıdır. GK tedavisinde CSC'leri hedef almanın, tümörün nüksü için önemli rasyonel bir yaklaşım olacağı

öngörülmektedir. OCT4, NANOG, SOX2 ve CD133 çeşitli tümörlerde CSC belirteci olarak kullanılabilirler (Walcher ve ark., 2020). Bu CSC belirteçlerinin kullanılması ilaç adaylarının CSC durumu üzerindeki etkinliklerinin değerlendirilmesinde faydalı olabilmektedir.

Geçmisten günümüze kadar çeşitli moleküler analizlerin yapıldığı farklı çalışmalarda hücrelerin bir tek tabakada büyüdüğü 2 boyutlu (2B) in vitro kültürler kullanılmaktadır (Edmondson ve ark., 2014). Düşük maliyet, kolay kullanılabilirliği ve sınırsız tekrarlanabilirliği sayesinde en fazla kullanılan geleneksel kültür yöntemlerinden biri olsada 2B hücre kültürü yöntemleri in vivo mimariyi ve mikro çevreyi doğru bir şekilde taklit edememektedir. 3 boyutlu (3B) tümör modelleri, in vitro koşullarda kanser hücrelerinin biyolojik davranışlarını daha doğru bir şekilde anlayabilmek ve in vivo koşulları daha iyi taklit etmek için yeni üç boyutlu (sferoid, organoid kültür, 3B) hücre kültür platformları oluşturulmaktadır. 3B kültür modelleri, geleneksel 2B in vitro ve hayvan test modelleri arasındaki boşluğu doldurabilen bir biyomimetik çok hücreli tümör modelini yapılandırmaktadır (Edmondson ve ark., 2014; Langhans, 2018).

Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki gelişmeler ile hücre biyolojisinde genetik mekanizmalar ile beraber epigenetik olayların da rol oynadığı anlaşılmıştır. Epigenetik, DNA dizisinde herhangi bir değişiklik meydana getirmeden gen ifadesini düzenleyen bir mekanizmadır. Bu değişiklikler tümör baskılayıcı genlerin ve onkogenlerin düzensizliklerine sebep olarak tümörün gelişiminde ve ilerlemesinde önemli rol oynamaktadırlar (Zhou ve ark., 2018). Epigenetik mekanizmalar, DNA ya da RNA temelli olarak DNA promotör metilasyonu, histon modifikasyonu, kromotinin yeniden düzenlenmesi ve transkripsiyon sonrası gen ifadesinin düzenlenmesi gibi süreçler ile tümör oluşumuna neden olabilmektedirler. LncRNA' lar, DNA' dan transkribe edilen ancak proteine çevrilmeyen 200 nükleotitten daha uzun fonksiyonel RNA molekülleridir. Çeşitli kanser türlerinde LncRNA' ların hücre döngüsü, proliferasyon, apoptoz, hücre göçü, EMT, invazyon ve metastaz gibi birçok biyolojik süreçlerde etkili olduğu tanımlanmaktadır (Zhou ve ark., 2018). HOTAIR, MALAT1, BCAR4, XLOC_006753, PVT1, GHET1 ve LEIGC günümüzde GK' lar ile ilişkilendirilen LncRNA' larıdır. Bu LncRNA moleküllerinden HOTAIR, MALAT1, BCAR4, XLOC_006753 ve PVT1, GHET1 GK' larda yüksek oranda eksprese olurken

LEIGC düşük eksprese olmaktadır (Han ve ark., 2014; Hao ve ark., 2017; Wang ve ark., 2016).

Günümüzde çeşitli kanserlerin tedavilerinin oluşturulmasında sıklıkla bitkilerden yararlanılarak, yeni tedavi protokollerinin iyileştirilmesi, mevcut protokollerin daha efektif hale getirilmesi ve mevcut kemoterapötiklerin yan etkilerinin azaltılması için çalışılmaktadır. Ayrıca, bazı terapötik özelliği belirlenen bitkisel özütlerinin kemoterapötik ajanlarla birlikte kombinasyon halinde kullanımının sinerjik veya additive bir etki oluşturarak mevcut kemoterapötik ajanlarının etkinliğini artırdığı, böylece tedavide mevcut ajanın dozunun düşürülerek, bu ajanın yol açabileceği yan etkilerin azaltılabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Cragg & Newman, 2006). Türkiye'de de yetiştirilen zeytin ağacı (*Olea europaea*), Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde birçok hastalığın tedavisinde antioksidan özelliği ile geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Gilani ve ark., 2005). Daha önceki çalışmalarımız ile *Olea europaea* (zeytin) yaprağından elde edilen bitki özütünün (OLE), beyin tümörleri arasında en agresif olan ve WHO Grade 4 olarak adlandırılan glioblastoma (GB) ve GB kök hücrelerinde; hücre proliferasyonunu azalttığı, hücreleri hem apoptotik hem de nekrotik yolla öldürdüğü, MGMT metilasyon oranını arttırdığı, beyin tümörlerinde kemoterapi ilacı olarak kullanılan temozolomid'in etkinliğini arttırdığı, angiogenezi azalttığı, bevacizumab'ın etkinliğini arttırdığı ve miRNA ekspresyon seviyelerini değiştirerek epigenetik süreçte etkili olduğu belirlenmiştir.

Mevcut tez kapsamında, OLE'nin GK hücrelerinin ölümü üzerine etkilerinin, tümör hücrelerinin agresifliğini azaltıcı rolünün, hücrelerde gelişen tedavi direncinin kırılması yönündeki etkilerinin, OLE'nin tek başına ve 5-FU ve Cis ile olan etkileşiminin değerlendirilerek GK tedavi sürecindeki potansiyelinin ve bu biyolojik süreçlerde görev alan epigenetik mekanizmalar (LncRNA) üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu tez çalışmasının amaçları doğrultusunda OLE'nin tek başına ve 5-FU ve Cis ile etkileşimleri sonucu GK tedavi sürecindeki potansiyelinin değerlendirilebilmesi temel hedefi için, GK hücrelerinin canlılığı ve ölümü üzerine etkileri WST ve Annexin V yöntemi ile, tümör hücrelerinin agresifliği yara iyileşmesi, EMT belirteçleri (*TWIST*, *SNAIL*, *ZEB1*, *N-Kaderin* ve *E-Kaderin*), koloni oluşumu, 3B hücre kültür yöntemleri ile tümör büyüklüğüne etkisi, damar gelişimi ve CSC belirteçlerinin (*CD133*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT4*) ekspresyonlarının

değerlendirilmesi ile, hücrelerde gelişen tedavi direnci MDR mekanizmasında görev alan genlerin (*MDR1*, *MRP*, *LRP1*) ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi ile ve bu biyolojik süreçlerde görev alan epigenetik mekanizmaların analizinin yapılabilmesi için LncRNA (*PVT1*, *MALAT1*, *H19*, *HULC*, *SNHG16*) ekspresyon durumlarının değerlendirilmesi planlanmaktadır.

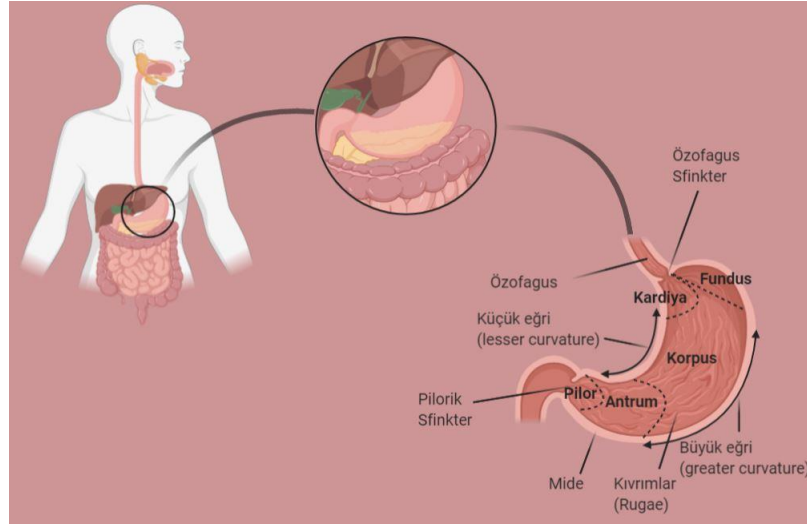
Planlanan tezin başarılı bir şekilde tamamlanması ile elde edilecek anlamlı bulgular sonucunda, günümüz tedavi protokollerinde uygulanan kemoterapötik ajanlara direnç gösteren ve agresif seyreden GK tümörlerinin tedavisinde sitotoksik yan etkisi daha az ve daha efektif olan tedavi modellerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Mide'nin Anatomik Özellikleri

Mide, özofagus ve duodenum arasında, üst karnın sol bölgesinde konumlanan gastroinstertinal sistem içerisinde önemli role sahip kaslı bir organdır. Mide üst bölgesi, diyaframın üzerinde yer alan özofagus, alt bölgesi de sağa doğru uzanarak duodenum ile birleşmektedir. Özofagus sfinkteri ve pilorik sfinkter olmak üzere midenin sahip olduğu 2 adet sfinkter, içerisine giren çıkan besinlerin kontrolünü sağlamaktadır (Hsu, Safadi & Forshing, 2020). Alınan besin özofagusun sonuna ulaştığında özofagus sfinkterinden içeri girer. Mide kasları periyodik olarak büzülür, mide asidi ve sindirim enzimleriyle birlikte yiyecekler muskularis propria iç eğik tabakası tarafından ileri geri güçlü bir şekilde çalkalanarak sindirim tamamlanır. Pilorik sfinkter açılarak yiyeceklerin mideden ince bağırsağa geçmesi sağlanır. Temel olarak mide, gastrointestinal motiliteyi sağlamak, sindirim, sekresyon, emilim, intrinsik faktör (IF) salgılanması ile bakteri ve zararlı moleküllerin yıkımını sağlayarak mikrobiyal savunma gibi birçok önemli fonksiyonu yerine getirmektedir (Hsu ve ark., 2020; Ramsay & Carr, 2011).

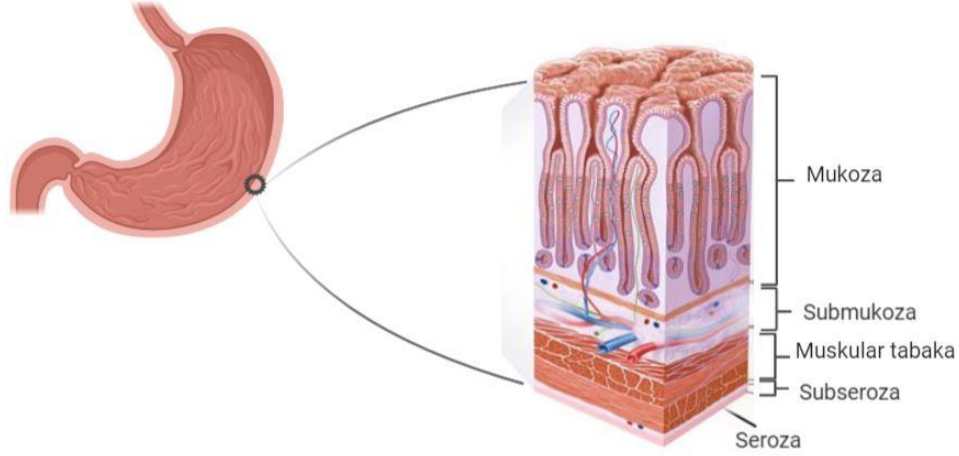
Mide kardiya, fundus, korpus (vücut), antrum ve pilor olmak üzere anatomik olarak 5 bölüme ayrılmaktadır (Karimi, Islami, Anandasabapathy, Freedman & Kamangar, 2014; Soybel, 2005; Şekil 1). Kardiya, özofagusa en yakın olan midenin ilk bölümüdür. Kardiya yanında kubbe şeklinde fundus bulunmaktadır. Midenin üst ve alt bölgeleri arasında kalan kısmı korpus olarak adlandırılmaktadır. Antrum, alt bölümdeki yiyeceklerin mide öz suyu ile karıştığı bölgedir. Huni şeklindeki pilor ise mide içeriğinin duodenuma boşaltılmasını kontrol eden bölümdür. Midenin kardiya, fundus ve korpus olmak üzere ilk üç kısmı proksimal mide olarak adlandırılmaktadır ('American Cancer Society', 2020). Bu bölgelerde yer alan bazı hücreler sindirim enzimlerini salgılamaktadır. Aynı zamanda bu bölgede yer alan paryetal hücreler B12 vitamininin emilimini sağlayan IF'yi salgılamaktadır. Antrum ve pilor bölgeleri ise distal mide olarak adlandırılmaktadır. Mide iç ve dış sınırlarını oluşturan 2 eğriye sahiptir. Bunlar küçük eğri (lesser curvature) ve büyük eğri (greater curvature) olarak bilinmektedir.



Şekil 1. Mide ve anatomik olarak bölümlerinin Karimi ve ark., yaptığı çalışma dikkate alınarak çizilen şekli (Karimi ve ark., 2014)

Gastrointestinal sistemde rol oynayan diğer organlar gibi mide duvarı da mukoza, submukoza, muskularis propria, subseroza ve seroza katmanlarından oluşmaktadır (Hsu ve ark., 2020; Şekil 2). Mide asitlerinin ve sindirim enzimlerinin salgılandığı en içteki katman mukozadır. Mide kanserlerinin büyük çoğunluğu bu katmanda oluşmaktadır. Mukoza epitel doku ve mide sularını sekrete eden mide bezlerinden oluşmaktadır. Mide bezleri foveolar hücreler, paryetal hücreler, enteroendokrin hücreleri gibi birtakım hücrelerden oluşmaktadır. Foveolar hücreler tarafından mukozanın mukozasına mide asidine karşı koruyucu mukus salgılanmaktadır. Paryetal hücreler hidroklorik asit ve IF'yi salgılar ve yüksek mitokondri içeriğine sahiptir. Enteroendokrin hücreler başta gastrin olmak üzere birçok hormonun salgılanmasında rol oynar. Submukoza katmanı bağ dokusundan meydana gelmektedir. Sinirler ile birlikte kan ve lenfatik damarları içeren bu katman kan dolaşımını ve salgılanan salgıları kontrol etmektedir. Muskularis propria mide içeriğini çalkalayarak karışmasını sağlayan kalın bir kas tabakasıdır. Midenin en dış diğer katmanları ise subseroza ve serozadır. Seroza periton ile bağlantıyı sağlayan bağ dokusundan oluşmaktadır. Luminal yüzeyi, mide boş olduğunda belirginleşen rugae adı verilen kas dokusunun kıvrımlarından oluşmaktadır. Mide boş kaldığında içeri doğru sönerek, mukozanın ve submukozanın bu kıvrımların içerisine doğru çöker. Korpus ve

fundusta kıvrımlar antrum ve kardiyaya göre daha belirgindir (Chaudhry, Liman & Peterson, 2020; Ramsay & Carr, 2011).



Şekil 2. Mide duvarının şematik gösteriminin Hsu ve ark., çalışması dikkate alınarak çizilen şekli (Hsu ve ark., 2020).

2.2. Mide kanseri (Gastrik kanser)

Mide kanseri (Gastrik kanser; GK), dünya genelinde en yaygın görülen gastrointestinal sistem kanserlerinden biri olup kansere bağlı gerçekleşen ölümler arasında ikinci sırada yer almaktadır (Zhou ve ark., 2018). GK en yüksek insidansa sahip kanser türleri arasındadır (Chen ve ark., 2017; Correa, 2013; Rawla & Barsouk, 2019; Wang ve ark., 2016; ‘World Cancer Research Fund International’, 2018). Gelişen tıp teknolojileri ve ilerleyen cerrahi tekniklere rağmen GK hala erken tanı ve tedavideki yetersizlik sebebiyle yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sahiptir. Bu yüzden kötü prognozla ilişkilendirmekte olup 5 yıllık sağ kalım oranı yaklaşık olarak %40’dır (Correa, 2013; Han ve ark., 2014; Karimi ve ark., 2014). Günümüzde GK oluşumunun kesin nedeni belirsiz olsa da patogenezi diğer maling tümörlere benzer şekilde çok faktörlü olan kapsamlı bir hastalıktır (Song, Wu, Yang, Yang & Fang, 2017). GK’ların geneli sporadik olarak ortaya çıkmakla beraber %1-3’ü kalıtsal kökenlidir (Şekil 3). Beslenme ve helicobakter pilori (*H. pilori*) enfeksiyonunun da dahil olduğu birçok farklı çevresel etmen ile genetik ve epigenetik mekanizmalardaki anormallikler GK oluşumunda önemli rol oynadığı bilinmektedir (Zhou ve ark., 2018). GK’ların büyük çoğunluğu mukozada gelişen adenokarsinomlardan oluşmaktadır. Bu yüzden genellikle GK terimi adenokarsinomaları belirtmek için kullanılmaktadır. Adenokarsinomlar anatomik bölgelerine göre kardiyak ve kardiyak olmayan olmak

üzere 2 gruba ayrılır. Kardiyak olan adenokarsinomalar özofagus-mide bitişik bölgesinde oluşur ve özofagus adenokarsinomu ile benzer epidemiyolojik özellik gösterir. Kardiyak olmayan adenokarsinomlar ise distal GK olarakta bilinmektedir ve genellikle daha sık gözlenmektedir (Rawla & Barsouk, 2019). Midenin malign tümörleri arasında midenin lenfoid dokusundan kaynaklanan lenfomalar, gastrointestinal stromal tümörler, sarkomlar ve nöroendokrin tümörler de dahil olmak üzere mideden kaynaklı farklı kanser türleri yer almaktadır (Cisło ve ark., 2018; Karimi ve ark., 2014).

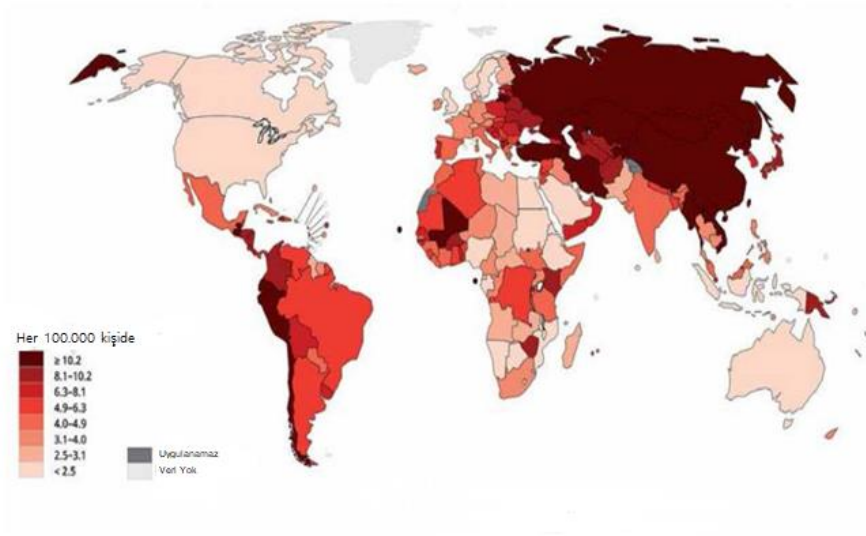


Şekil 3. Farklı nedenden oluşan GK'ların görülme oranları (Sitarz R, Mielko, Offerhaus, Maciejewski & Polkowski, 2018).

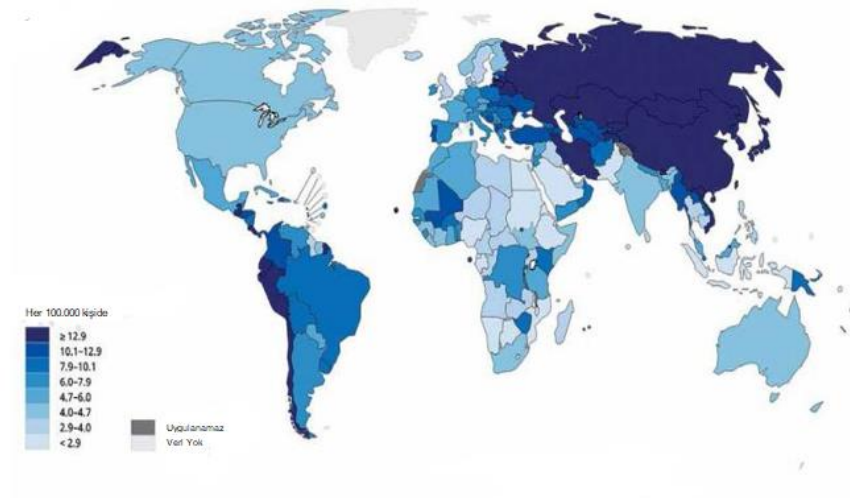
2.2.1. Gastrik Kanserlerin Epidemiyolojisi

Globacan 2018 yılı verilerine göre dünya genelinde 1.033.701 yeni GK vakası tespit edilmiş olup bu vakaların yaklaşık 782.685 'i ölümlle sonuçlanarak mortalite oranı ~ % 76 olarak belirlenmiştir ('World Cancer Research Fund International', 2018). Bu veriler ışığında dünya genelinde GK en yaygın neoplazm ve en ölümcül kanser türlerinden biri olarak tespit edilmiştir (Rawla & Barsouk, 2019; Şekil 4). Ülkemizde en yaygın görülen kanser türleri arasında GK beşinci sırada yer almaktadır ('T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri', 2021). GK insidansı ve mortalite oranı coğrafi bölgelere göre önemli ölçüde farklılık göstermekle birlikte H. pilori enfeksiyonunun pozitifliğine bağlı olarakta değişmektedir (Ang & Fock, 2014; Bray ve ark., 2018; Parkin, Bray, Ferlay & Pisani, 2005; Rawla & Barsouk, 2019). Vakaların büyük çoğunluğu Asya'da görülmekte iken Doğu Asya, Doğu Avrupa, Orta ve Güney Amerika bölgelerinde de GK tanısı yaygındır (Chen ve ark., 2017; Wang ve ark., 2016). Yeni vakaların büyük bir çoğunluğu gelişmiş ülkelerde görülmektedir. En yüksek risk popülasyonuna sahip bölgeler Doğu Asya (Çin ve Japonya), Doğu Avrupa,

Orta ve Güney Amerika bölgeleridir. Düşük risk popülasyonuna sahip olan bölgeler ise Güney Asya, Kuzey ve Doğu Afrika, Kuzey Amerika, Avustralya ve Yeni Zelanda'dır (Ang & Fock, 2014; Sitarz ve ark., 2018; Şekil 5). Japonya yüksek risk grubunda olmasına rağmen erken tanı ve erken tümör rezeksiyonu sayesinde diğer bölgelere göre nispeten yüksek sağ kalım oranına sahiptir (Sitarz ve ark., 2018; Parkin ve ark., 2005).

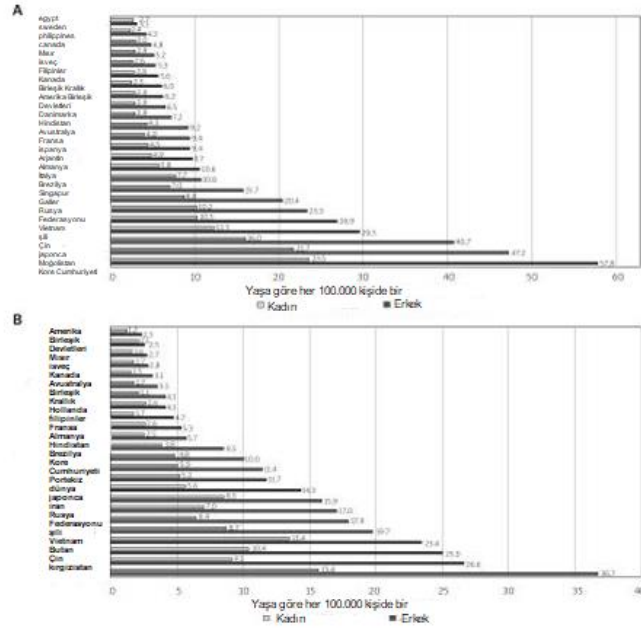


Şekil 4. Dünya genelinde her yaş grubunda ve her iki cinsiyetteki ölüm oranları (Ferlay, Ervik, Lam, Colombet & Mery, 2018).

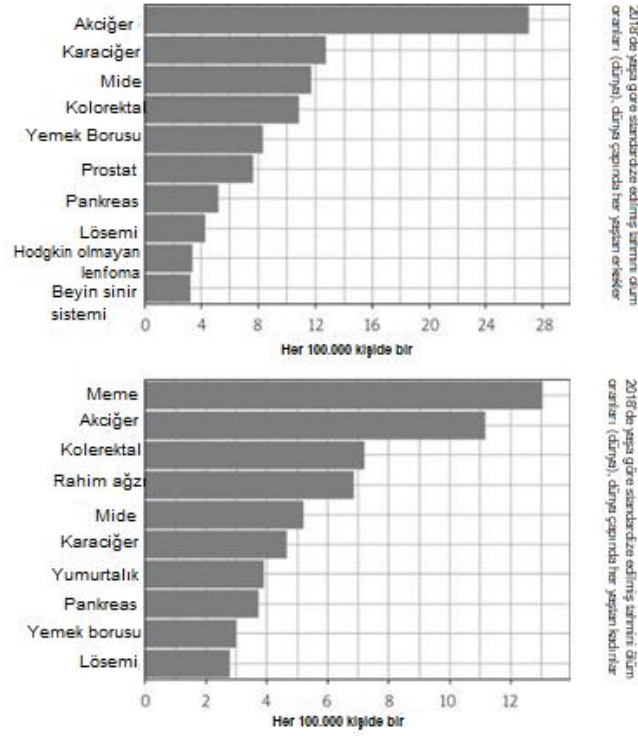


Şekil 5. Bölgelere göre her yaş grubunda ve her iki cinsiyette GK insidansları (Ferlay ve ark., 2018).

GK insidansı cinsiyete bağılı olarak önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Gelişmiş ülkelerde erkeklerde kadınlara göre 2.2 kat daha fazla GK tanısı koyulmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde ise bu oran 1.83'tür. Dünya genelinde GK insidansı erkeklerde kadınlara oranla daha fazla olmaktadır (Şekil 6). Erkeklerde GK'ya bağlı ölüm oranı tüm dünya genelinde 3. sırada yer alarak kadınlardan daha fazla ölüm oranına sahiptir (Bray ve ark., 2018; Şekil 7).



Şekil 6. Yaş aralığı standardize edilerek dünya genelinde ülkelere göre kadın ve erkeklerdeki GK insidansı (Ferlay ve ark., 2018).



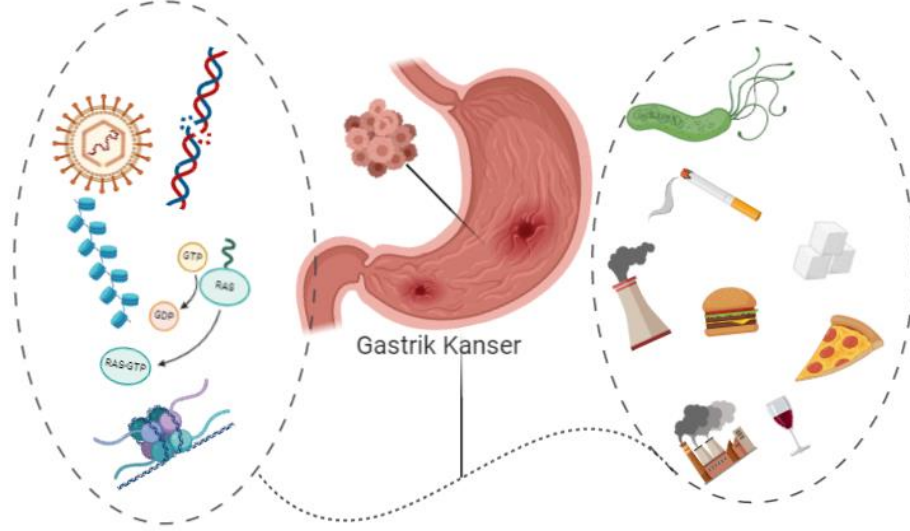
Şekil 7. Dünya genelinde cinsiyete bağlı olan ölüm oranları (Ferlay ve ark., 2018).

GK görülme sıklığı yaşa bağlı olarakta değişkenlik göstermekle birlikte en yüksek insidans ileri yaşlarda görülmektedir. 30 yaşından küçük vakalar çok nadirdir. 45-49 yaş aralığında 65-69 yaş aralığına göre GK görülme oranı daha azdır. Kadın ve erkek için en yüksek risk grubu ise 85-89 yaş aralığıdır (Anderson ve ark, 2010; Kelley & Duggan, 2003).

2.2.2. Gastrik Kanserlerin Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki dengenin korunması sağlıklı birey için oldukça önemlidir. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler ile ilişkili gibi birçok genetik değişimlerin birikmesi, epigenetik ve çevresel faktörlerinde dahil olmasıyla birlikte bu denge bozularak karsinogenez oluşumuna yol açmaktadır (Zali, Tavirani & Azodi, 2011). GK oluşumu ve ilerlemesinde, sigara, alkol, beslenme alışkanlıkları, radyasyon ve kimyasal madde faktörlerine maruz kalma, steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçların kullanımı, H. pilori enfeksiyonu gibi çevresel faktörler, Epstein-Barr Virüs (EBV), ailesel öykü, karsinogenez ile ilişkili genlerdeki ve sinyal yollarındaki anormallikler, gen polimorfizmleri, kromozomal kararsızlık (CIN) gibi genetik faktörler, kodlama yapmayan RNA'ların anormal ekspresyonu, histon modifikasyonları, DNA metilasyonu gibi epigenetik mekanizmlar oldukça önemli rol

oyunmaktadır (Guggenheim & Shah, 2013; Kelley & Duggan, 2003; Sitarz ve ark., 2018, Zali ve ark., 2011; Şekil 8).



Şekil 8. GK oluşumunda rol oynayan çevresel etmenler, genetik ve epigenetik mekanizmalar

Gram negatif özellikte olan *H. pilori*, mide mukozasında kolonize olarak kronik ve atrofik gastrit, peptit ülser gibi hastalıkların oluşumuna sebep olan *H. pilori* enfeksiyonu GK için ana risk faktörüdür (Ahmed, 2005). Bu bakteri enfeksiyonunun GK olasılığını 5.9 kat artırdığı tespit edilmiştir (Clinton, Giovannucci & Hursting, 2020). GK ilişkili gen polimorfizmi olan IL-10 ve IL-17'nin *H. pilori* enfeksiyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Clinton ve ark., 2020). Diğer bir çevresel faktör ise sigara ve alkol tüketimidir. 1997 yılında yapılan bir çalışmada sigara tüketiminin GK oluşumunu % 44 oranında artırdığı belirtilmiştir (Trédaniel, Boffetta, Buiatti, Saracci & Hirsch, 1997). Yüksek tuz konsantrasyonuna sahip gıdaların tüketimi, lifsiz beslenme ve hijyen eksikliği GK oluşumunu artırırken, yüksek oranda taze sebze ve meyve tüketiminin mideyi koruyucu rol oynadığı gösterilmiştir (Zali ve ark., 2011). GK için bir diğer risk faktörü ise obezitedir. Değerlendirilen meta analizi sonuçlarına göre vücut kitle indeksi yüksek olması GK görülme olasılığını 1.13 kat artırmaktadır (Lin ve ark., 2014). GK'ların yaklaşık % 5-10'u EBV ile ilişkilendirilmiştir (Boysen ve ark., 2009). Singh ve ark. yaptığı bir çalışmada EBV ve *H. pilori* enfeksiyonlarının birlikte gözlenmesinin GK oluşumunu artırdığı tespit edilmiştir (Singh & Jha, 2017).

2.2.3. Gastrik Kanserlerin Sınıflandırılması ve Evreleme

GK heterojen ve farklı fenotiplere sahip, çok faktörlü bir hastalıktır. Bu yüzden günümüzde çeşitli histolojik sınıflandırma sistemleri bulunmaktadır (Cisło ve ark., 2018; Waldum & Fossmark, 2018). Ancak bu sistemlerden hangisinin tanı veya prognostik faktörler ile ilişkilendirilebileceği veya klinik olarak yüksek geçerlilikle kullanılabileceğine yönelik hala tartışmalar mevcuttur (Berlth, Bollschweiler, Drebber, Hoelscher & Moenig, 2014). Lauren ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) en sık kullanılan olmak üzere Goseki, Ming ve Borman gibi farklı sınıflandırma sistemleri yer almaktadır (Berlth ve ark., 2014; Cisło ve ark., 2018; Laurén, 1965; Waldum & Fossmark, 2018). Morfolojiye dayalı sınıflandırma sistemleri GK'nın moleküler olarak farklı heterojeniteye sahip olması nedeniyle klinik tedaviyi yönlendirmede yetersiz kalmaktadır. Son yıllarda moleküler teknolojilerdeki gelişmeler ile birlikte yeni nesil dizileme analizleri ile DNA, RNA ve tüm ekzon dizi analizleri, varyans analizleri gibi moleküler yöntemler sayesinde tümörün histopatolojik özellikleri hakkında daha ayrıntılı bilgiler analiz edilmektedir. Bu gelişmeler doğrultusunda mevcut sınıflandırma sistemlerine ek olarak moleküler özelliklere dayalı sınıflama teknikleri giderek önem kazanmaktadır (Wang, Liu, & Hua, 2019).

1965 yılında oluşturulan Lauren sınıflandırması, tüm sınıflandırma sistemleri arasında en yaygın kullanılan sınıflandırma sistemlerinden biridir (Berlth ve ark., 2014). Bu sisteme göre GK bağırsak tip (intestinal), difüz (yaygın) tip, karışık tip ve belirsiz alt tiplere ayrılmaktadır (Laurén, 1965). Lauren sınıflandırması morfolojik olarak mikroskobik makroskobik farklılıklar içermekle birlikte aynı zamanda epidemiyolojik, genetik farklılıklarda içermektedir (Cisło ve ark., 2018; Sitarz ve ark., 2018). Sitarz ve ark. bağırsak tiplerin kronik atrofik gastrit ve bağırsak metaplazisi ile ilişkili olduğu, difüz tipin ise mide mukozası ile ilişkili olduğu öne sürmüştür (Sitarz ve ark., 2018). Bağırsak tip GK vakalarının yaklaşık olarak %54'ünde görülmektedir ve erkeklerde kadınlara oranla iki kat daha fazla rastlanmaktadır (Marqués-Lespier, González-Pons, & Cruz-Correa, 2016). Genellikle antrumda lokalize olan bağırsak tip histopatolojik olarak çevre dokulara ulaşarak glandüler farklılaşma gösteren maling epitel hücreleri ile karakterizedir (Marqués-Lespier ve ark., 2016). Difüz tip GK'ların yaklaşık % 32 'sini oluşturmaktadır ve genellikle düşük farklılaşma ve kohezyon özelliğindeki tümör hücreleri ile karakterize olmuştur. Genellikle bağırsak alt tipine

göre daha genç yaştaki hastalarda gözlenmektedir. Kadınlarda ve erkeklerde eşit oranda görülmektedir (Cisło ve ark., 2018). Cisło ve ark. 2018 yılında yaptığı çalışmaya göre bağırsak tip GK oluşumunda temel olarak H. pilori enfeksiyonu çevresel faktörler etkili olurken difüz tipte genellikle genetik faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Cisło ve ark., 2018; Waldum & Fossmark, 2018). Bağırsak ve difüz tip GK vakaları patolojik olarak ayrı alt tipler olarak gruplandırılarda klinik olarak her ikisinde benzer şekilde tedavi edilmektedir. Bu iki alt grubun görülme oranlarında ülkelere ve kıtalara göre farklılık göstermektedir ve Avrupa ülkesinde bağırsak tip GK vakalarına daha çok rastlanmaktadır (Sitarz ve ark., 2018). Karışık tip GK vakalarında karın zarına (periton) yayılma ve karaciğer metastazı eğilimi bağırsak tipe göre oldukça fazla olmaktadır (Cisło ve ark., 2018). Belirsiz tip ise tüm GK vakalarına oranla daha az rastlanmaktadır (Cisło ve ark., 2018; Hu ve ark., 2012).

WHO sınıflandırma sistemi tümörün histo-morfolojik özelliklerine göre tübüler, papiller, müsinöz, zayıf koheziv yapışkan (taşlı yüzük hücreli karsinom) ve karışık karsinom olmak üzere alt tiplere ayırmaktadır (Cisło ve ark., 2018). WHO sınıflandırması adenokarsinomların yanı sıra diğer gastrik tümör tiplerini de içermektedir (Berlth ve ark., 2014; Cisło ve ark., 2018). Lauren ve WHO sınıflandırılması karşılaştırıldığında tübüler, müsinöz ve papiller karsinomlar bağırsak tip içerisinde yer alırken taşlı yüzük hücreleri karsinom ise difüz tipe karşılık gelmektedir (Tablo 1).

Tablo 1. Lauren ve WHO sınıflandırmalarının karşılaştırılması (Berlth ve ark., 2014; Cisło ve ark., 2018).

Lauren Sınıflandırması	WHO Sınıflandırması
Bağırsak tip	Papiller adenokarsinom
	Tübüler adenokarsinom
	Müsinöz adenokarsinom
Difüz tip	Taşlı yüzük hücreleri adenokarsinom
Belirsiz tip	Karışık karsinom
	Adenoskuamöz Karsinom
	Skvamöz hücre karsinoması
	Hepatoid adenokarsinom
	Lenfoid stroma ile karsinom
	Embriyonal karsinom
	Paryetal hücreli karsinom

WHO sistemine göre GK vakaları arasında görülme oranı en fazla tübüler tip, ardından papiller ve müsinöz tip gelmektedir. Taşlı yüzük hücreli karsinom genellikle

tümörün halka şeklindeki hücrelerin varlığıyla tanımlanarak tüm GK vakalarının yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (Hu ve ark., 2012). Tübüler, papiller ve müsinöz tip karsinomların daha kötü prognoza sahip olduğu bilinirken taşlı yüzük hücreli karsinomun prognozu ise henüz kesin olarak belirlenememiştir (Berlth ve ark., 2014).

1992 yılında Goseki ve ark. hücre içi müsin üretimi ve tübüler farklılaşma derecesine bağlı olarak GK'yı dört alt gruba ayıran bir sınıflandırma sistemi oluşturmuşlardır (Tablo 2). Bu sınıflandırma sisteminin prognostik önemi henüz net bir şekilde belirlenememiştir bu yüzden tedaviyi yönlendirme doğrultusunda yetersiz kalmaktadır (Berlth ve ark., 2014; Cisło ve ark., 2018).

Tablo 2. GK vakalarının Goseki yöntemine göre sınıflandırılması (Cisło ve ark., 2018; Goseki, Takizawa & Koike, 1992).

Gruplar	Özellikleri
Grup I	İyi farklılaşmış tübüller ve hücre içi müsin fakiri
Grup II	İyi farklılaşmış tübüller ve hücre içi müsin zengini
Grup III	Zayıf farklılaşmış tübüller ve hücre içi müsin fakiri
Grup IV	Zayıf farklılaşmış tübüller ve hücre içi müsin zengini

Ming sınıflandırma sistemi lezyonun büyüme paternine göre ve invazyon derecesine bağlı olarak GK'yı infiltratif (sızıntı yapan) ve ekspansif (genişleyen) olmak üzere 2 gruba ayırmaktadır (Ming, 1977). Ming sınıflandırma sistemi basit ve klinik olarak fayda sağlayan bir sistem olmasına rağmen prognostik önemi belirtilmediği için daha nadir olarak kullanılmaktadır. Borman tarafından yapılan sınıflandırma sistemine göre GK makroskobik büyüme paterniyle ve mikroskobik özellikleriyle ilişkili olarak polipoid, fungusyon, ülseratif ve infiltratif olmak üzere 4 grupta incelenmektedir. Bu eski sınıflandırma sistemi günümüzde hala kullanılmaktadır (Waldum & Fossmark, 2018).

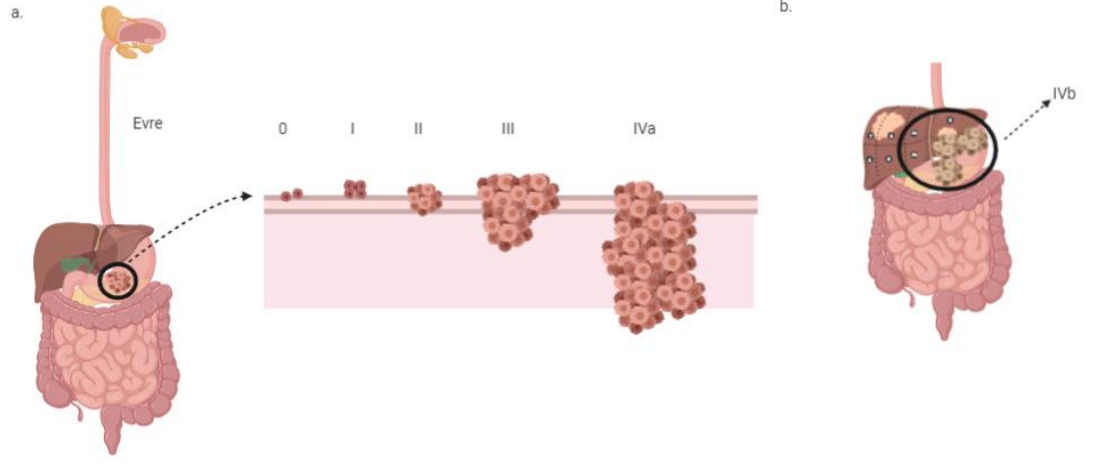
GK'nın moleküler ve genetik özellikleri dikkate alınarak, içsel (intrinsik) alt tipi, Lei alt tipi, Kanser Genom Atlası alt tipi ve Asya kanser araştırma grubu çalışmalarını ele alarak moleküler sınıflandırma sistemleri oluşturulmuştur (Wang ve ark., 2019). İçsel alt tipleri 2011 yılında Tan ve ark. tarafından Lauren sınıflandırması ile ilişkili olarak prognostik faktörler doğrultusunda, genomik bağırsak (G-INT) ve genomik difüz (G-DIF) olarak 2 gruba ayrılmıştır (Tan ve ark., 2011). Bu gruplar gen ekspresyon seviyeleri ve biyolojik yollar ile ilişkilendirilmiştir. *CDH17*, *FUT2* ve

LGALS4 geni G-INT grubunda yüksek ekspresyon seviyesine sahiptir. Gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda G-INT alt grubu 5-Florourasil (5-FU) 'e duyarlı iken G-DIF grubunun sisplatine (Cis) duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Tan ve ark., 2011; Wang ve ark., 2019). 2013 yılında Lei ve ark. tarafından proliferatif, metabolik ve mezenkimal olmak üzere 3 alt gruba ayırarak biyolojik ve terapötik olarak anlamlı bulunan farklı bir sınıflandırma sistemi oluşturmuşlardır (Lei ve ark., 2013). Bu alt gruplar farklı moleküler özelliklere sahip olduğu için tedaviye yanıtları da farklı olduğu tespit edilmiştir. Proliferatif alt tipte çok sayıda *TP53* mutasyonu görülürken diğer alt gruplarda daha az sayıda görülmektedir. Metabolik alt tip 5-FU tedavisine duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Lei ve ark., 2013). Kanser genom atlası 2014 yılında yaptığı bir araştırmada GK tümörlerini mikrosatellit karasızlık (MSI), EBV pozitif, CIN ve genomik kararlılık olmak üzere 4 ayrı grupta inceleyerek farklı bir sınıflandırma sistemi oluşturmuştur (Cancer Genome Atlas Research, 2014). Asya kanser araştırma grubu ise 2015 yılında mRNA ekspresyon profillerini analiz ederek farklı prognozlara sahip dört farklı grupta değerlendirmiştir (Cristescu ve ark., 2015; Wong ve ark., 2014).

GK için histopatolojik ve morfolojik sistemlere ek olarak 1982 yılında Grundmann ve ark. tarafından invazyon derinliğine dayalı bir sınıflandırma sistemi oluşturulmuştur. Canerio ve ark. GK için her biri ayrı prognostik öneme sahip morfolojik görünümüne dayalı bir sınıflandırma sistemi yayınlanmıştır. Japon GK grubu ise WHO sınıflandırılmasını baz alarak birkaç histolojik alt grup oluşturmuştur. Bu sınıflandırma sistemleri klinik olarak yetersiz kalması sebebiyle dünya genelinde yaygın olarak kullanılmamaktadır (Berlth ve ark., 2014).

GK'ya yönelik tedavi önerisi ve yanıtı, onkolojik sonuçların tahmini veya tedavi sırasında kanser durumunu etkili bir şekilde tanımlamak için çeşitli evreleme sistemleri geliştirilmiştir (Zubarayev, Min & Son, 2019). Bunlar arasında Uluslararası Kanserle Mücadele Birliği (UICC) ve Amerikan Kanser Ortak Komitesi (AJCC) tarafından geliştirilen Tümör-Nod-Metastaz (TNM) (Tablo 3) sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır (Washington, 2010; Zubarayev ve ark., 2019; Şekil 9). Tümör boyutu T olarak tanımlanmakta ve GK'da 4 aşaması bulunmaktadır. N, lenf nodları için kullanılarak, kanserin lenf düğümlerine yayılım durumunu belirtmektedir. M ise

kanserin uzak dokulara olan metastazını ifade etmektedir (Washington, 2010; Zubarayev ve ark., 2019).



Şekil 9. GK için TNM evreleme sisteminin şematize edilmesi

Tablo 3. AJCC tarafından geliştirilen GK evreleme sistemi
(Washington, 2010)

Evre	T*	N**	M***
Evre 0	Tis	N0	M0
Evre IA	T1	N0	M0
Evre IB	T2	N0	M0
Evre IIA	T1	N1	M0
	T3	N0	M0
	T2	N1	M0
Evre IIB	T1	N2	M0
	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
Evre IIIA	T2	N2	M0
	T4a	N1	M0
	T3	N2	M0
Evre IIIB	T2	N3	M0
	T4b	N0 ya da N1	M0
	T4a	N2	M0
Evre IIIC	T3	N3	M0
	T4b	N2 ya da N3	M0
	T4a	N3	M0
Evre IV	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1

*Tx: Primer bir tümör saptanmaması durumu

T0: Primer tümör için bir kanıt olmaması durumu

Tis: Büyük oranda displazi içeren lamina propria yayılımı gerçekleştirilmeyen intraepitelyal tümördür

T1: Mide duvarında tümör oluşumu saptanmıştır

T1a: Tümör mide mukozasına infiltridir

T1b: Tümör mukozadan submukoza katmanına infiltridir

T2: Tümör midenin muskularis probria tabakasına tutunmuştur.

T3: Tümör çevre dokulara invazyon göstermeden dış katmanına (subseroza katmanına) yayılmıştır

T4: Tümör seroza ve çevre dokulara yayılmıştır

T4a: Tümör seroza katmanına infiltre olmuştur

T4b: Tümör periton, karaciğer ve özofagus gibi çevre dokulara yayılım göstermiştir

**NX: Bölgesel lenf nodları değerlendirilemez

N0: Kanser hücrelerinin içeren lenf nodu bulunmadığı anlamına gelir

N1: Mideye yakın olan 1-2 lenf nodülüne metastaz vardır

N2: 3-6 lenf nodülüne metastaz gerçekleşmiştir

N3: 6'da daha fazla lenf nodülü metastazı tespit edilmiştir.

N3a: Mide yakınındaki 7-15 lenf nodülüne metastaz gerçekleştirdiği anlamına gelmektedir

N3b: 16'dan fazla bölgesel lenf nodülünde metastaz gerçekleşmiştir

***M0: Kanserin uzak doku metastazı olmadığı anlamına gelmektedir

M1: Kanserin uzak doku metastazı gerçekleştirdiği anlamına gelmektedir

2.2.4. Gastrik Kanserlerin Tanı ve Tedavisi

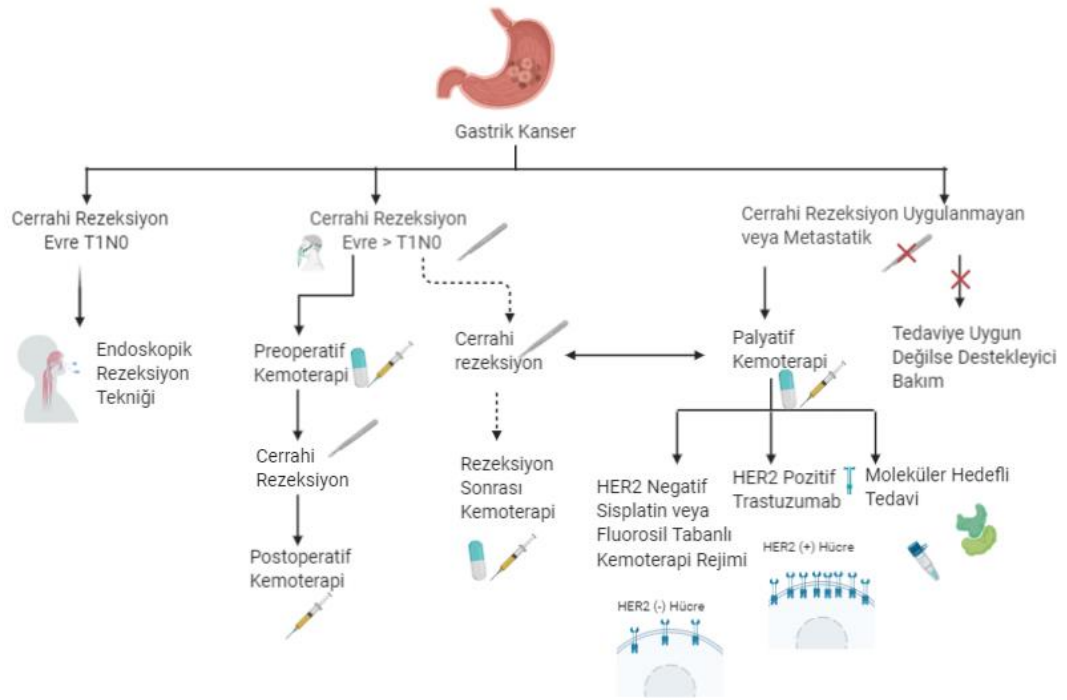
Erken evre GK hastalarının %80'i semptomsuz meydana gelirken semptom gösteren hastaların ileri evrelerinde, bölgesel veya uzak doku metastazlı lezyonların varlığı gözlenmektedir (Layke & Lopez, 2004; Zali ve ark., 2011). Bu sebeple hasta, ağrı, şişkinlik, ele gelen epigastrik bir kitle, iştahsızlık, kilo kaybı, bulantı-kusma ve tümörün ülserasyonuna bağlı gastrointestinal sistemde oluşan kanama gibi şikayetlerle başvurduğunda sıklıkla GK tanısı gecikmekte ve ileri evre GK tanısı almaktadır (Zali ve ark., 2011). GK tanısı koymak için sıklıkla tam kan sayımı, dışkı testi, H. pilori serolojisi, biyopsi, üst gastrointestinal endoskopi, pozitron emisyon tomografi, bilgisayarlı tomografi ve evreleme laparoskopisi gibi teknikler kullanılmaktadır (Takahashi, Saikawa & Kitagawa, 2013; Yoon & Kim, 2015; Zali ve ark., 2011).

Endoskopi, GK şüphesi içeren olgularda en hassas ve en spesifik tanı koyma yöntemidir (Karpeh & Brennan, 1998). Bu teknik doku teşhisi için tümör yerleşimini, mukozal tutulumu ve biyopsinin doğrudan görüntülenmesi sağlanmaktadır (Dicken, Bigam, Cass, Mackey & Joy, 2005). Endoskopik ultrason tekniği invazyonu derecesi hakkında bilgi sağlayarak tümör evresi tespit edilebilmektedir (Willis, Truong & Gribnitz, 2000). GK evrelemesinde en sık tercih edilen diğer bir teknik ise %88 duyarlılığa sahip bilgisayarlı tomografi'dir (Angelelli, Ianora & Scardapane, 2001; Kuntz & Herfarth, 1999). Karaciğer metastazı, lenf nodu, bölgesel ve uzak doku metastazını tespit etmek için kullanılmaktadır (Angelelli ve ark., 2001; Kuntz & Herfarth, 1999). Manyetik rezonans görüntüleme tekniği ile TNM evrelemesi tespit edilmektedir (Motohara & Semelka, 2002; Sohn, Lee & Lee, 2000). Pozitron emisyon tomografi çekimi GK evrelemesinde ve kemoterapi tedavisi sırasında glikoz metabolizmasındaki değişiklikleri tespit ederek hastalığın kemoterapiye olan yanıtının değerlendirilmesinde faydalı olmaktadır (Takahashi ve ark., 2013). Ancak prognozu öngörmede kullanılabilmesi doğrultusundaki klinik çalışmalar henüz yetersiz kalmaktadır (Takahashi ve ark., 2013). 90'lı yıllardan sonra geleneksel yöntemlere ek olarak evreleme laparoskopisi tekniği ile peritoneal yayılımın derecesi tespiti ve GK evrelemesi yapılmaktadır (Burke, Karpeh, Conlon & Brennan, 1997). Trefoil faktörleri olarak bilinen TFF1, TFF2 ve TFF3 mukus üretimini sağlayan hücrelerde yüksek oranda eksprese edilmektedir. Bu faktörler katı tümörlerin mukozal bütünlüğünü koruyarak onkogenik transformasyonu önlemektedir. Japon bilim adamları tarafından

yapılan çalışmaya göre GK için biyobelirteç olarak kullanılabilceği gösterilmiştir (Yoon & Kim, 2015).

Günümüzde GK'nın mevcut tedavisi TNM sistemine göre yapılmakta olup erken evre GK'larda sadece cerrahi rezeksiyon uygulanırken ileri evre GK'larda ise rezeksiyon sonrası radyoterapi ve kemoterapi uygulanmaktadır (Şekil 10). Metastatik veya ileri evre rezeksiyon edilemeyen GK'larda birinci basamak tedavi olarak 5-FU, platin türevleri (Cis, oksaliplatin) ve diğer pirimidin analogları (kapesitabin, antrasiklinler (doksorubisin, epirubisin)) tek başına veya kombinasyon halinde uygulanması tercih edilmektedir (Marin ve ark., 2020). Kemoterapi uygulaması hastalığın seyrini iyi yönde etkiliyor olsa da ileri evre GK hastalarında ilaca direnç gelişerek tedavi olumsuz sonuçlanmaktadır (Tunca ve ark., 2019). Son zamanlarda kanser biyolojisindeki önemli ilerlemeler ile birlikte, tümör gelişimiyle ilişkili faktörler ve sinyal yolları tanımlanmıştır. Meme, kolorektal ve gastrointestinal sistem kanserleri gibi birçok kanser türünde antitümör aktivitesi sergileyen moleküler hedefli ajanlar tespit edilmiştir. GK tedavisinde moleküler hedefe yönelik tedavi hücre döngüsü inhibitörleri, HER2 inhibitörü, angiogenez inhibitörleri ve matris metalloproteinaz inhibitörleri kullanılarak uygulanmaktadır (Song ve ark., 2017).

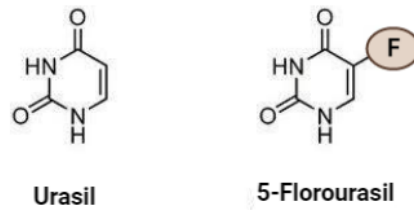
HER2 ilk kez 1995 yılında meme kanseri hücre hatlarında tespit edilen, 17. kromozomun q kolunda yerleşmiş transmembran tirozin kinaz reseptörünü kodlayan gendir. Bu gen RAS/MAP kinaz yolağını aktive ederek hücre proliferasyonunu sağlamaktadır (Higgins & Baselga, 2011; Maresch, Schoppmann, Thallinger, Zielinski & Hejna, 2012). Kemoterapi tedavisinde uygulanan Trastuzumab HER2 reseptörünün dimerizasyonunu engelleyerek sinyal yolağını inhibe etmek amacıyla geliştirilmiş monoklonal antikordur. HER2 pozitif bireylerde Trastuzumab tedavisi tercih edilirken HER2 negatif bireylerde ise Cis veya 5-FU tabanlı kemoterapi uygulanmaktadır (Kamiya, Rouvelas, Lindblad & Nilsson, 2018).



Şekil 10. GK'da TNM evrelemesine göre tedavi uygulamaları

2.2.4.1. 5-Florourasil ve Etki Mekanizması

5-FU kolon, göğüs, baş boyun gibi çeşitli kanser türlerinde günümüzde sıklıkla kullanılan antikanser ilacıdır (Grem, 2000). İleri evre GK için ilk tercih edilen tedavi yöntemi olmakla birlikte tedavi etkinliği, hastalarda gelişen ilaç direnci yüzünden sınırlı olmaktadır (Xu ve ark., 2015). 5-FU, DNA ve RNA'nın pirimidin molekküllerine benzer heterosiklik halkaya sahip aromatik organik bir bileşiktir. DNA ve RNA molekülünden farklı olarak C-5 pozisyonunda hidrojen yerine flor atomuna sahip bir urasil analogudur (Rutman, Cantarow & Paschkis, 1954; Şekil 11).

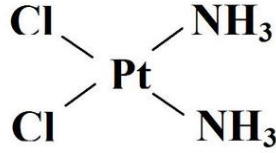


Şekil 11. 5-FU moleküler yapısı

Hastalara uygulanan 5-FU dozunun yaklaşık %80'i ilk olarak karaciğerde katabolize edilmektedir (Longley, Harkin & Johnston, 2003). 5-FU karaciğerde dihidroprimidin dehidrogenaz (DPD) enzimi tarafından dihidrofurourasile (DHFU) dönüştürülmektedir (Diasio & Harris, 1989; Longley ve ark., 2003; Zhang, Li, Zhang

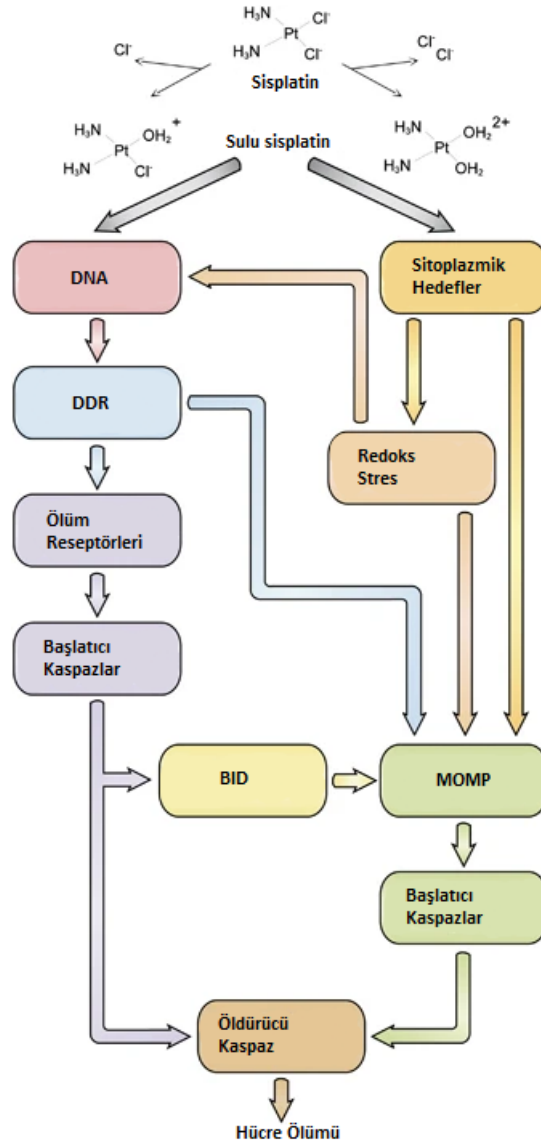
& Jin, 2007). 5-FU, hücre içerisine urasil ile aynı taşıma mekanizmasıyla alınmaktadır. Hücre içerisinde 5-FU, florodeoksiüridin monofosfat (FdUMP), florodeoksiüridin tripfosfat (FdUTP) ve florouridin trifosfat (FUTP) olmak üzere 3 ayrı aktif metabolite dönüştürülür (Şekil 12). Bu aktif metabolitler RNA sentezini azaltmakta ve timidilat sentaz (TS) etkisini bozmaktadır (Longley ve ark., 2003). 5-FU, hücre içerisinde TS ile stabil bir kompleks oluşturur ve böylece deoksitimidin mono-fosfat (dTMP) üretimini inhibe ederek FdUMP dönüştürülür. TS timidilat biyosentezinin katalizlenmesi, protein sentezi ve apoptotik süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayan bir enzimdir (Zhang, Yin, Xu & Chen, 2008). Bu enzim deoksüridin monofosfatın (dUMP) dTMP'ye metilasyonunu katalize eder. Aynı zamanda DNA replikasyonu için timidilat sentezini gerçekleştirir. 5-FU, TS inhibitörü olarak işlev görerek DNA replikasyonu ve hasar onarımı için gerekli olan timidin sentezini engellemektedir (Zhang ve ark., 2008). dTMP seviyesindeki meydana gelen azalma, dTTP'nin diğer deoksinükleotitlerin seviyelerindeki dengesizliğin tetiklenmesini indükler (Danenberg, 1977). Deoksinükleotitlerin seviyelerinde oluşan bu dengesizlikler DNA sentezi ve onarımında ciddi şekilde anormallikler oluşturarak ölümcül DNA hasarına sebep olmaktadır (Danenberg, 1977; Jarmuła, Dowierciał & Rode, 2008). 5-FU, urasil veya timin yerine RNA ve DNA'ya yanlış bağlanabilen bir pirimidin analogu olduğu için nükleik asitlerin biyogenezini ve fonksiyonunu bozarak da DNA hasarına sebep olabilir. 5-FU'nun diğer metabolitleri olan FdUTP ve FTUP, DNA ve RNA hasarı oluşturarak hücre ölümünü tetiklemektedir. FdUTP, TS inhibisyonu ile benzer şekilde DNA hasarı oluşturarak etki ederken, FTUP ise RNA hasarı oluşturarak etki etmektedir (Motohara & Semelka, 2002). Yapılan çalışmalar sonucunda 5-FU'nun antikanser etkinliğinin yolakları tam olarak anlaşılacakla birlikte temel olarak TS inhibisyonu ile gerçekleştirildiği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2008).

2020). Oda sıcaklığında beyaz veya koyu sarı renkli kristal halinde bulunur ve düzlemsel geometriye sahip metalik bir koordinasyon bileşimidir (Shaloam & Paul, 2014). Temel olarak Cis'in moleküler yapısı cis elemental oryantasyonunda iki amid ve iki klorür ligandı içermektedir (Shang-Hung & Jang-Yang, 2019; Şekil 13).



Şekil 13. Cis bileşiminin moleküler yapısı (Champa Jayasuriya & Darr, 2013) .

Pasif difüzyon ile hücre içerisine alınan Cis molekülü hücre içerisine girdiği anda aktive olmaktadır. Sitoplazma içerisinde klorür iyonlarının hücre dışı ortamına kıyasla nispeten düşük konsantrasyonu yüzünden Cis yapısında yer alan klor atomları su molekülleri ile yer değiştirir (Galluzzi ve ark., 2012; Shaloam & Paul, 2014; Şekil 14). Oluşan sulu Cis molekülü proteinler ve DNA bazları üzerinde yer alan sistein ve metiyonin kalıntıları ile etkileşebilen bir reaktif haline gelir. Bu reaktifler DNA hasarına sebep olur ve TP53'ün de dahil olduğu DNA hasar onarım mekanizmasının aktivasyonu tetiklenir. Buna karşılık TP53'ün ürünleri mitokondriyal dış zar geçirgenliğini kolaylaştıran genlerin aktive ederek apoptotik yolak ile ilgili genlerin ekspresyonunu tetikler. Sitoplazmada Cis reaktif oksijen üretimini sürdürerek Cis kaynaklı DNA hasarı şiddetlendirilir. Eğer oluşan hasar boyutu düşük düzeyde ise Cis eklentileri hücre döngüsünün S ve G2 fazında bir tutuklamaya neden olarak onarım mekanizmaları DNA bütünlüğünün yeniden oluşturulmasını sağlar. Ancak DNA hasarı tamir edilemeyecek boyutta ise apoptotik yolla hücre ölümüne sebep olur (Galluzzi ve ark., 2012).



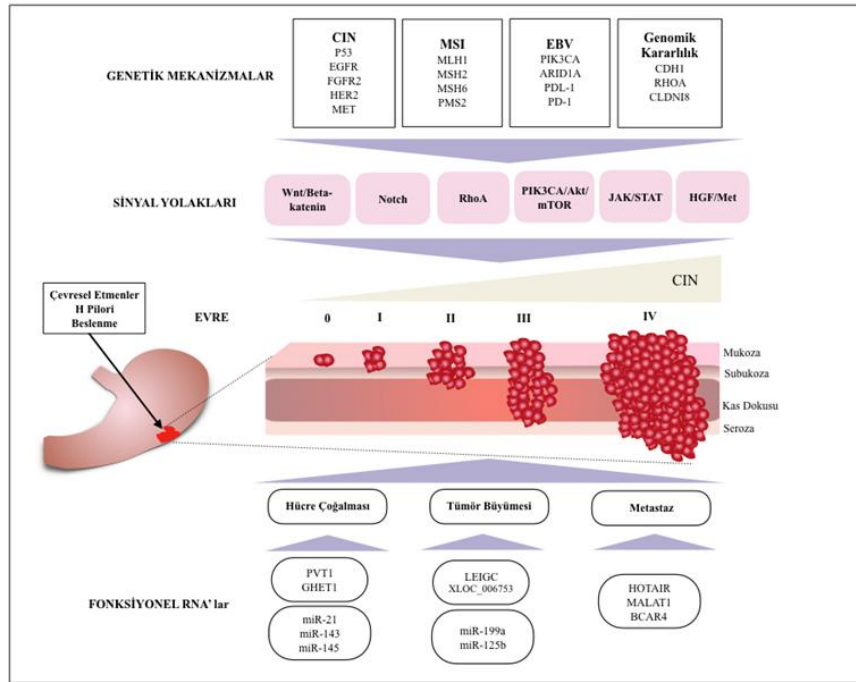
Şekil 14. Cis molekülünün etki mekanizması (Galluzzi ve ark., 2012).

GK hastalarında tedavi sonrasında; hücre içi Cis birikiminin azalması, Tiyol içeren moleküller tarafından Cis'in inaktivasyonunun artması, DNA hasar onarım mekanizmasının aşırı aktif olması sebebiyle Cis direnci gelişebilmektedir (Tanida ve ark., 2012). Sodyum potasyum pompaları, kapılı iyon kanalları gibi aktif taşıyıcılar hücre içersine Cis alımında rol oynamaktadır. Bu kanalların inaktivasyonu sonucunda hücre içersine ilaç alımı engellenir ve hücre dışına aktarılan Cis miktarı içeri alındandan daha fazla hale gelir. Bu durum Cis direnci ile sonuçlanır (Gately & Howell, 1993). Tiyol içeren glutasyon hücre içerisinde Cis'i detoksifiye ederek inaktif Cis-Tiyol konjugatlarına dönüştürür (Sakamoto, Kondo & Kawasaki, 2001). DNA hasar onarım mekanizmaları alkilleyici ajanların neden olduğu DNA eklentilerini ve çapraz

bağları onarır ve çeşitli proteinlerdeki değişiklikler ile birlikte dirençli hale gelir (Marin ve ark., 2020; Tanida ve ark., 2012). Bu mekanizmalar tarafından Cis'e karşı geliştirilen direnç GK tedavi etkinliğini önemli ölçüde düşürmektedir.

2.3. Genetik ve Epigenetik Yaklaşımlar

GK gelişimi ve ilerlemesi bir dizi genetik ve epigenetik mekanizmalardaki düzensizliklerin yer aldığı heterojen bir sürece sahiptir (Şekil 15). Genetik değişimler, metabolik yollarda yer alan proteinlerin fonksiyon kaybına veya farklı şekillerde eksprese edilmelerine sebep olurken, epigenetik değişiklikler ise onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin ekspresyon seviyelerinde anormalliklere neden olmaktadır (Tunca, Ak, Mutlu & Tekin, 2019). Genetik ve epigenetik değişiklikler dikkate alınarak farklı moleküler özellikteki GK alt grupları belirlenebilir ve bu değişikliklere özgü tedavi stratejileri geliştirmek tedaviye yanıt oranını olumlu yönde etkileyebilecektir.

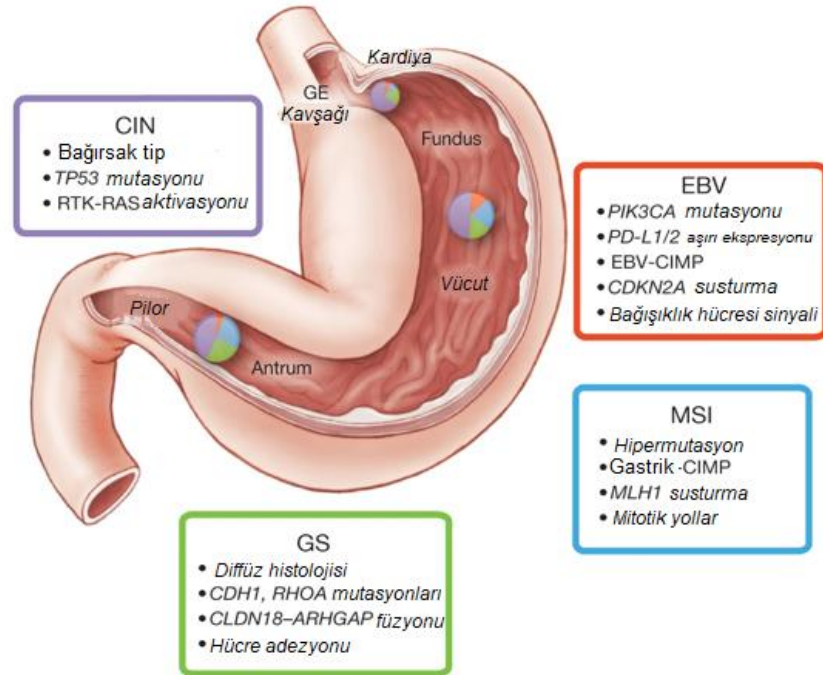


Şekil 15 . GK gelişimi sürecindeki etkili olan genetik ve epigenetik mekanizmalar

2.3.1. Genetik Faktörler

Genetik faktörler, malign fenotipe yol açan anormal gen ekspresyonu nedeniyle GK oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır (Puneet ve ark., 2018). GK sendromları, kalıtsal diffüz gastrik kanser (HDGC), proksimal polipozis (GAPPS),

ailesel instestinal gastrik kanser (FIGC) olarak 3 temel gruba ayrılmaktadır (Oliveira, Pinheiro, Figueiredo, Seruca & Carneiro, 2015). HDGC, çoğunlukla kalıtsal *CDH1* (E-Kaderin) mutasyonu sonucu oluşmaktadır. Bununla beraber bu sendromda *CTNNA1*, *BRCA2* ve *STK11* genlerindeki mutasyonların da etkili olabildiği bilinmektedir (Hansford ve ark., 2015). GAPPS, ilk olarak 2012 yılında tanımlanmış bir sendrom olup bu grupta tümör gelişimi sadece proksimal midede polipler ile karakterizedir ve bu sendromun oluşumunda etkili olan genetik mekanizmalar henüz aydınlatılmamıştır. Kalıtsal GK'lar aynı zamanda Herediter Non Poliposiz Kolorektal Kanser, Familial Adenomatöz Poliposiz ve Li-Fraumeni sendromu ile de ilişkilendirilmektedir (Oliveira ve ark., 2015). Son zamanlarda yapılan genomik analizler ile sıklıkla görülen sporadik GK'ların MSI, EBV, CIN ve epigenetik değişimler sonucu oluşan genomik kararlılık olarak dört farklı moleküler alt tipe sınıflandırılabilirliği belirlenmiştir (Şekil 16).

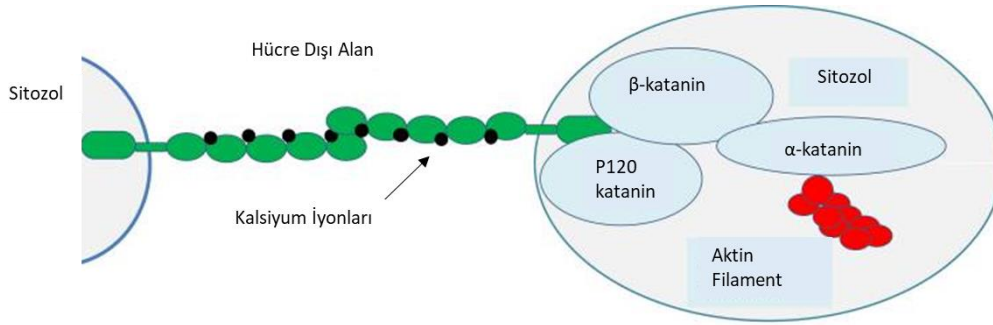


Şekil 16. GK moleküler alt tipleri ve her birinin sahip olduğu moleküler özellikler (Nature, 2014)

2.3.1.1. Gastrik Kanserde *CDH1* (E-Kaderin) Gen Mutasyonunun Rolü

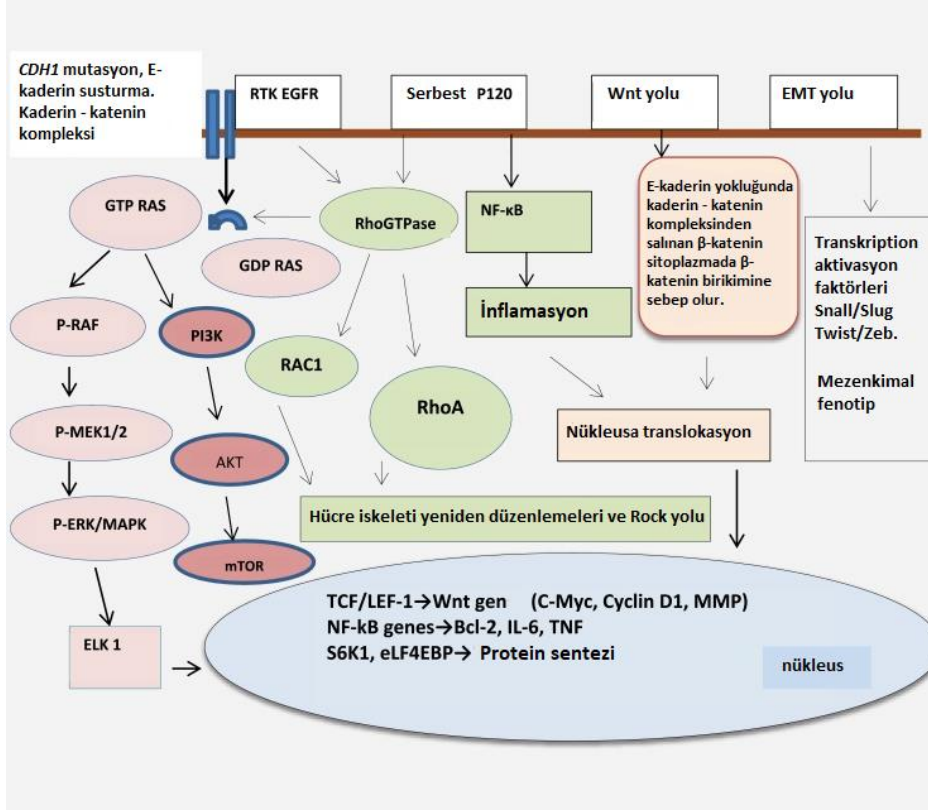
CDH1 geni kromozomun 16q22.1 üzerinde yer alan bir tümör baskılayıcı gendir. Bu gen, 120 kDa'lık E-Kaderin proteinini kodlar. E-Kaderin proteinini, kaderin

adı verilen yüksek oranda korunmuş bir transmembran glikoprotein ailesine aittir. Bu protein β katenininde dahil olduğu katenin adı verilen başka bir sitozolik protein grubu ile kompleks oluşturur ve kalsiyuma bağlı hücre yapışmasını destekleyerek organize dokular oluşturulmasını sağlar. E-kadherin sitozolik alan, ardışık tekrardan oluşan transmembran alanı ve hücre dışı motif olmak üzere 3 yapısal alandan oluşmaktadır (Shenoy, 2019; Şekil 17). E-kadherin proteininin sitoplazmik kuyruğu, hücre iskeleti filamentleri (aktin, katenin) ile etkileşime girerek hücre stabilitesini sağlar ve hücre hareketliliğini önler. Transmembran alanı hücre dışı kalsiyum bağımlı bölge ile bağlanmasını sağlar. Hücre dışı motif ise komşu hücrelerin homofilik kadenin molekülüne bağlanır ve bu bağlanma, hareket eden bölgenin esnemesini önleyen ve sertlik sağlayan kalsiyum iyonlarına ihtiyaç duyulmasını artırır (Shenoy, 2019).



Şekil 17. E-kadherin-katenin kompleksinin yapısı ve işlevi (Shenoy, 2019)

Karsinogenez oluşumundaki *CDH1* mutasyonlarının mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir (Shenoy, 2019). E-kadherin-katenin kompleksi β -katenin, RhoGTPaz, NF- κ B ve EGFR gibi çeşitli sinyal yolları ile etkileşime girerek, gelişim ve karsinogenez sürecinde önemli rol oynamaktadır (Cowell ve ark., 2009; Gottardi, Wong & Gumbiner, 2001; Perrais, Chen, Perez-Moreno & Gumbiner, 2007; Shenoy, 2019; Şekil 18). *CDH1* gen mutasyonu ve bununla ilişkili olarak E-Kadherin protein kaybı, genetik ve epigenetik değişiklikler epitel hücre-hücre yapışma potansiyalini kaybederek hücre yapısında değişikliklere, anormal stromal etkileşimlere ve ayrıca hücre göçü ve sinyalleşmenin değişmesine neden olarak tümör oluşumunu destekler (Adam, Thorsson, Shmulevich & Cancer, 2014; Perrais ve ark., 2007; Shenoy, 2019; Ushiku, Ishikawa & Kakiuchi, 2016).



Şekil 18. E-cadherin tarafından düzenlenen sinyal yolları ve kanser gelişimi ile ilişkisi (Shenoy, 2019)

CDH1 geninde meydana gelen kesik mutasyon anormal derecede kısa, işlevsel olmayan protein üretimine neden olmaktadır. Bu durum kaderin-katenin kompleksinin bozulmasına, hücre bağlantılarının kaybolarak hücre hareketliliğinin artmasına, kontrol edilemeyen hücre bölünmesine ve tümörün metastatik kabiliyetinin artmasına sebep olur (Carneiro, Fernandes, Figueiredo & Caldeira, 2012; Jeanes, Gottardi & Yap, 2008). HDGC sendromlarının yaklaşık %30-50'si bu mutasyona sahiptir. HDGC'de bu mutasyon hastaların çoğunda yaklaşık 38 yaşında asemptomatik olarak ortaya çıkmaktadır. Hastalığa ait belirgin semptomlar gözlemlendiğinde hastalık ileri metastatik evrelerdedir ve kötü prognoza sahiptir (Shenoy, 2019). Genetik değişiklikler HDGC'de tüm gen uzunluğuna dağılmıştır ve *CDH1* germ hattı mutasyonlarının %80'i erken durdurma kodonlarının oluşması nedeniyle E-kaderin proteininin tamamen kaybolmasına neden olmaktadır (Barber, Murrell & Ito, 2008; Berx & Van, 2009; Melo, Figueiredo & Fernandes, 2017).

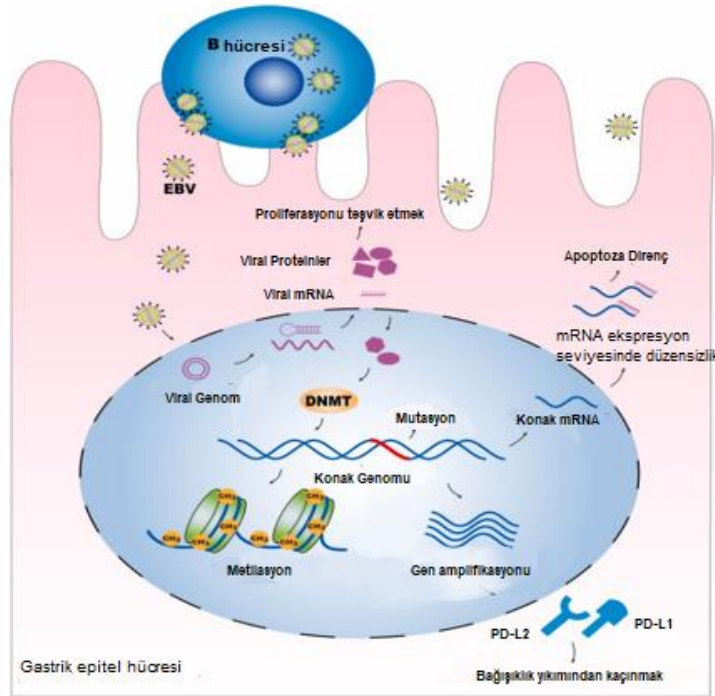
2.3.1.2. MSI Moleküler Alt Tipi

Mikrosatellitler tüm genom içerisinde yer alan kısa tekrar dizileridir. Bu alt tip genellikle, *MLH1* gibi DNA yanlış eşleşme tamir genlerinin transkripsiyonel susturulmasına neden olan metilasyonlar ya da somatik mutasyonları ile bu genlerin fonksiyon kayıpları ile mikrosatellit bölgelerinde meydana gelen delesyonlar ya da insersiyonlar ile ortaya çıkmaktadır. GK'larda MSI, birçok onkogenik sinyal proteini kodlayan genlerin mutasyonlara neden olarak hücre sinyali iletimi gibi birçok fonksiyonel süreci etkilemektedir. MSI' ye sahip GK' lar (MSI-GK), CpG-ada metilator fenotipini (CIMP) taşıyan yüksek mutasyonlu tümörlerdir. Bu alt grup tümörler, bütün GK'ların yaklaşık %45'inde gözlenir ve cinsiyet olarak değerlendirildiğinde kadınlarda daha yüksek görülme oranına sahiptir (Mathiak ve ark., 2017; Tunca ve ark., 2019). MSI-GK'lar genellikle DNA yanlış eşleşme onarım proteinini kodlayan *MLH1* geninin susturulması ve *PIK3CA*, *EGFR* mutasyonları ile karakterizedir (Mathiak ve ark., 2017). MSI-GK'ların tanımlanmasında, immünohistokimyasal olarak *MLH1*, *PMS2*, *MSH2* ve *MSH6* ekspresyon analizi ve BAT-25, BAT-26, NR-21 ve NR-24 mononükleotit belirteçleri ile fragman analizleri yapılmaktadır (Mathiak ve ark., 2017). Ancak GK'larda MSI durumunun ve bu alanda yapılan analizlerin klinikopatolojik parametreleri ve prognozu etkileyip etkilemediği hala tartışılmaktadır. Farklı popülasyonlarda yapılan çalışmalar ile MSI-GK'ların az sayıda lenf nodu metastazı oluşturduğu, ileri yaşlı hastalarda yaygın gözleendiği ve aynı zamanda instestinal tip ve düşük MSI olan tümörlerden daha iyi bir sağ kalım gösterdiği belirlenmiştir (Micaela ve ark., 2017; Tunca ve ark., 2019; Röcken, 2017).

2.3.1.3. Epstein-Barr Virüs Moleküler Alt Tipi

EBV yetişkin popülasyonun %90'nından fazlasını enfekte eden Burkitt lenfomada keşfedilen bir insan herpes virüsüdür (Nishikawa ve ark., 2018; Yang, Liu, Zeng, Hu & Gan, 2020). EBV pozitif GK (EBV-GK), EBV enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiş malign bir tümördür (Yang ve ark., 2020). EBV-GK coğrafi dağılıma göre bütün GK'ların yaklaşık olarak %5-10'unu oluşturmaktadır (Lizasa, Nanbo, Nishikawa, Jinushi & Yoshiyama, 2012). EBV'nin epitel hücreleri enfekte ettiği mekanizma henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak EBV'nin gastrik epitel hücrelerine EBV enfekte olan B lenfositleri aracılığı ile hücreden hücreye temas yoluyla girmektedir (Imai, Nishikawa & Takada, 1998; Yang ve ark., 2020; Şekil

19). EBV-GK' ların en temel moleküler özelliği, kanser oluşumu ile ilişkili genlerin CpG adalarında promotör bölge metilasyonunu tetiklemesidir. Bu alt gruptaki GK' lar genellikle *PIK3CA* ve *ARID1A* gen mutasyonları ile karakterizedir (Röcken, 2017). Genel GK moleküler özelliklerine göre EBV-GK'lar benzersiz patolojik özelliklere sahip olmasına rağmen, spesifik klinik belirtilere sahip değildir (Sun ve ark., 2020). Lenf nodu metastaz varlığı ile EBV pozitifliği arasında negatif bir ilişki olduğunu göstermektedir (Tokunaga & Land, 1998). Camargo ve ark. erkeklerde ve 60 yaşın altındaki hastalarda EBV-GK insidansının daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (Camargo ve ark., 2016). Asya popülasyonunda yapılan bir çalışmada EBV pozitif GK' ların diğer GK alt gruplarına göre daha iyi prognoza sahip olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark., 2015). EBV pozitif GK' larda PD-L1 ve PD-1 proteinlerinin yüksek şekilde eksprese edilmesinden dolayı bu tümörler immün kontrole özgü spesifik inhibitörler ile tedavi edilebilmektedir (Böger ve ark., 2016; Tunca ve ark., 2019). Bu yüzden, EBV pozitifliğinin GK'larda belirlenmesi tedavi seçeneğinin oluşturulmasında önemli rol oynamaktadır.



Şekil 19. GK gelişimi ve ilerlemesinde EBV'nin rolü (Yang ve ark., 2020)

2.3.1.4. Kromozomal Karasızlık Moleküler Alt Tipi

CIN, hem kromozom sayılarında hemde yapısında değişikliklere sebep olan anormal genomik değişikliklerdir (Wei, Cheng, & Wang, 2016). CIN, anöploidi ve poliploidi olarak, kromozom kaybı veya kazanımıyla DNA içeriğindeki değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Bu mekanizma sitogenetik, moleküler sitogenetik ve flow sitogenetik yöntemler ile saptanabilmektedir (Tunca ve ark., 2019). GK'ların büyük çoğunluğu CIN ile karakterizedir (Tunca ve ark., 2019; Sohn ve ark., 2017). CIN GK'lar genellikle *P53* mutasyonları ve *EGFR*, *FGFR2*, *HER2* ve *MET* reseptör tirozin kinazları kodlayan genlerdeki mutasyonlar ve amplifikasyonlar ile aktive olmaktadır (Deng ve ark., 2012; Tunca ve ark., 2019). *FGFR2* ve *HER2* amplifikasyonlarının GK prognozu ile bir anlamlılığı olmadığı, *MET* amplifikasyonunun ise lenf nodu, uzak organ metastaz oluşumu ve kısa yaşam süresi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Metzger ve ark., 2016). Bu nedenle GK sınıflandırılmasında CIN bağımsız bir parametre olarak kullanılmakta yetersiz kalmaktadır.

2.3.1.5. Genomik Kararlılık Moleküler Alt Tipi

Genomik kararlılık moleküler alt tipi, somatik mutasyonlar içerip, 50 yaş ve altındaki hastalarda daha yaygın gözlenmektedir (Wang ve ark., 2019). Bu alt tipe ait GK'lar diffüz histolojik fenotipe sahiptir (Nature, 2014; Wang ve ark., 2019). Genomik kararlılık alt tipi tümörleri hücre yapışmasında rol oynayan *CDH1* ve anjiyogenez ile ilişkili *RHOA* genlerinde nokta mutasyonu içermektedir (Röcken, Behrens, Böger & Krüger, 2016; Wang ve ark., 2019). Ayrıca mide epitel hücrelerinin adhezyon gelişiminin genomik kararlılık ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Tunca ve ark., 2019). *RHOA* nokta mutasyonlarının büyük çoğunluğu intestinal tip GK'lar ile ilişkilendirilmiştir (Röcken ve ark., 2016). GK'larda genomik kararlılık moleküler alt tipinin, klinik öneminin belirlenebilmesi için ileri moleküler analizlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

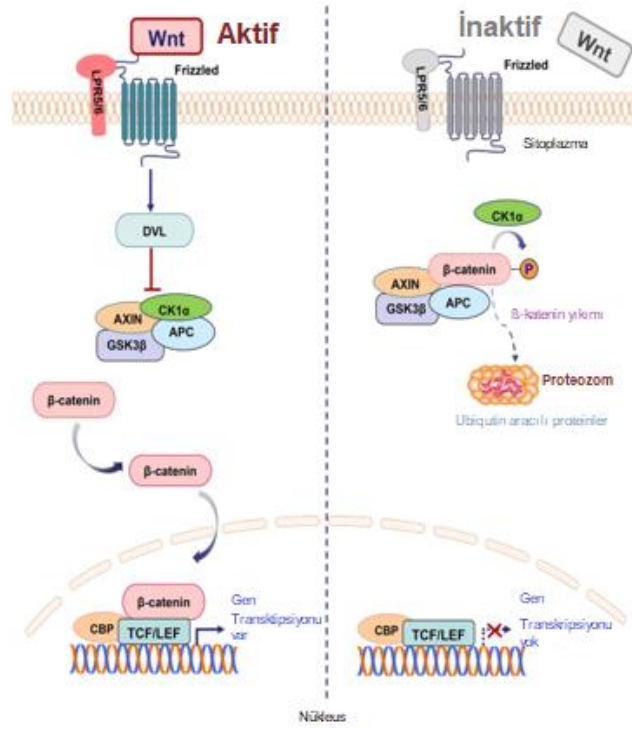
2.3.1.6. Gastrik Kanseri Gelişimi ile İlişkili Sinyal Yolakları

GK gelişimi ve ilerlemede birçok gen ve bu genler ile ilişkili hücre içi sinyal yolaklarındaki anormallikler rol oynamaktadır. Wnt/ β -katenin, Fosfatidilinozid 3-kinaz (PI3K)/Akt/ mTOR, Notch, Hedgehog, MAP /Kinaz, JAK/STAT gibi bir çok sinyal yolağı hücre fonksiyonları etkileyerek GK oluşumuna sebep olmaktadır (Molaei, Forghanifard, Fahim, & Abbaszadegan, 2018). Bu sinyal yolaklarının altında

yatan moleküler mekanizmaların anlaşılması GK tedavisi için yeni terapötik ajanların geliştirilmesine ve yeni bakış açılarının oluşmasına katkı sağlayabilecektir.

2.3.1.6.1. Wnt/ β -Katenin Sinyal Yolağının Gastrik Kansere İlişkisi

Wnt sinyal yolağı, özellikle gastrointestinal sistem olmak üzere birçok kanserde tümör oluşumunu destekleyen evrimsel süreç boyunca korunmuş bir yoldur (Katona & Rustgi, 2017). Bu sinyal yolağı gelen sinyalleri hücre yüzeyi reseptörleri aracılığıyla bir hücreye ileterek düzenlenmesini sağlayan salgılanmış glikoproteinlerden oluşmaktadır (Katona & Rustgi, 2017). Wnt sinyal yolağı embriyonik gelişim sürecinde hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve hücre göçü gibi biyolojik mekanizmaların düzenlenmesinde ve organogenez evrelerinde görev almaktadır (Komiya & Habas, 2008; Koushyar, Powell, Vincan & Pheesse, 2020). Wnt/ β -Katenin klasik olan kanonik yolağı, kanonik olmayan ve Wnt/ Ca^{+2} bağımlı yolağı olmak üzere 3 alt gruba ayrılmaktadır (Huelsen & Rens, 2002). Wnt sinyali varlığında, Wnt ligandları hücre membranında yer alan Frizzled reseptörüne ve lipoprotein reseptör ilişkili LRP5/6 proteinine bağlanır (Chiurillo, 2015; Komiya & Habas, 2008). Bu ligant-reseptör kurulduğunda Frizzled-Wnt-LRP5/6 kompleksi oluşur ve Wnt sinyal mekanizması aktif hale gelir (Mikels & Nusse, 2006). Oluşan bu komplekse Dsh proteini de katılarak LRP5/6 proteini fosforillenir. Bu fosforilasyonun ardından Axin, APC-kazein kinaz (CK1)-glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3)'den oluşan yıkım kompleksini dağıtarak CTNNB1 geninin ürünü olan β -katenin yıkımını engeller ve nükleusta β -katenin birikimi gerçekleşir. Nükleusta biriken β -katenin, transkripsiyon faktör ailesi olan TCF/LEF moleküllerine bağlanarak Wnt hedef genlerinin transkribe olmasını sağlar (Teo & Kahn, 2010). Aktif Wnt sinyali yokluğunda ise APC-CK1-GSK3 kompleksinde yer alan CK1 ve GSK3 β -katenini amino terminal bölgesinden fosforilleyerek β -Trcp ve E3 ubiquitin ligaz alt birimi tarafından tanınması sağlar. Ardından ubiquitinasyon ve proteazomal degradasyona uğrayarak β -katenin yıkımı gerçekleşir (Komiya & Habas, 2008; Koushyar ve ark., 2020; Teo & Kahn, 2010; Şekil 20). Kanonik olmayan ve Wnt/ Ca^{+2} bağımlı yolağlar ise β -katenin'den bağımsız yolağı olarak adlandırılır ve bu yolağlar hücre farklılaşması ve hücre göçü ile önemli rol oynar (Koushyar ve ark., 2020).



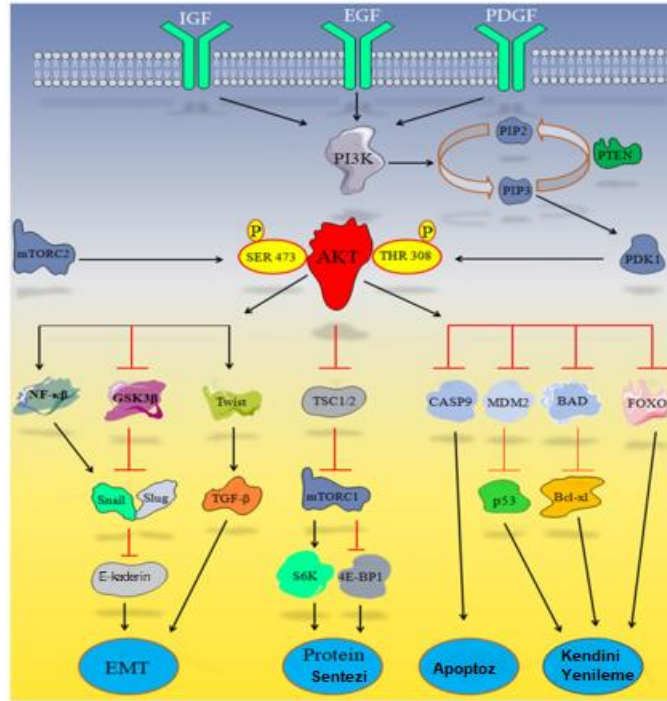
Şekil 20. Aktif ve aktif olmayan Wnt/ β -katenin sinyal yoluğu (Zhang & Wang, 2020)

Wnt/ β -katenin sinyal yolunun anormal aktivasyonu, GK vakalarının önemli bir bölümünün gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynamaktadır (Chiurillo, 2015). Wnt sinyal yoluğunun aşırı derecede aktif olması gastrik epitelde hücre ayrılmasına, fundik gland polip oluşumuna ve adenomatoz değişikliğine neden olmaktadır (Fu, Li, & Hao, 2017). Bu sinyal yoluğunun artan aktivitesi H. pilori enfeksiyonunun neden olduğu GK'lar ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca bu aşırı aktivasyon GK'da kök hücreleri benzeri yapıların oluşumunu desteklemiştir (Fu ve ark., 2017). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Wnt/ β -katenin sinyal yoluğunun artan aktivitesini antikorlar, RNA etkileşimleri ve rekombinant proteinler gibi biyolojik inhibitörler kullanılarak tersine çevrilmesi hedeflenmiştir (Tunca ve ark., 2019).

2.3.1.6.2. PI3K/Akt/mTOR Yoluğu ve Gastrik Kanser Gelişimi

PI3K/Akt /mTOR yolu normal hücresel süreçlerde yer alan en önemli sinyal yollarından biridir. Anormal aktivasyonu, birçok kanser türünde, hücre proliferasyonu, hücre göçü, apoptoz, ilaç direnci gibi hücresel mekanizmaları düzenler (Fattahi ve ark., 2020; Sun ve ark., 2014). PI3K sinyal yoluğu trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve

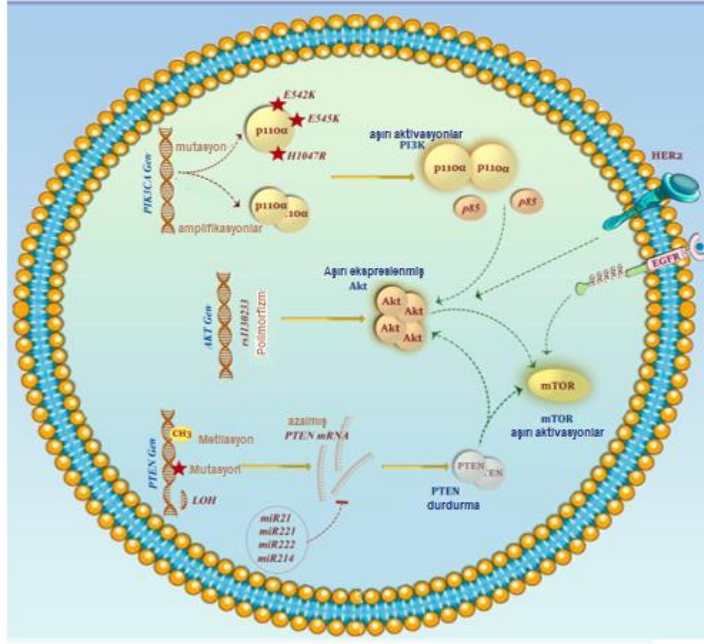
diğer büyüme faktörleri dahil olmak üzere çeşitli ligandların reseptör tirozin kinazlara bağlanması ile aktif hale gelir (Fattahi ve ark., 2020). Üç farklı sınıftan oluşan geniş bir lipid kinaz ailesi olan PI3K, PI3K/Akt ekseninin en üstünde yer alır ve fosfatidilinositol 4,5-bifosfatı (PIP2), fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfata (PIP3) dönüştürür (Bagheri ve ark., 2021; Şekil 21). Fosfoinosititlerin fosforile edilmiş inositol halkaları, serin/treonin kinazlar ve protein kinaz B olarak bilinen Akt'de sinyal proteinleri için bağlanma bölgeleri oluşturur (Fattahi ve ark., 2020). Fosfoinositide bağımlı protein kinaz-1 (PDK1) Akt'ye bağlanarak aktif hale getirir. mTOR, mTORC1 ve mTORC2 olarak adlandırılan iki kompleksin parçası olarak işlev gören 289 kDa moleküler ağırlığa sahip bir serin/treonin protein kinazdır. Akt mTORC2 tarafından tekrar fosforile edilerek aktif hale gelir (Fattahi ve ark., 2020). Aktif hale gelen Akt mTORC1'i baskılayarak transkripsiyon faktörlerini serbest bırakır ve transkripsiyonun başlamasını destekler. PI3K sinyalinin aktifleşmesi hücre proliferasyonu, DNA hasar onarımı, angiogenez, farklılaşma, hücre göçü gibi bir dizi hücre içi mekanizmanın anormal düzenlenmesine sebep olur (Bagheri ve ark., 2021; Fattahi ve ark., 2020).



Şekil 21. Kanser oluşumunda PI3K/Akt/ mTOR yolunun etkisi (Fattahi ve ark., 2020).

PI3K inhibisyonu, Akt ve mTOR'un aktivasyonunu önleyerek, kanser hücrelerinin hayatta kalması ve tümör ilerlemesi ile ilişkili bu genlerin baskılanmasını sağlar. PI3K'yı inhibe etmek için birtakım ilaçlar geliştirilmektedir ve klinik deneyler bunların bazılarının nispeten antikanser ajanları etkili olabileceğini göstermiştir. Ayrıca bu yolağı inhibe etmek için, PI3K, EGFR ve PARP gibi onkogenik yolağı baskılayabilecek inhibitörler kullanılmaktadır (Bagheri ve ark., 2021; Fattahi ve ark., 2020).

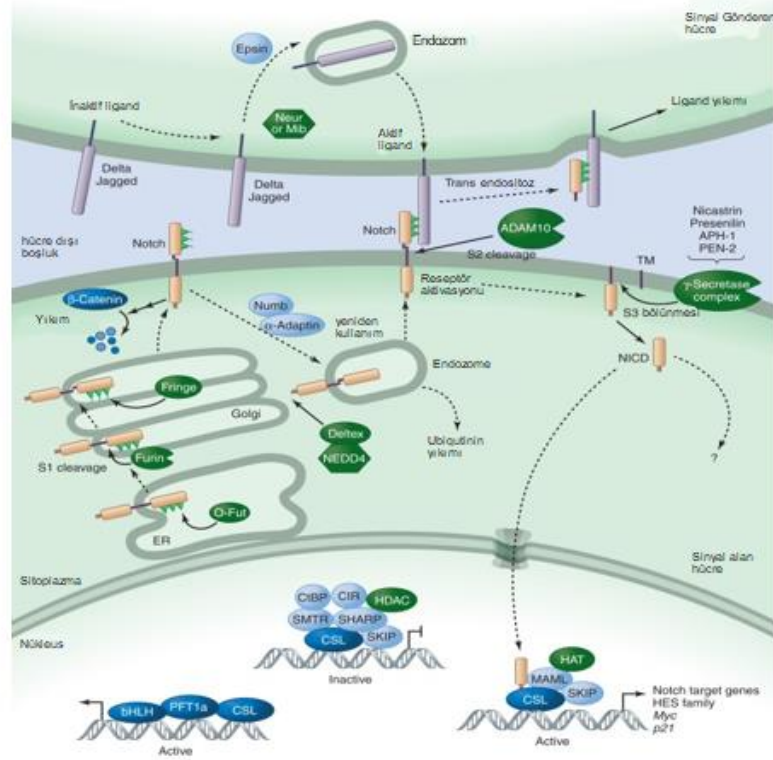
PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının aşırı aktivasyonu birçok solid tümörün oluşumunda olduğu gibi GK gelişiminde desteklemektedir. GK vakalarında bu yolak %35-80' inde *PI3KCA*'nın yüksek ekspresyonu, %40' ında ise Akt' nin fosforilasyonu ile aktive olmaktadır. Ayrıca reseptör tirozin kinaz aktivasyonu, *PI3KCA*' yı aktive edici mutasyonlar ve amplifikasyonlar, mutasyonlar mTOR'un anormal aktivasyonu, EGFR, PI3K gibi yukarı akış düzenleyicilerinde mutasyonlar ve kodlama yapmayan RNA'lar gibi epigenetik mekanizmaların etkisi ile aşırı aktive olarak GK oluşumunda rol oynamaktadır (Fattahi ve ark., 2020; Şekil 22). *PI3KCA* ve *Akt* proteinlerinin yüksek ekspresyonu, GK'da lenf nodu metastazı ile ilişkilendirilmiştir. mTOR'un anormal aktivasyonu bazı GK vakalarında kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (Fattahi ve ark., 2020), GK'nın EBV ve MSI kökenli moleküler alt tiplerinde sırasıyla %80 ve %42 oranında *PIK3CA* anormallikleri tespit edilmiştir (Bagheri ve ark., 2021; Tunca ve ark., 2019). PI3K/Akt/mTOR yolağının anormal aktivasyonuna neden olan moleküler mekanizmaların daha net anlaşılabilmesi potansiyel GK tedavisi için moleküler hedefli terapötik ajanların geliştirilmesini sağlayabilecektir.



Şekil 22. GK oluşumunu destekleyen PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının aşırı aktivasyonuna neden olan genetik ve epigenetik mekanizmalar (Fattahi ve ark., 2020)

2.3.1.6.3. Notch Sinyal Yolağı ve Gastrik Kanser ile İlişkisi

Notch yolağı, gelişim sürecinde hücrenin kaderinin belirlenmesinde, organ oluşumu ve morfogenezi düzenleyerek hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz mekanizması gibi hücresel süreçlerde görev alan sinyal yolağıdır (Kopan, 2012). Evrimsel süreç boyunca korunmuş olan Notch sinyal iletimi, iki komşu hücre arasındaki reseptör-ligand etkileşimi gerçekleşir (Huang ve ark., 2016; Kopan, 2012; Şekil 23). Notch sinyal yolağı; Notch reseptörü (Notch 1,2,3,4) Delta benzeri (DLL1, DLL3 ve DLL4), Serrate benzeri (JAG1 ve JAG2) ligantlar (DSL) ve DNA bağlanma proteini (CSL)'den oluşur. Notch reseptörünün hücre dışı alanda kalan kısmı, ligand bağlanmasına katkıda bulunan EGF tekrarları içerir (Huang ve ark., 2016).



Şekil 23. Notch sinyal yolağı (Kopan, 2012).

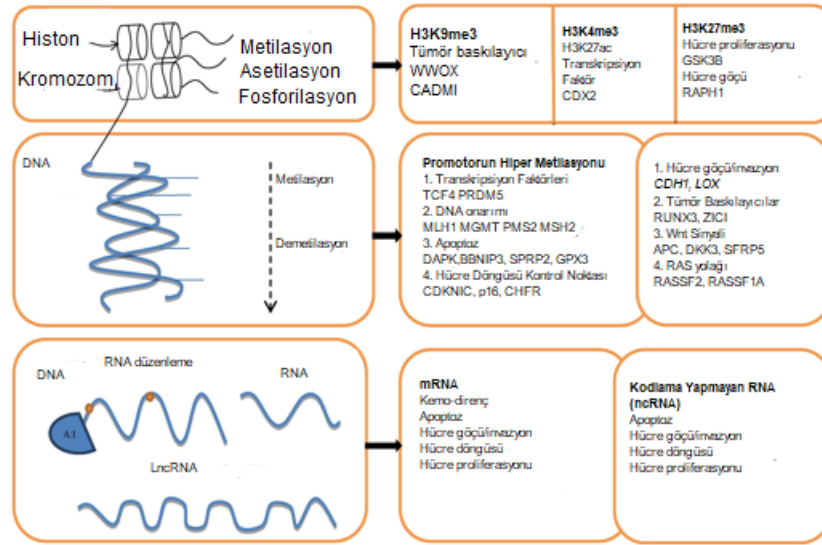
Notch reseptörünün aktivasyonu esnasında S1, S2 ve S3 olmak üzere 3 ayrımla mekanizması gerçekleşir. İlk aşamada S1 ayrılması biyosentezi gereği Notch proteinleri, golgi içinde furin benzeri proteazlar tarafından heterodimer yapılara dönüştürülür. Bu aşamadan sonra olgunlaşan Notch reseptörü hücre membranına yerleşerek komşu hücrenin Notch ligandına bağlanır ve Notch sinyali aktif hale gelir (Huang ve ark., 2016; Kopan, 2012). Reseptör-ligant ilişkisi gerçekleştiğinde ADAM10 metalloproteaz tarafından Notch'un hücre dışı alanı serbest kalması sağlanır ve bu ayrılma S2 ayrılması olarak kabul edilir (Kopan, 2012). Son aşama ise gamma sekretaz tarafından gerçekleştirilen proteolitik işlem olan S3 ayrılmasıdır. Bu aşamada transkripsiyonel olarak aktif olan hücre içi kısım (NICD) membrandan ayrılarak sitoplazmada serbest hale gelir ve aktif Notch oluşur. Nükleusta NICD fosforilasyon ile aktif hale, E3 ubikutin ligazlar ile ubikütinasyon yıkıma uğrayarak düzenlenir. Nükleusta NICD-CSL kompleksi oluşur ve aktif Notch ile bağlantı kurarak hedef genlerin transkripsiyonunu sağlar (Kopan, 2012).

Normal gastrik mukoza gelişiminde ve gastrik epitelin foveoler bezlerine farklılaşmasında Notch sinyal yolu görev almaktadır. GK lezyonlarında ve tümör

dokularında, Notch reseptörünün, NICD ve Notch ligant seviyelerinin yüksek miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir (Huang ve ark., 2016; Tunca ve ark., 2019). GK hastalarında Notch sinyal yolağının aşırı aktivasyonu kötü prognoz ve düşük sağkalım oranı ile ilişkilendirilmiştir (Huang ve ark., 2016). Ayrıca GK vakalarının çoğunluğunda tümör farklılaşması, tümör invazyonu, artan lenf nodu metastazı ve değişen yüzey morfolojisinde artan Notch sinyalinin rolü olduğu düşünülmüştür (Huang ve ark., 2016; Yao, Ni, Zhang, Wang & Shao, 2017). GK'da Notch reseptörlerinin mekanizması hala net bir şekilde aydınlatılamamıştır. Bu yolağı hedefleyen tedavi edici potansiyele sahip klinik uygulamalarda kullanılabilecek spesifik bir inhibitör araştırmaları günümüzde hala devam etmektedir (Huang ve ark., 2016).

2.3.2. Epigenetik Faktörler

Günümüzde moleküler biyoloji alanındaki gelişmelerde birlikte tümör biyolojisinde genetik mekanizmalar ile birlikte epigenetik mekanizmalarda yer alan değişikliklerin çalışılması önem kazanmıştır. Epigenetik DNA dizisinde herhangi bir değişiklik oluşturmadan gen ekspresyon seviyesinin düzenlenmesini sağlayan mekanizmalardır. Bu epigenetik değişiklikler tümör baskılayıcı ve onkogenlerin transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası seviyelerde düzensizliklere neden olarak tümörün gelişiminde ve ilerlemesinde desteklemektedir (Puneet, Kumari, Tiwari, Khanna & Narayan, 2018). Epigenetik mekanizmalar DNA ya da RNA temelli olarak 2 gruba ayrılmaktadır (Şekil 24). DNA temelli epigenetik düzenlemelerde görev alan moleküler mekanizmalar, DNA promotör bölge metilasyonları, histon modifikasyonları ve kromatinin yeniden düzenlenmeleridir (Canale ve ark., 2020). Tümör biyolojisi analizlerinde RNA temelli epigenetik düzenlemelerde ele alınan en önemli iki fonksiyonel RNA grubu mikroRNA (miRNA) ve kodlama yapmayan uzun RNA (Long non-coding; LncRNA) molekülleridir (Samadani ve ark., 2019).

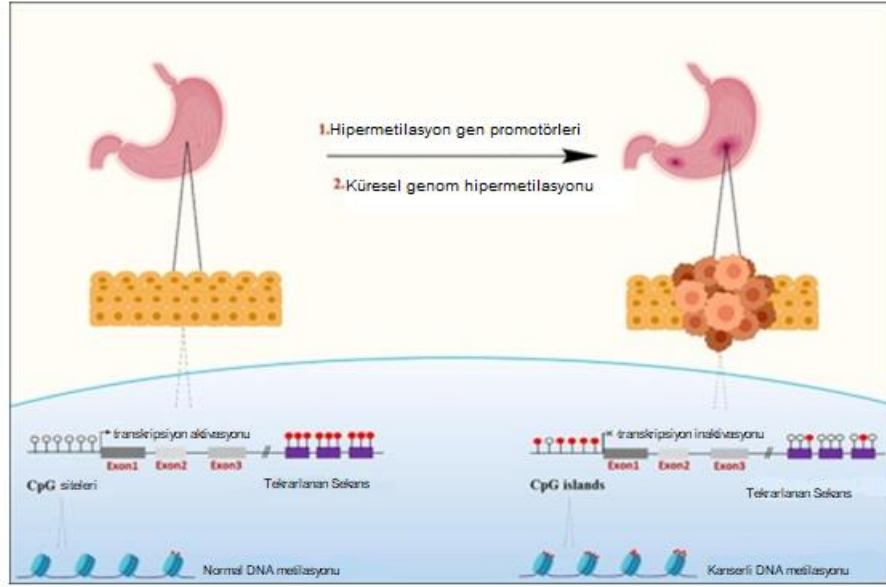


Şekil 24. GK gelişimini destekleyen DNA ve RNA tabanlı epigenetik düzenlemeler (Samadani ve ark., 2019).

2.3.2.1. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, genlerin 5' promotör bölgelerinde yer alan guanin-sitozin bakımından zengin dizilerinde (CpG adaları) guaninden önce gelen sitozin nükleotidinin 5.karbon atomuna tek bir metil (-CH₃) grubunun eklenmesiyle oluşan epigenetik modifikasyondur (Zhou ve ark., 2018). DNA metilasyonu, dokuya özgü gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, embriyonik gelişim mekanizmasında ve X-kromozomu inaktivasyonunda rol oynamaktadır (Zhou ve ark., 2018). Farklı genomik bölgelerdeki DNA metilasyonu, gen aktivitelerini farklı şekilde etkilemektedir. DNA metilasyonu histon-DNA veya histon-histon etkileşimini etkileyerek heterokromatin yapısını düzenleyebilir (Zhou ve ark., 2018). DNA metilasyonu DNA metiltransferazlar (DNMT'ler) adı verilen bir grup enzim tarafından katalize edilir. DNA metilasyonu GK'da anormal kromatin yapıları, yapısal varyasyonların oluşumu ve gen mutasyonları gibi genetik anormallikler neden olur (Usui ve ark., 2021). Promotör bölgede yer alan CpG adalarındaki DNA hipermetilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin susturulmasını sağlayarak GK ilerlemesini destekler (Şekil 25; Usui ve ark., 2021). GK ile ilişkili temel genlerin metilasyonu ile ekspresyonlarının yeniden düzenlenmesi, kanserin histolojik derecesine ve meydana geldiği gastrik bölgeye göre değişiklik göstermektedir (Tunca ve ark., 2019). H. pilori kökenli iltihaplanmadan dolayı mide gastrik mukozasında bulunan DNA Alu tekrar elementlerinde hipermetilasyon olduğu gösterilmiştir (Tahara & Arisawa, 2015). GK gelişimi ile ilişkili olan *CDH1*, *MGMT*

ve *COX2* genlerinin promotör bölge metilasyonlarının *H. pilori* tedavisi sonrası kısmen tersine çevrildiği tespit edilmiştir (Chan ve ark., 2006). DNA hipermetilasyonuna sahip EBV-GK'lar genellikle *PIK3CA* mutasyonları, *PD-L1/2* aşırı ekspresyonu ve *TP53* mutasyonları ile ilişkilendirilmiştir (Usui ve ark., 2021).

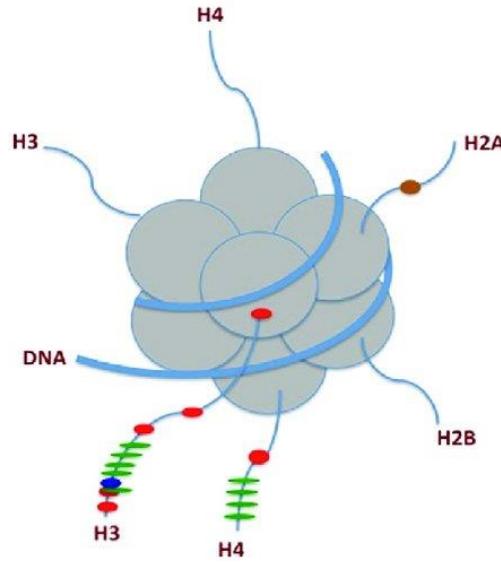


Şekil 25. GK oluşumunu destekleyen DNA metilasyon mekanizması (Ebrahimi ve ark., 2020)

2.3.2.2. Histon Modifikasyonu

Histon modifikasyonları, asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon ve ubikitinasyon gibi düzenlemeleri içeren, histon proteinlerinin (H1, H2A, H2B, H3 ve H4) post-translasyonel seviyede kromatin yapısını değiştirerek gen ekspresyon düzeyinde değişikliğe sebep olan epigenetik mekanizmalardır (Yang, Gu & Zhen, 2014; Şekil 26). Histon modifikasyonları DNA replikasyonu ve transkripsiyon gibi hücrel süreçlerin düzenlenmesinde etkin rol oynar (Yang ve ark., 2014). Ek olarak histon modifikasyonları GK'nında yer aldığı çeşitli kanser türlerinde tümör gelişimi ve ilerlemesini desteklemektedir (Yang ve ark., 2014). Histon asetilasyonu, histon asetiltransferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) olmak üzere zıt etkilere sahip iki grup enzim tarafından, düzenlenen geri dönüşümlü dinamik denge sürecidir (Alaskhar Alhamwe ve ark., 2018; Yang ve ark., 2014). HAT'ler, histon kuyruklarındaki hedef lizin kalıntılarının bir amino asit grubuna asetil grubunu transfer ederek histonlar ve DNA arasındaki etkileşimi zayıflatılmasına neden olur (Alaskhar Alhamwe ve ark.,

2018). HDAC'ler ise histon kuyruklarının lizin kalıntılarında asetil gruplarını uzaklaştırır ve gen ekspresyonunu baskılayıcı olarak rol oynar (Alaskhar Alhamwe ve ark., 2018). GK dokularında HDAC ailesine ait HDAC1 ve HDAC2' nin yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu ve bu durumun kemoterapötik ajanlara karşı ilaç direnci gelişimi ilişkili olabileceği ön görülmüştür (Yang ve ark., 2014). Histon asetilasyonlarının GK'larda invazyon ve metastaz gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Yang ve ark., 2014).



Şekil 26. Histon modifikasyonlarının şematize edilmesi (Suneel, Onteru, & Singh, 2015).

Histon metilasyonu, histon metiltransferazlar tarafından histon proteinlerinde yer alan amino asitlere metil gruplarının eklenmesidir (Alaskhar Alhamwe ve ark., 2018). GK ile ilişkili olarak histon metilasyonları ile yapılan çalışmalarda genellikle H3 ve H4 üzerinde durulmuştur (Liu, Zhu, Xu & Dai, 2014; Yang ve ark., 2014). Park ve ark. yaptığı çalışmada H3K9 metilasyonunun GK'da tümör evresi, lenfovasküler invazyon, nüks ve genel sağkalım oranları ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir (Park ve ark., 2008). Ayrıca H3K9 metilasyon durumunun GK'larda bağımsız prognostik faktörü olarak kullanılabileceğini ortaya koymuşlardır (Park ve ark., 2008). Zhang ve ark. GK tümör dokularında komşu normal dokulara kıyasla, CpG adalarında H3K27 metilasyonunun önemli farklılıklar içerdiğini gösterdiler (Zhang, Zhong, Dai & Zhou, 2009). GK'larda kötü prognoz ile ilişkilendirilen Zeste Enhanser Homoloğunun yüksek ekspresyon seviyesinin E-kaderin promotöründe H3K27 metilasyonunun neden olduğu tespit edildi (Yang ve ark., 2014). GK'larda histon fosforilasyonunun histolojik

alt tipinin belirlenmesi, invazyon ve metastaz gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir (Yang ve ark., 2014).

2.3.2.3. MikroRNA Ekspresyon Seviyelerinin Değişimi

MiRNA'lar, transkripsiyon sonrası gen düzenlemesinde görev alan, endojen kaynaklı 17-25 nükleotit uzunluğunda, protein kodlama potansiyeline sahip olmayan küçük RNA molekülleridir. Bu moleküller hücre proliferasyonu, hücre ölümü, tümör gelişimi, migrasyon, ilaç direnci, metastaz ve anjiyogenez gibi birçok hücre fonksiyonlarda önemli rol oynamaktadırlar (Hao, He, Li, Wang & Wang, 2017; Tablo 4). MiRNA'ların artan ya da azalan ekspresyon seviyeleri kanser ile ilişkili olan genlerin ekspresyonlarını transkripsiyon sonrası seviyelerde düzenlemektedirler. Diğer birçok kanser türlerinde olduğu gibi GK'larda da etkili olan miRNA' lar hastalığın teşhisi ve tedavisinde kullanılmak üzere prognostik bir belirteç olabilmektedir. MiR-125b, miR-506, miR-302'in GK'larda prognostik birer belirteç olabileceği artan çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Hao ve ark., 2017). GK'da miR-100, miR-506, miR-302, miR-27b'in düşük eksprese edildiği, miR-125b, miR-16 ve miR-30b'un ise yüksek eksprese edildiği tespit edilmiştir (Hao ve ark., 2017). MiR-100 GK'da tümör büyümesi invazyon, metastaz ve tümör boyutu ile ilişkilendirilmiştir. MiR-506 anjiyogenez, hücre göçü ve zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiştir. MiR-302 migrasyon, invazyon, metastaz ve prognoz belirlenmesinde rol oynamaktadır. MiR-125b yüksek ekspresyonu hücre büyümesi, proliferasyon, migrasyon, invazyon, tümör boyutu TNM evresi, metastaz ve zayıf prognoz ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. MiR-16 ve miR-30b ilaç direnci mekanizması gelişimi ile ilişki bulunmuştur (Sun ve ark., 2014). GK' larda etkili olan miRNA'ların moleküler etki mekanizmasının daha iyi anlaşılması, GK' ların tedavisi için daha etkili terapötik ajanların geliştirilmesine ve bu kanserin tedavisi için yeni bakış açılarının oluşmasına katkı sağlayabilecektir.

Tablo 4. miRNA'ların anormal ekspresyon seviyelerinin GK gelişimindeki rolleri (Hao ve ark., 2017).

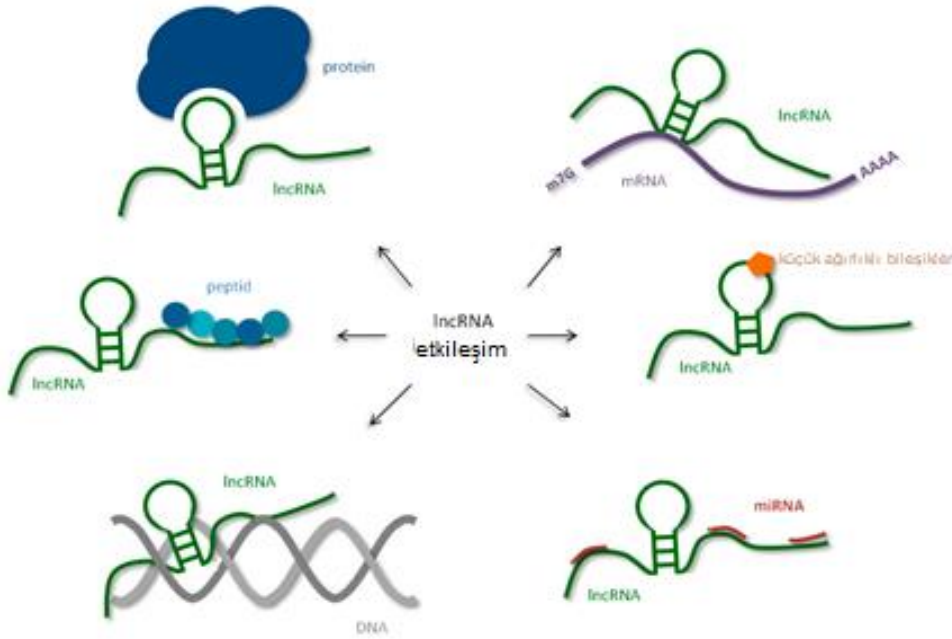
miRNA	Ekspresyon Seviyesi	HücreSEL mekanizmalardaki rolü	Klinik özellikleri
miR-17-5p/20a	Yüksek ekspresyon seviyesi	Hücre proliferasyonu ve apoptoz	Tümör boyutu
miR-100	Düşük ekspresyon seviyesi	Tümör gelişimi, invazyon ve metastaz	Lenf nodu metastazı
miR-125b	Yüksek ekspresyon seviyesi	Hücre proliferasyonu ve hücre göçü	Tümör boyutu, TNM evresi ve kötü prognosis
miR-145	Düşük ekspresyon seviyesi	Hücre göçü ve anjiyogenez	Tümör invazyonu ve metastaz
miR-199a-5p	Yüksek ekspresyon seviyesi	Hücre göçü	Tümör boyutu, TNM evresi ve lenf nodu metastazı
miR-302	Düşük ekspresyon seviyesi	Hücre göçü	Metastaz ve prognosis
miR-506	Düşük ekspresyon seviyesi	Anjiogenez ve EMT	Kötü prognosis
miR-940	Yüksek ekspresyon seviyesi	Hücre göçü	Kötü prognosis

2.3.2.4. Long-noncoding RNA Ekspresyon Seviyelerinin Değişimi

LncRNA'lar, 200 nükleotitten daha uzun olan ve protein kodlama potansiyeline sahip olmayan bir transkript grubudur (Li ve ark., 2016). LncRNA'lar genellikle nükleusta gen transkripsiyonunu ve mRNA olgunlaşmasını modüle etmekte iken sitoplazmada ise RNA stabilitesini ve mikroRNA aktivasyonunu etkilemektedirler (Li ve ark., 2016). Son yıllardaki çalışmalar ile LncRNA'ların epigenetik düzenlenmeleri ile tümör hücrelerinin transkripsiyon ve translasyon sürecinde ve diğer fizyolojik aktivitelerinde rol oynadığı belirlenmiştir. LncRNA moleküllerinin hücrelerin gelişimi sırasında farklı patolojik süreçlerde rol oynadıkları çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir. LncRNA'ların kanser biyolojisindeki rolü geniş çapta çalışılmaktadır (Tablo 5). Çeşitli kanser türlerinde LncRNA'ların hücre döngüsü, proliferasyon, apoptoz, hücre göçü, EMT, invazyon ve metastaz gibi birçok biyolojik süreçlerde etkili olduğu tanımlanmaktadır (Li ve ark., 2016). LncRNA transkriptlerinin moleküler etki mekanizması günümüzde hala tam olarak aydınlatılmamıştır ancak bu moleküllerin DNA, RNA ve proteinler ile etkileşerek çeşitli sinyal yollarında görev alarak ve tümör gelişiminde rol oynar (Sun ve ark., 2014; Şekil 27).

Tablo 5. LncRNA moleküllerinin anormal ekspresyon seviyelerinin GK gelişimindeki rolleri (Hao ve ark., 2017; Zhou ve ark., 2018).

LncRNA	Ekspresyon Seviyesi	Hücrel mekanizmalardaki rolü	Klinik özellikleri
H19	Yüksek ekspresyon seviyesi	Hücre proliferasyonu, migrasyon, invazyon ve metastaz	TNM Evresi, lenfatik metastaz ve kötü prognosis
FENDRR	Düşük ekspresyon seviyesi	Hücre göçü	İnvazyon, TNM Evresi ve kötü prognosis
ANRIL	Yüksek ekspresyon seviyesi	Hücre proliferasyonu	Tümör boyutu, TNM evresi ve kötü prognosis
HOTAIR	Yüksek ekspresyon seviyesi	Hücre göçü	invazyon, metastaz ve kötü prognosis
MALAT1	Yüksek ekspresyon seviyesi	Hücre göçü EMT	Metastaz
UCA1	Yüksek ekspresyon seviyesi	İlaç Direnci gelişimi	Kötü prognosis
PVT1	Yüksek ekspresyon seviyesi	Hücre proliferasyonu ve angiogenez	Kötü prognosis
LEIGC	Düşük ekspresyon seviyesi	Hücre proliferasyonu ve EMT	Metastaz



Şekil 27. LncRNA'ların moleküler etki mekanizması (Kazimierczyk, Kasproicz, Kasprzyk, & Wrzesinski, 2020).

GK dokularında PVT1, MALAT1, H19, HULC, HOTAIR, LEIGC, XLOC_006753 ve UCA1 LncRNA moleküllerinin anormal ekspresyon seviyelerinin hücre proliferasyonu, tümör gelişimi, migrasyon, invazyon, angiogenez, apoptoz, EMT mekanizması ve ilaç direnci gelişimi gibi biyolojik süreçlerde rol oynadıkları gösterilmiştir. PVT1, MALAT1, H19, HULC, HOTAIR, XLOC_006753 ve UCA1 GK dokularında yüksek eksprese olurken LEIGC ise GK dokularında düşük eksprese olmaktadır. GK'da PVT1'in hücre proliferasyonu ve tümör gelişiminde rol oynadığı aynı zamanda apoptozu inhibe ettiği ve ilaç direnci mekanizmasını geliştirdiği tespit edilmiştir (Zhang, Bu, Liu, Zhang & Li, 2015). MALAT1 invazyon, hücre göçü, metastaz ve EMT ile ilişkilendirilmiştir (Chen ve ark., 2017). H19'un hücre proliferasyonunu indükleyerek apoptozu inhibe ettiği tespit edilmiştir (Sun ve ark.,

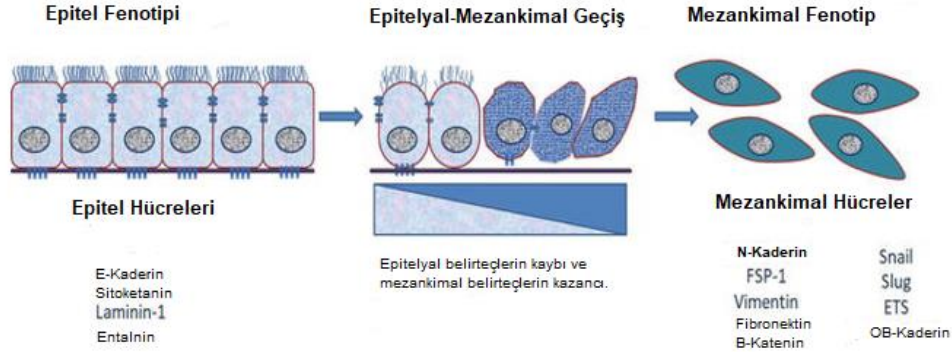
2014). HULC'un lenf nodu ve uzak metastaz duyarlılığı, invazyon ve EMT mekanizmasında rol oynadığı bildirilmiştir (Xian, Zhuo, Sun, Liang & Zhao, 2018). HOTAIR'ın metastaz ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2016)). LEIGC GK'da tümör büyümesi, hücre proliferasyonu, göç, invazyon ve EMT mekanizması ile ilişkilendirilmiştir (Han ve ark., 2014). XLOC_006753 PIC3K/Akt/mTOR sinyal yolağını aktive ederek GK hücrelerinde çoklu ilaç direncinin gelişmesini ve hücre çoğalmasını desteklemektedir ve aynı zamanda metastaz, TNM evresi ve tümör boyutu ile ilişkili bulunmuştur. LncRNA SNHG16 GK'larda kötü prognozla ilişkilendirilmiştir ve GK'larda yüksek eksprese olduğu tespit edilmiştir (Yang & Wei, 2019). UCA1'in yüksek ekspresyonunun, Cis tedavi sonrası mesane kanseri hücresi canlılığını önemli ölçüde arttırdığı ve meme kanseri hücrelerinde Adriamisin direncini indüklediği tespit edilmiştir. UCA1'in anormal ekspresyon seviyesinin MDR mekanizması ve GK'lı hastaların klinopatolojik özellikleri ile de ilişkili olduğu gösterilmiştir (Fang, Chen, & Zhi, 2016).

2.4. Gastrik Kanser Agresifliğine Sebep Olan Moleküler Mekanizmalar

2.4.1. Epitelyal–Mezenkimal Geçiş Mekanizması

Epitel hücreler apikal-bazal polarite ve bitişik hücreler ile olan etkileşimlerini sıkı bağlantılar ve dezmozomlar aracılığıyla korumaktadır. Mezenkimal hücreler ise apikal-bazolateral polarite ve bitişik hücrelerden ayrılan bazal laminaya sahip değildir bu yüzden hücre dışı matriksinde birbirinden ayrılmaktadırlar (Ribatti, Tamma & Annese, 2020). Epitelyal mezenkimal geçiş mekanizması (EMT), epitel hücrelerin gelişmiş göç kapasitesi içeren mezenkimal fenotipe dönüşmesini sağlayan çoklu biyokimyasal değişiklikleri içeren biyolojik bir süreçtir (Kalluri & Weinberg, 2009; Şekil 28). Bir EMT'nin tamamlanması, altta yatan bazal membranın bozulması ve ortaya çıktığı epitel tabakasından uzağa göç edebilen bir mezenkimal hücre fenotibinin oluştuğunun göstergesidir (Kalluri & Weinberg, 2009). EMT embriyonik gelişim sırasında, doku rejenerasyonu, yara iyileşmesi ve organ fibrozu sırasında meydana gelmektedir (Roche, 2018). Doku onarımı, doku fibrozu, invazyon ve metastaz gibi biyolojik süreçlerde yer alan mezenkimal hücrelerin kökenleri tam olarak anlaşılamamıştır (Huang, Wu & Xu, 2015). Tümörler, mikroçevre içeren tümör stroması, malign hücrelerden oluşur (Huang ve ark., 2015). Tümör hücrelerinin mikroçevresi incelendiğinde, EMT, embriyogenez ve diğer bazı patofizyolojik

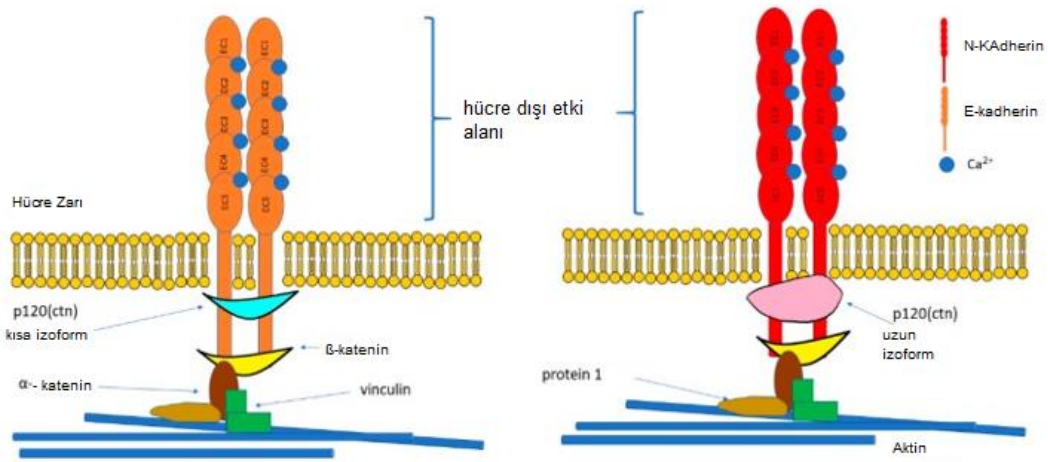
süreçler, tümör oluşumu ve ilerlemesi için kritik olan oldukça korunmuş ve temel bir süreçtir (Kalluri & Weinberg, 2009).



Şekil 28. Epitelyal fenotipten mezenkimal fenotipe geçiş sırasında epitelyal belirteçlerin kaybı ve mezenkimal belirteçlerin kazanımı (Eskiizmir & Özgür, 2018).

Kaderinler, Ca^{2+} bağımlı adezyon mekanizmasında rol oynayan hücre yüzey molekülleridir. Kaderinler hücre-hücre adezyonun, embriyogenez ve farklılaşma süreçlerinin düzenlenmesinde rol oynarlar (Loh ve ark., 2019). Epitel hücreleri, dezmozomlar ve E-kaderinin baskılanması gibi hücre-hücre bağlantılarının ayrılmasının ardından mezenkimal özellikler kazanır ve mezenkimal geçiş mekanizmasını aktive eder. Mezenkimal geçiş sırasında, E-kaderinin bölünmesi, yapışma bağlantılarının kararsızlaşmasına ve katenin'in hücre çoğalması için bir transkripsiyon aktivatörü olarak işlev görmesine yol açar. E-kaderin, kanser hücrelerinde EMT sırasında aşağı regüle edilirken, N-kaderin yukarı regüle edilir ve bu "kaderin değişikliği", düşük hasta sağkalım oranına yol açan oldukça agresif, hücre göçü ve istilacı özelliklerle ilişkilidir (Şekil 29). E-kaderin ayrıca SNAIL, SLUG, TWIST ve ZEB1 gibi transkripsiyon faktörlerini baskılayarak EMT geçişinde önemli bir rol oynar. Bu faktörler, epitel hücrelerinin mezenkimal fenotip kazanmasına sebep olur (Shenoy, 2019). Çinko parmak transkripsiyon faktörü, ZEB1 ve ZEB2 proteinlerinden oluşan ZEB ailesinin bir parçasıdır. Transkripsiyon faktörü ZEB1, embriyogenez, transkripsiyonel süreçler, metastaz, istila ve EMT mekanizması önemli ölçüde ilişkilendirilmiştir. SNAIL 1, SNAIL 2 (SLUG) ve SNAIL3 'den oluşan SNAIL aile üyeleri, yüksek ölçüde korunmuş ilaç direnci, tümör nüksetmesi ve metastazı önemli ölçüde destekleyen E-kaderinin transkripsiyonel baskılayıcısı olarak görev yapan protein ailesidir (Wang, Shi, Chai, Ying, & Zhou, 2013). TWIST,

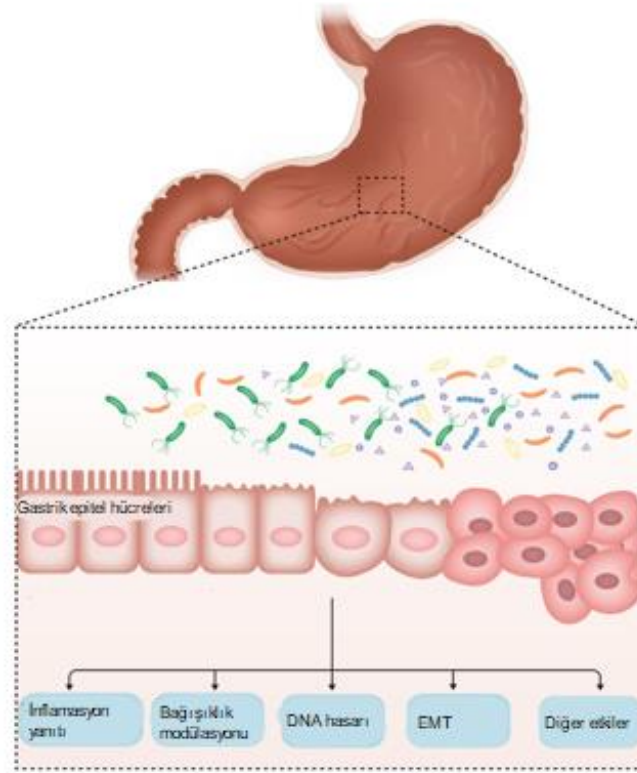
embriyonik gelişimin birçok aşamasında temel rol oynayan, tümör gelişimi ve nüksüne, önemli ölçüde katkıda bulunan temel bir sarmal-ilmek-sarmal transkripsiyon faktörüdür. TWIST çeşitli tümörlerde yüksek eksprese edilmektedir ve bu yüksek ekspresyon seviyesi kanserin metastaz oluşumunda önemli bir süreç olan EMT'nin indüklenmesine neden olmaktadır (Zhu, Ma, Wang, Song, & Lv, 2016). Yapılan çok sayıda çalışmada, TWIST'in moleküller hedeflenmesinin tümör büyümesini önemli ölçüde engellediğini, tümör metastazını kısıtladığını, ilaç direncini tersine çevirdiğini ve böylece hastaların sağ kalımını artırdığı gösterilmiştir (Zhu ve ark., 2016).



Şekil 29. E-kaderin ve N-kaderin yapısı (Loh ve ark., 2019).

İnvazyon, migrasyon, metastaz ve vasküler proliferasyon GK progresyonu ve prognozu ile ilişkilendirilmiştir (Zhang, Song, Yang & Wu, 2018). GK'da erken tanı ve etkili tedavi stratejileri geliştirmek için bu mekanizmaların ortaya çıkarılması çok önemlidir. EMT'nin uyarılması, tümör agresifliği, tedaviye direnç ve hücreler için istilacı bir fenotip oluşturma ile ilişkilendirilmiştir (Mani ve ark., 2008). EMT, GK dahil olmak üzere birçok kanser türünde büyük ölçüde tümör agresifliği ile ilişkilidir ve sıklıkla tümör nüksü ve metastaz ile bağlantılıdır (Şekil 30). EMT'nin moleküler mekanizması, hücre sinyal ağlarındaki ve hücre iskeletindeki anormallikler ile aydınlatılmıştır. EMT'nin ayırt edici özelliği, epitel yüzey belirteçlerinin E-kaderin kaybı ve N-kaderin artışı ile mezenkimal fenotip kazanmasıdır (Mani ve ark., 2008). E-kaderin aşağı regülasyonu, hücreler arası teması bozar ve E-kaderin N-kaderinin geçişi, hareketlilik ve göç için kritik öneme sahiptir. GK'da E-kaderinin azalması ve ZEB1, SNAIL, TWIST, N-kaderin'in artması EMT'nin en önemli belirteçleridir ve bu

moleküllerin ekspresyon seviyelerinin tersine dönmesinin tümörün ilerlemesini engelleyeceği ve onları kemoterapötiklere duyarlı hale getirebileceği öngörülmektedir. Bu nedenle mezenkimal geçişin inhibisyonunu sağlayan yeni tedavi moleküllerinin geliştirilmesinin GK tedavisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Serrano-Gomez, Maziveyi & Alahari, 2016).

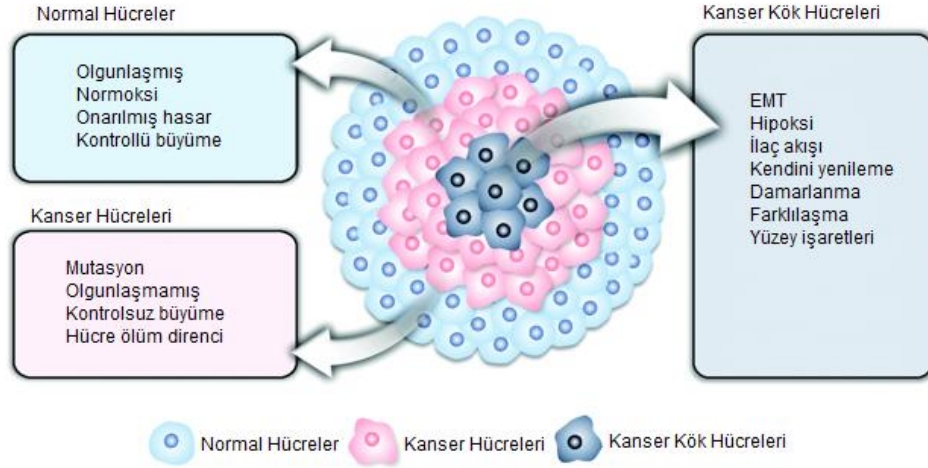


Şekil 30. GK'da EMT mekanizmasının indüklenerek mezankimal fenotipin kazanılması (Yang, Zhou, Liu, Ling, & Ji, 2021).

2.4.2. Kanser Kök Hücrelerinin Varlığı

Kanser Kök Hücreleri (CSC), kendi kendini yenileme, farklılaşma ve tümör hücrelerini üretme ve metastatik potansiyeli sürdürme gibi yetenekleri olan tümör hücreleri içerisinde yer alan alt popülasyon grubudur (Yu, Pestell, Lisanti & Pestell, 2012; Şekil 31). Kök hücrelerin varlığının kanser gelişimiyle ilişkisi, Lapidot ve ark.'nın akut myeloid lösemi hastalığına sahip bağışıklığı yetersiz farelerde myeloid lösemi geliştiren hücrelerin $CD34^+/CD38^-$ yüzey belirteçlerinin yüksek ekspresyon seviyesinin ikincil lösemi geliştirme potansiyeline sahip olduğu çalışması ile gösterilmiştir (Lapidot ve ark., 1994). Tümör gelişimi CSC'lere farklılaşmış hücrelerden ya da yetişkin dokuda yerleşik olarak bulunan kök hücrelerden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. CSC'ler tümör mikroçevresinde değişikliklere neden

olan fenotipik ve fonksiyonel görünümünü değiştiren yüksek bir plastisite sergilerler (Lapidot ve ark., 1994). Bu değişiklikler yaşlanmış tümör hücreleri veya tedavi sürecinde uygulanan kemo-radyoterapötikler tarafından indüklenir. Tüm bu etkiler akciğer, mide, karaciğer, meme ve kolorektal gibi en ölümcül katı tümörlerde, tümör nüksü ve metastazına neden olur (Lapidot ve ark., 1994; Yu ve ark., 2012).

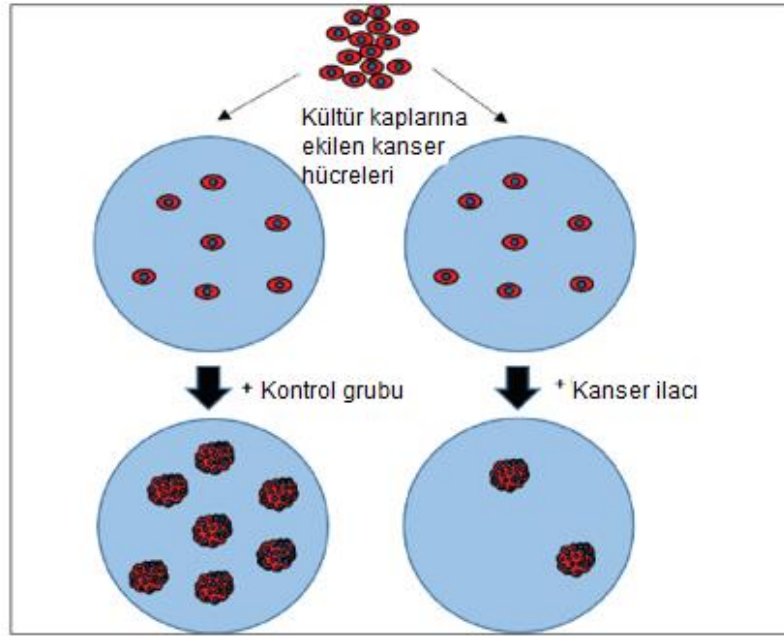


Şekil 31. CSC ve sahip olduğu fonksiyonel özellikler (Han ve ark., 2020)

GK'da ilaç direnci, metastaz ve nüks gelişimi gibi biyolojik süreçlerde GK kök hücreler (GCSC'ler) önemli rol oynamaktadır. Bu GCSC'ler aynı zamanda GK'da tümör kütlelerini oluşturan farklılaşmış hücrelerin kökenini oluşturmaktadırlar. Normal kök hücrelerde kendini yenileme mekanizmaları sıkı bir şekilde düzenlenir. Ancak GCSC'lerde kendini yenileme mekanizmaları önemli ölçüde düzensizdir. Bu süreçte bir dizi mutasyonlar ve Wnt/ β -Katenin, Hedgehog, Notch, Nükleer faktör kappas gibi birçok sinyal yolağı etkili olmaktadır. GK'da CSC'leri karakterize eden *CD133*, *CD44*, *CD90*, *Lgr5*, *ALDH1* gibi hücre yüzey biyobelirteçleri, *OCT4*, *NANOG* ve *SOX2* gibi transkripsiyon faktörleri ve epigenetik mekanizmalarla ilişkili birçok miRNA ve LncRNA'nın kullanıldığı biyobelirteçler tanımlanmıştır. Bu biyobelirteçler tanı, tedavi ve prognoz ile önemli ölçüde ilişkilendirilmiştir (Lapidot ve ark., 1994; Yu ve ark., 2012). Bu nedenle tedavide GCSC'leri hedef almanın, tümörün nüksünü engellemek için önemli bir yaklaşım olacağı öngörülmektedir. Ayrıca GCSC belirteçlerinin kullanılması ilaç adaylarının GCSC durumu üzerindeki etkinliklerinin değerlendirilmesinde faydalı olabilecektir.

2.4.3. Koloni Oluşturma Yeteneği

Koloni oluşturma, in-vitro hücre kültürü koşullarında tek bir hücrenin koloniye dönüşme yeteneğini ve bir hücrenin süresiz olarak çoğalma yeteneğini belirleyen bir analizdir (Franken, Rodermond, Stap, Haveman & van Bree, 2006; Munshi, Hobbs M. & Meyn, 2015). Koloni en az 50 hücreden oluşacak şekilde tanımlanır ve büyük bir koloni oluşturmak için hücreler bölünme kabiliyetini korur. Bu analiz temel olarak popülasyondaki her hücreyi "sınırsız" bölünme yeteneği açısından değerlendirir. Koloni oluşturma analizi, ilk olarak iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalan tedaviden sonra hücre bölünme yeteneğini ve hücre ölümünü belirlemek için tercih edilen bir yöntem olmuştur, ancak günümüzde diğer sitotoksik ajanların etkinliğini belirlemek için in vitro analizlerde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Şekil 32). İn-vitro koşullar altında hücre kültür kaplarında büyüyen birçok adherent hücre hattı için hayatta kalma eğrileri oluşturulmuştur. Hücre hayatta kalma eğrisi, kullanılan ajanın dozu ile çoğalma yeteneklerini koruyan hücrelerin fraksiyonu arasındaki ilişki olarak tanımlanır (Franken ve ark., 2006; Munshi ve ark., 2015).



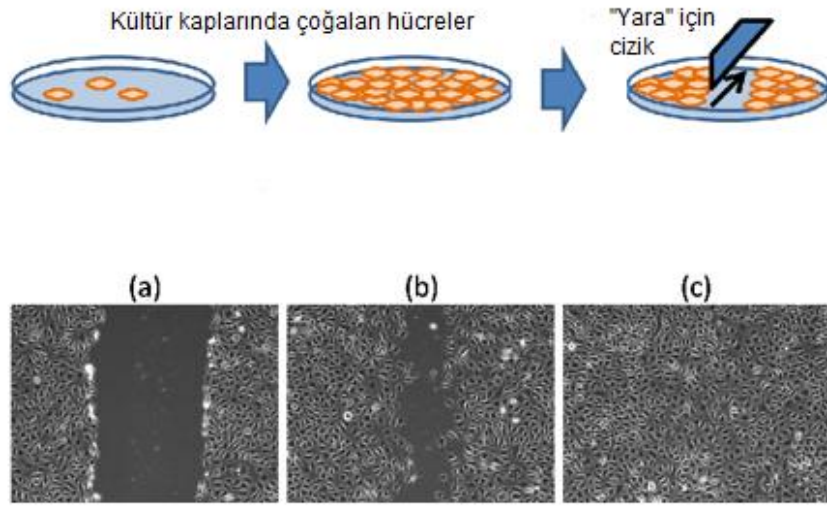
Şekil 32. Kemoterapötik ajanların sitotoksik etkisinin koloni oluşturma analizi ile araştırılmasının şematize edilmiş hali.

CSC'ler, sürekli bölünme potansiyeline sahip uzun ömürlü hücrelerdir olduğu için kök hücre özelliğinin değerlendirilebilmesi koloni oluşturma yöntemi kullanılarak gerçekleştirilebilir. CSC'ler genellikle ilaç direnci ve nüks gelişimi ile ilişkidir ve bu

yüzden bir tedavinin etkinliğini analiz etmek için CSC'lerin varlığı ve koloni oluşturma yetenekleri analiz edilmesi gerekmektedir. Koloni oluşum analizi, birçok ilaç adayı molekülün ve bitki özütlerinin terapötik amaçlı hücre agresifliğinin baskılanmasına yönelik kullanıldığı çalışmalar giderek yaygınlaşmıştır. Aynı zamanda bu analiz, ilaç adayı moleküllerin CSC'lerin sınırsız bölünme yeteneğinin baskılayarak agresifliğinin test edilmesine olanak vermektedir (Franken ve ark., 2006; Munshi ve ark., 2015). Koloni oluşum analizi, kötü prognoz ile karakterize olan GK'larda ilaç adayı moleküller veya bitkisel özütler ile tedavi sonrasında, tümörler ve normal dokular arasında bu ajanlara karşı tedavi yanıtının oluşturacağı olası farklılıkların değerlendirilmesinde, hücrelerin ve CSC'lerin bölünme yeteneklerini sınırlayarak yeni tedavi moleküllerinin etkinliğinin değerlendirilmesine olanak sağlayacaktır.

2.4.4. Yara İyileştirme Yeteneğinin Analizi

Yara iyileştirme deneyi, in vitro koşullar altında hücre göçünü analiz etmek amacıyla geliştirilmiş basit, ucuz ve en eski tekniklerden biridir (Rodriguez, Wu & Guan, 2005). Yara iyileştirme deneyi ile hücreler arası bağlantıların korunarak iki boyutta hareket eden epitelyal ve endotelyal hücreler tarafından gerçekleştirilen hücre göçü analiz edilir (Rodriguez ve ark., 2005). Temel olarak bu analiz tek tabaka halinde kültür kaplarına yapışan hücrelere fiziksel veya mekanik yöntemler ile "yara" oluşturma prensibine dayanır. Oluşturulan yara alanı başlangıçta ve belirli aralıklarla görüntülenerek yara kapanma oranının analiz edilmesiyle, hücrelerin göç yeteneğinin değerlendirilmesi sağlanır (Şekil 33). Bu teknik hücre-hücre etkileşimlerinin hücre göçü üzerindeki olası etkilerinin araştırıldığı birçok çalışmada kullanılmıştır. Hücre göçü, hücrelerin tek tek veya kümeler halinde bir konumdan diğerine hareketidir. Tek hücre göçü ve toplu hücre göçü olmak üzere iki farklı hücre göçü tanımlanmıştır. Hücre göçü sırasında birçok hücrenel düzenlemeler gerçekleşmektedir. Hücre göçü embriyogenez, sinir sisteminin gelişimi, yara onarımı ve kanser hücrelerinde metastaz gelişimi gibi birçok biyolojik süreçlerde rol oynar. Bu süreçlerde hücrelerin maruz kaldıkları statik bir fenotipten hareketli bir fenotipe geçişinde EMT mekanizması yer almaktadır. Yara analizinde hücrelerin EMT mekanizmasını aktif hale getirerek yara alanına doğru hareketliliği sağladığı tespit edilmiştir (Rodriguez ve ark., 2005).

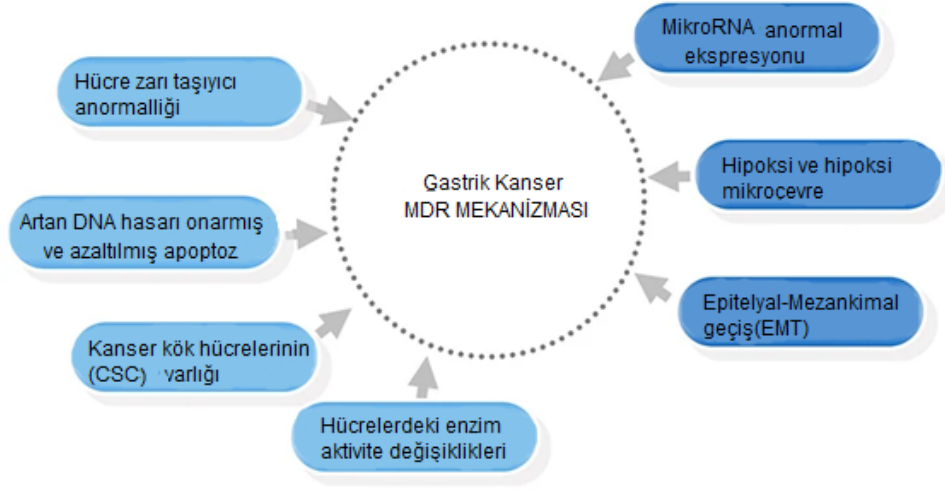


Şekil 33. Yara iyileşme sürecinin analiz edildiği örnek bir görüntü. **A:** Yara oluşturulduğu andaki hücrelerin görüntüsü. **B:** Hücrelerin yara bölgesine doğru hareket ettiği bir görüntü. **C:** Hücrelerin zamana bağlı olarak yara alanını tamamen kapatması (Bise, Kanade, Yin & Huh, 2011)

Hücre göçü, kanser dahil olmak üzere geniş bir hastalık yelpazesinde etkileri olan temel bir sorundur. Bu yüzden hücre göçünü düzenleyen hücresel mekanizmaların tam olarak aydınlatılması bu durumu baskılayan hedefli moleküllerin kanser dahil diğer sağlık sorunların çözümü için umut vadedebilir.

2.5. Gastrik Kanserlerin Tedavisinde Çoklu İlaç Direnci Mekanizmasının Gelişimi

Günümüzde ileri evre GK'larda cerrahi rezeksiyonun ardından genellikle lokal nüks gerçekleştiği için sıklıkla adjuvan kemoterapi uygulanmaktadır. Ancak kemoterapi uygulanması hastalığın seyrini iyi yönde etkiliyor olsada tedavi etkinliği oldukça başarısızdır. GK tedavisindeki başarısızlığının temel nedeni kemoterapiye karşı çoklu ilaç direncinin (MDR) gelişmesidir (Ruan, Liu, Tao & Wu, 2020). Kemoterapi ilaçlarına karşı gelişen MDR mekanizması, hücre membranında yer alan transporter proteinlerindeki anormallikler, artan DNA hasar onarımı ve baskılanan apoptoz CSC'lerin varlığı, EMT mekanizmasının aktifleşmesi, hipoksi oluşumu, miRNA ve LncRNA'ların ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler gibi birçok hücresel süreçlerin düzenlendiği moleküler mekanizmaları içeren karmaşık bir süreçtir (Ruan ve ark., 2020; Şekil 34).



Şekil 34. GK'da MDR gelişimini tetikleyen temel mekanizmalar (Huang ve ark., 2020)

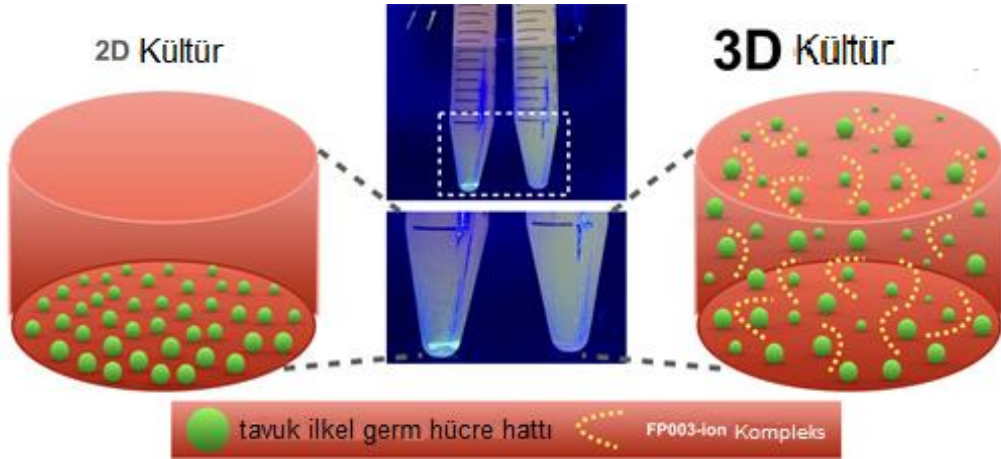
Transmembran proteinin aşırı ekspresyonu, hücre içi ilaç konsantrasyonunu azaltarak ilacın hücre içi hedeflere bağlanmasını engeller ve tümör hücrelerinin kemoterapötik ilaçlara karşı direncini artırır (Huang ve ark., 2020). Adenozin trifosfat bağlayıcı membran taşıyıcılarının (ABC-transporter), P-glikoproteininin (P-gp) ve MRP proteininin aşırı ekspresyonu MDR düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir. Bu proteinler, ilaç atılım pompaları olarak görev alır ve tümör hücrelerindeki kemoterapötik ilaçların konsantrasyonunu azaltır. GK dokularında, *MDR1* (P-gb kodlayan gen), ABCC ailesi ait MRP2, MRP4 ve MRP5 genleri anormal ekspresyon seviyesine sahiptir (Ruan ve ark., 2020). Bu anormal ekspresyon seviyesi kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Normal hücrelerde, kromatini stabilize etmek için fiziksel, kimyasal veya biyolojik hasarlar oluştuğunda DNA hasar onarım mekanizması etkinleştirilir. Günümüzde klinik uygulamalarda kullanılan özellikle 5-FU ve platin türevli ilaçlar DNA hasarı oluşturarak apoptozu indükler (Ruan ve ark., 2020). Nükleotid eksizyon onarımı kemoterapi ilaçlarının neden olduğu hasarı onarmak için kullanılan mekanizmadır. *MLH1* gibi DNA hasar onarım genleri GK'larda ilaç direnci gelişimini indükler. CSC'ler hücre döngüsünün G0 fazındadır ve kemoterapi ilaçlarının toksik etkilerine karşı direnç gösterebilirler. Bu yüzden CSC'lerde ABC taşıyıcılarının yüksek ekspresyonu, kemoterapi ilaçlarına karşı direnç gelişiminde üzerinde durulması gereken mekanizmalardan biridir. MDR ile ilişkili olan hücresel

mekanizmaların net bir şekilde aydınlatılması kemoterapötik ajanlara karşı ilaç direnci gelişimini önleyerek tedavi etkinliğinin artırılmasını sağlayabilecektir.

2.6. Tümör Boyutunun ve Tümörün Agresifliğinin 3 Boyutlu Tümör Modeli ve Ex vivo Teknik ile Belirlenmesi

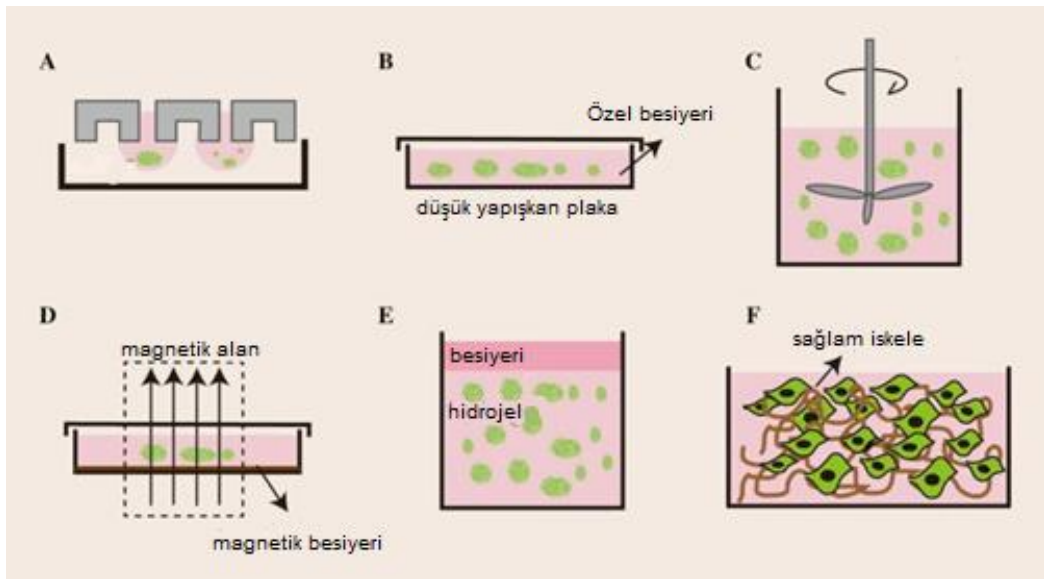
2.6.1. Tümör Boyutunun ve Tümörün Agresifliğinin Belirlenmesinde 3 Boyutlu Tümör Modelinin Oluşturulması

Geçmisten günümüze kadar ilaç geliştirme analizleri gibi birçok moleküler analizlerin gerçekleştirildiği farklı çalışmalarda hücrelerin bir tek tabakada büyüdüğü 2 boyutlu (2B) *in vitro* kültürler kullanılmaktadır (Edmondson, Broglie, Adcock & Yang, 2014; Mutlu ve ark., 2020; Sigrud & Front, 2018). 2B hücre kültürü tabanlı analizler *in vivo* analizlere göre daha basit, hızlı, tekrarlanabilir ve uygun maliyetli olmuştur (Edmondson ve ark., 2018). Ancak bu geleneksel düz ve sert substratlar üzerinde kültürlenmiş 2B hücre kültür modelleri hücre-hücre etkileşimleri, hücre dışı matriksi ve hücrelerin fizyolojik ortamını tam mimik edemediği için bazı sınırlayıcı yönleri olmuştur (Edmondson ve ark., 2014; Mutlu ve ark., 2020; Sigrud & Front, 2018). Bu yüzden hücre biyolojisi analizlerinde hücrelerin moleküler mekanizmalarının net bir şekilde aydınlatılmasında yetersiz olmaktadır. Üç boyutlu (3B) tümör modelleri, *in vitro* koşullarda kanser hücrelerinin biyolojik davranışlarını ve hücrelerin doğal mikro çevresini daha doğru bir şekilde mimik ederek *in vivo* koşulları daha iyi bir şekilde yansıtmak için geliştirilmiş yöntemdir (Alzeeb, Metges, Corcos & Jossic-Corcos, 2020; Chen ve ark., 2018). 2B hücre kültür modelleri sadece kısıtlı şekilde hücre temasına sahiptir ancak 3B hücre kültür modelleri birbirleri ve alt tabaka ile daha fazla etkileşim halinde olarak *in vivo* analizlere daha benzer ortamı taklit etmiş olur (Şekil 35). 3B hücre kültürü sistemleri, fizyolojik olarak hücrenin mikroçevresine uygun daha doğru bilgiler elde edilmesini sağladığı ve *in vivo* için daha öngörülebilir veriler elde edilmesini sağladığı için son zamanlarda ilaç keşfi ve doku mühendisliği çalışmalarında oldukça sık kullanılmaktadır (Alzeeb ve ark.,2020; Chen ve ark., 2018; Edmondson ve ark., 2014). Bu teknik ilk olarak Sutherland ve ark. tarafından sferoid bazlı analizler tümör büyümesi, göç, istila, tümör anjiyogenezi ve ilaca duyarlılığın incelenmesi amacıyla kullanılmıştır (Wang, 2016).



Şekil 35. 2B ve 3B hücre kültür modellerinde hücre-hücre etkileşimler arasındaki farkın gösterimi (Chen ve ark., 2018)

İdeal 3B hücre kültür modelleri hücrelerin çoğalabileceği, toplanabileceği ve farklılaşabileceği dokuya özgü fizyolojik mikro ortamı mimik eden yapıda olmalıdır (Sigrid & Front, 2018). Böylece bu modeller ile hücre-hücre etkileşimleri hücre dışı makriks ile etkileşimler, dokuya özgü sertlik, oksijen, besin ve metabolik atık gradyanlarını oluşturan dokuya benzer yapıyı sağlayabilecektir. 3B hücresel büyümeyi oluşturabilmek için genellikle matrisler ve iskeleler olarak adlandırılan destekleyici yapılar üretilmiştir (Chen & Wang, 2020). 3B hücre kültür modelleri, sferoidler ve hücre kültürü yapı iskelelerinde bağımlı şekilde olmak üzere temelde iki farklı şekilde oluşturulabilir (Chen & Wang, 2020; Şekil 36).



Şekil 36. 3B hücre kültür oluşturma yöntemleri (Chen & Wang, 2020).

3B hücre kültürü modelleri kullanılması diğer kanser türlerinde olduğu gibi GK çalışmalarına da farklı bir bakış açısı kazandırmıştır. GK hücre hatları kullanılarak geliştirilen 3B hücre kültür modellerinde, kök hücrelerde eksprese edilen transkripsiyon faktörü SOX2, CD44 ve E-kaderin ekspresyon seviyelerinde 2B hücre kültür analizlerine göre artış olduğu tespit edildi. Magalhães ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 3B hücre kültür modelinin miRNA üzerindeki etkisi araştırıldı ve miR29c-5p ekspresyonunun 3B modelde 2B modele kıyasla daha düşük olduğunu gözlemlendi (Magalhães ve ark., 2018). 3B hücre kültür modelleri ile fonksiyonel analizlerin gerçekleştirilmesi gen ekspresyon profillerinin araştırılması, yeni tanısal veya prognostik biyobelirteçlerin belirlenmesine ve gelecekteki bireyselleştirilmiş ilaç stratejilerinin geliştirilmesine büyük oranda katkı sağlayabilecektir.

2.6.2. Koriallontoik Zar Analizi

Genellikle terapötik ilaç olma potansiyeline sahip olduğu ön görülen maddelerin in vivo deneylerde araştırma yapılabilmesi amacıyla, tümör fare modelleri kullanılmaktadır. Fakat hayvan modelleri ile gerçekleştirilen deneyler oldukça yüksek maliyetli ve uzun süreli araştırmalardır. Ex vivo bir model olan embriyolu tavuk yumurtası koriallontoik zar (CAM) analizi in vivo hayvan modellerine alternatif olarak kullanılabilir (Ribatti, 2017; Tezcan ve ark., 2017). Bu teknik son dönemlerde kolon, prostat kanserleri ve beyin tümörleri gibi birçok kanser türünde oldukça yaygın kullanılarak daha kısa sürede daha az maliyetle potansiyel ilaç adaylarının tümör boyutu, anjiogenezi ve invazyonu üzerindeki etkilerinin araştırılmasına olanak sağlamaktadır. CAM analizi diğer in vivo yöntemlere göre farklı uygulamalarda kullanılan nispeten basit, hızlı, yüksek tekrarlanabilir ve düşük maliyetli bir modeldir. Aynı zamanda civciv embriyosu çoğu ülkede gelişimin 17. gününe kadar yaşayan hayvan olarak kabul edilmediği için, bu konuda etik kurul onayı almak idari prosedürler gerektirmemektedir (Ribatti, 2017).

CAM Assay, tümör boyutu, invazyonu, metastazi, anjiogenezi ve tümör kemoresistivitesini incelemek için yaygın kullanılan in vitro ve in vivo arasında bir tekniktir. Tümör ilerlemesi sırasındaki anjiyogenik oluşum ile ilişkili gen ekspresyon profili analizi gerçekleştirilebilmektedir. İnsan tümör dokusunun CAM üzerine eklenmesi hem insan hem de tavuk mikrodizileri ile transkriptomik analizler hem konak stroma hem de insan tümörünün gen imzalarının ayırt edilmesini sağlar. Tavuk

embriyolarının lenf sistemi 10. güne kadar iyi gelişmediği için immundefist bir ortama sahiptir ve insan dahil olmak üzere birçok farklı türe ait kültüre hücrelerin gelişebilmesi için iyi bir ortam sağlamaktadır. Gelişmekte olan tavuk embriyosunun gaz alışverişini sağlayan ekstra embriyonik zara CAM adı verilmektedir. CAM allantoik keseden klorun ve sodyumun yumurta kabuğundan kalsiyum embriyonik damarlara taşımada görev alan ekstrea embriyonik kılcal damarları içermektedir (Ribatti, 2017; Tezcan ve ark., 2017).

2.7. Kanser Tedavisinde Bitkisel Özütlere Kullanımı

Son yıllarda çeşitli kanser türlerinde yeni tedavi yöntemlerinin oluşturulmasında bitkilerin sıklıkla kullanılması yeni tedavi protokollerinin geliştirilerek mevcut protokollerin daha etkin hale getirilmesi ve sitotoksik yan etkilerin azaltılması yönünde çalışmalar devam etmektedir. Ayrıca bazı bitki ekstraktlarının kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanılmasının sinerjik veya aditive etki oluşturduğu ve kemoterapötik ajanlarının etkinliğini arttırdığı tespit edilmiştir. Böylece tedavide mevcut ajanın dozunun azaltılabileceğini ve bu ajanın neden olabileceği yan etkilerin azaltılabileceğini gösteren literatürde çalışmalar mevcuttur (Mutlu ve ark., 2020; Tezcan ve ark., 2014).

2.7.1. Olea europaea Yaprak Özütü

Türkiye'de de yetiştirilen zeytin ağacı (*Olea europaea*), Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde birçok hastalığın tedavisinde antioksidan özelliği ile geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Şekil 37). *Olea europaea*'nın yapraklarından elde edilen ekstraktlar (OLE), sekoiridoid, triperen ve flavonoidler gibi yüksek düzeyde biyoaktif bileşenler içerir (Mutlu ve ark., 2020; Tezcan ve ark., 2014). OLE'nin beyin, lösemi, kolon, melanom ve meme kanseri hücre dizilerindeki antitümöral özellikleri değerlendirilmiş ve bu bitki ekstraktının anti-proliferatif ve apoptotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Tez danışmanı ve araştırma ekibi tarafından gerçekleştirilen çalışmalar ile OLE'nin ilk kez GB hücrelerinde etkili olduğu belirlenerek patent alınmıştır. Tek başına OLE'nin GB hücrelerinde; *in vitro*, *ex vivo* ve 3B yöntemler ile tümör büyüklüğünü azalttığı, invazyon ve anjiogenez gibi özelliklerini baskıladığı, TMZ ve bevacizumab'ın etkinliğini arttırdığı ve bu süreçlerde epigenetik mekanizmalar üzerinde etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca çalışma ekibi OLE'nin en önemli

biyoaktif bileşeni olan OL'ün GB hücrelerinde antitümöral etkisini belirlemiştir (Mutlu ve ark., 2020; Tezcan ve ark., 2014). Ancak OLE'nin GK tedavisinde etkili olan moleküler mekanizmalardaki ve tedavide kullanılan kemoterapikler üzerindeki rolü bilinmemektedir.



Şekil 37. Türkiye'de de yetiştirilen zeytin ağacı (*Olea europaea*) yaprakları

Mevcut Tez Kapsamında;

OLE'nin GK hücrelerinde, tümörün agresif davranışlarını düzeltici ve ilaç direncinin kırılması yönünde etkili olabileceği ön görülmektedir. Bu öngörü doğrultusunda mevcut tez çalışması kapsamında, OLE'nin tek başına ve kemoterapi ilaçları 5-FU ve Cis ile kombinasyonlarına maruz bırakılan GK hücrelerindeki biyolojik süreçler incelenmiştir. Böylece OLE'nin GK üzerindeki etkisinin ilk kez belirlenmesi ile in vivo çalışmalar için öngörülen tedavi potansiyelinin ve etkili olabileceği hücresel mekanizmaların açıklanabilmesi amaçlanmaktadır.

Planlanan tez çalışması ile;

- OLE nin 5-FU ve sisplatin ile sinerjik etki gösterip göstermediği anlaşılacaktır.
- OLE nin GK hücrelerinin biyolojik özellikleri üzerindeki etkinliği anlaşılacaktır.
- OLE'nin GK hücrelerinde invazyon ve metastaz üzerindeki etkisi belirlenebilecektir.
- OLE'nin GK hücrelerinde EMT ve CSC belirteçleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi ile anti-proliferatif etki mekanizmasının aydınlatılmasına katkı sağlayacak ve böylece kanser tedavisine yönelik yeni çalışmalara ışık tutabilecektir.
- GK hastalarının kemoterapideki başarısızlığının sebebi olan MDR'de OLE'nin etkinliğinin belirlenmesi ve GK kemoterapisine yeni bir tedavi yaklaşım oluşturulması sağlanacaktır.
- OLE'nin GK hücrelerinde epigenetik mekanizmalar (LncRNA) üzerindeki etkisi ortaya konulabilecektir.

Böylece elde edilecek anlamlı bulgular sonucunda, günümüz tedavi protokollerinde uygulanan ilaçlara direnç gösteren ve kötü prognoz gösteren GK tümörlerinin tedavisinde sitotoksik etkisi daha az ve daha efektif olan tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlanabilecektir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Dulbecco's modification of Eagle medium (DMEM) (Sigma Aldrich, ABD)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Biological Industries, ABD)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma Aldrich, ABD)

Sodium Pyruvate (Merck Biochom, Almanya)

Penicillin-Streptomycin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD)

Trypsin EDTA (%0.25), fenol red (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD)

5-Fluorourasil (Sigma Aldrich, ABD)

Cisplatin (BioVision, ABD)

Cell Proliferation Reagent WST-1 kit (Boster, ABD)

Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC (Invitrogen™, ABD)

L-Glutamin (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ABD)

Ribodamin 123 (Sigma, Aldrich, ABD)

CellMAX™ Colonogenic Assay Kit (BioPioneer, ABD)

PerkinElmer'in CellCarrier Spheroid (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Taqman Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific, ABD)

TaqMan Non-coding RNA Assay (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD)

Taqman Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Hanging Drop System (PerkinElmer, ABD)

Transwell Migration Assay (Thermo Fisher Scientific, ABD)

CytoSelect 24-well Wound Healing Assay Kiti (Fluorometric) (Boivison, ABD)

EZCell Cell Invasion Assay Kit (Boivison, ABD)

EZCel Cell Migration/Chemotaxis Assay Kit (Boivison, ABD)

Multidrug Resistance Assay Kit (Fluorometric) (Sigma Aldrich, ABD)

%95'lik Ethanol (Sigma Altrich, ABD)

Methanol (Sigma Altrich, ABD)

İzopropanol (Sigma Altrich, ABD)

TRIZol Reacent (Termo Scientific, ABD)

Agoraz (Nonza, İŖviçre)

Etidyum Bromür (Amresko, ABD)

DNA Jel Loading Solüsyon (Thermo Scientific, ABD)

DNA Leader (Gibco, Thermo Scientific, ABD)

Zymo RNA Isoltion Kit (Zymo Research, ABD)

Tris Base Buffer (Multicell, Wisent Bio Products, Kanada)

Boric Asit (Multicell, Wisent Bio Products, Kanada)

Edta (Multicell, Wisent Bio Products, Kanada)

HS Prime Premix (GeNET Bio, Kore)

Multi HS Prime Premix (GeNET Bio, Kore)

Exprime Taq Premix (GeNET Bio, Kore)

Dye Labeled Oligos (Bio-Synthesis, ABD)

DNA Size Standard Kit 600bp (Beckman Coulter, ABD)

GenomeLab Separation Buffer (Beckman Coulter, ABD)

Separation Gel LPAI (Beckman Coulter, ABD)

Sample Loading Solution (Beckman Coulter, ABD)

RNeasy FFPE Kit (Qiagen, Hollanda)
High Pure RNA Isolation Kit (Roche, İsviçre)
High-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD)
SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD)
QuantiTect Primer Assays (Qiagen, Hollanda)
QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hollanda)
Dimetil Sülfoksit (Sigma Aldrich, ABD)
HCl (Sigma Aldrich, ABD)
Paraformaldehit (Sigma Aldrich, ABD)
Gluteraldehit (Sigma Aldrich, ABD)
Tripan Blue (Thermo Fisher Scientific, ABD)

3.1.2 Kullanılan Aletler ve Cihazlar

Santrifüj (Nüve, Türkiye)
Soğutmalı Santrifüj (Labogene, Danimarka)
Soğutmalı Santrifüj (Bechman Coulter, ABD)
Mikro Santrifüj (Clever Scientific, İngiltere)
Laminal Kabin (Labogene, Danimarka)
UV Laminal Kabin (Biosan, Lethonya)
Hassas Terazî (AND, Japonya)
Vortex (Velp Scientifica, İtalya)
Vortex (Biosan, Lethonya)
UV/Vis Spektrofotometre (Beckman Coulter, ABD)
Isıtıcı Blok (Clever Scientific, İngiltere)
24 Kuyulu Çalkalayacılı Isıtıcı Blok (Biosan, Lethonya)

20 Kuyulu Isıtıcı Blok (Techne, İngiltere)
+4°C Soğutucu (Alaska, Türkiye)
+4°C Soğutucu (Asterm, Türkiye)
-20°C Derin Dondurucu (Bosch, Türkiye)
-20°C Derin Dondurucu (Vestel, Türkiye)
-80°C Derin Dondurucu (Nüve, Türkiye)
-150°C Derin Dondurucu (Panasonic, Japonya)
Yatay Elektroforez (Biorad, ABD)
Yatay Elektroforez Jel Sistemi (Maxicell, ABD)
UV Görüntüleme Cihazı (Vilber, Fransa)
Mikrodalga Fırın (White - westinghouse, ABD)
Etüv (Ecocell, Almanya)
CO2 İnkübatör (Panasonic, Japonya)
Profilex PCR Sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Thermal Cycler (Biorad, ABD)
Light Cycler 482 Real Time PCR (Roche, İsviçre)
Step One Plus Sistem Real- Time PCR (Applied Biosystem, ABD)
Otomatik DNA Dizi Analizi Cihazı (Beckman Coulter, ABD)
Multi mod Reader (Berthold Technologies, ABD)
Işık Mikroskobu (Olympus, Japonya)
Inverted Mikroskop (Labomed, ABD)
Fluoroskan Microplate Fluorometer (Thermo Fisher, ABD)
Flow Sitometri (Beckman Coulter, ABD)

Multipipet (Boeco, Almanya)

0.5-10 μ l Pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

10-100 μ l Pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

20-200 μ l Pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

100-1000 μ l Pipet (BrandTech Scientific, İngiltere)

Pipet Controller (Acumax, Hindistan)

3.2. Yöntem

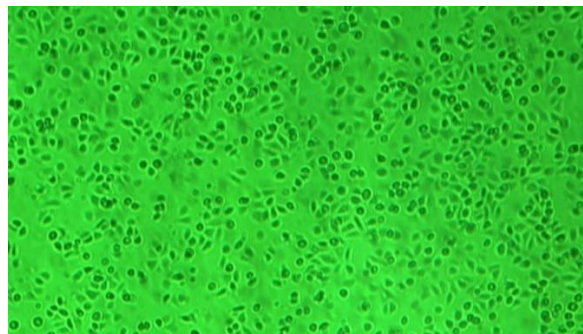
OLE ve Kemoterapötik Ajanların Gastrik Kanser Hücrelerine Tedavi Edici Potansiyelinin ve Biyolojik Davranışları Üzerine Olan Etkisinin Araştırılması

OLE ve kemoterapötik ajanların (5-FU ve Cis) tek başına ve kombin halinde verilerek, GK hücrelerinin canlılığı ve ölümü üzerine olası etkileri (WST-1 analizi ve Annexin V yöntemi ile), tümör hücrelerinin agresifliğini baskılama üzerine olası etkileri [yara iyileşmesi ve koloni oluşumu gibi fonksiyonel analizi ile, EMT (*TWIST*, *SNAIL*, *ZEB1*, *N-Kaderin* ve *E-Kaderin*) ve kök hücre (*CD133*, *NANOG*, *SOX2*, *OCT4*) varlığına etkileri ekspresyon analizleri ile, tümör büyüklüğü ve damar gelişimine etkileri (3B hücre kültürü ve ex vivo teknikler ile)] hücrelerde gelişen tedavi direncinin kırılması üzerine olası etkileri [MDR mekanizmasında görev alan genlerin (MDR1, MRP, LRP1) ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi ile] ve bu biyolojik süreçlerde görev alan epigenetik mekanizmalar üzerine olası etkileri (LncRNA *PVT1*, *MALAT1*, *H19*, *HULC* ve *SNHG16* ekspresyon durumlarının analizi ile) değerlendirildi.

3.2.1. *İn-vitro* Analizler

3.2.1.1. Hücre Hattının Temini

Mevcut tez çalışması doğrultusunda planlanan deneysel süreçler GK hücre hattı olan AGS üzerinde gerçekleştirildi (Şekil 38). American Type Culture Collection (ATCC)'den, ATCC CRL-1739 kodlu AGS hücre hattı satın alındı. Bu çalışmada kontrol olarak kullanılan Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) hücre hattı Anabilim Dalı stoklarımızdan temin edildi. AGS ve HUVEC hücre hatlarının özellikleri Tablo 6 'da gösterilmiştir.



Şekil 38. Deneysel süreçlerin gerçekleştirildiği AGS hücre hattının morfolojisi

Tablo 6. Mevcut tez çalışmasında kullanılan hücre hatlarının özellikleri (Mita ve ark., 2009; Zheng, Fu, Shen, Liu & Wang, 2021).

Hücre Hatlarının Sahip Olduğu Özellikler		
	AGS	HUVEC
Organizma	İnsan	İnsan
Doku	Mide Adenokarsinoma	Göbek Bağı
Hastalık	GK	Normal
Yaş	54	Yeni Doğan
Cinsiyet	Kadın	Kadın
Morfoloji	Epitel	Epitel
Büyüme Özellikleri	Yapışkan	Yapışkan
İlaç Direnci	Dirençsiz	Dirençsiz
HER2 Pozitifliği	Negatif	-
Kras Kodon 2 Mutasyonu	Pozitif	-

3.2.1.2. OLE ve Kemoterapötik Ajanların Temin Edilmesi ve Hazırlanışı

Kale Naturel (Edremit, Balıkesir) tarafından içerdiği %15 oleuropein miktarı, stabilitesi ve mikrobiyolojik saflığı kontrol edilerek OLE (05.06.2007,10-00014-00015-0) hazırlandı ve ücretsiz olarak temin edildi. *Olea europaea* cv türünün yaprakları Balıkesir Edremit bölgesinden, budama mevsimi olan Şubat ayında budanan dallardan toplanarak yıkandı ve gölgede kurutuldu. Böylece ilk filizlerini Şubat ayında veren *Olea europaea* 'nın budanan dallarının araştırmamızın sonuçlarını olumsuz yönde etkileyecek olan pestisit ve herbisit gibi kimyasal maddeleri içermesi ihtimali ortadan kaldırıldı. Karanlık ve oda sıcaklığında bir ay boyunca kurutulan yapraklar bitki değirmeninde toz haline getirildi ve %80 etanol ile muamele edilerek oda sıcaklığında bekletildi. *Olea europaea*'nın etken maddesi oleuropeinin yapısının bozulmasını önlemek amacıyla etanol ekstresinin etanolünü, en fazla 55°C olacak şekilde düşük ısı ve alçak basınca sahip Spray Dryer sisteminde uçurularak, özüt toz haline getirildi. Tez çalışması kapsamında analizlerimizde değerlendirilen kemoterapötik ajan 5-FU (Sigma Aldrich) geçmiş çalışmalar doğrultusunda toz hali ticari olarak satın alınmış olduğundan Anabilim Dalımızın stoklarından temin edildi. 50 mg toz halindeki 5-FU 1 ml DMSO'da çözdürülerek ana stok hazırlandı. Diğer bir kemoterapötik ajan Cis ise toz formunda ticari olarak (1550-100, Cisplatin-100 mg, BioVision) satın alındı.

3.2.1.3. Kültür Ortamının Optimize Edilmesi ve Hücrelerin Çoğaltılması

ATCC'den ticari olarak satın alınan AGS hücre hattı kryo tüp içerisinde soğuk zincir olarak Anabilim Dalımıza ulaştırıldı. AGS hücreleri %10 oranında fetal bovine serum (FBS), %1 Antibiotic/Antimycotic solution, 2 mM L-glutamin ve 1 mM sodium pyruvate içeren Kaighn's Modification of Ham's F-12 Medium (F-12K Medyum)'dan oluşan besiyeri ile 15 ml falkonlara aktarıldı ve 1200 rpm' de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant ve pelet oluşumu sağlandıktan sonra, süpernatant kısmı dökülerek hücrelerin üzerine 1 ml F-12K Medyum ilave edildi ve homejinasyonu sağlamak amacıyla pipetaj yapıldı. 5 ml F-12K Medyum T25 cm² boyutundaki filtreli flaska koyuldu ve üzerine homojen haldeki hücreler aktarıldı. %5 CO₂ ve 37°C sıcaklığa sahip inkübatörde hücreler çoğalmaya bırakıldı. Anabilim Dalı stoklarımızdan temin edilen HUVEC hücre hattı ise -150°C'deki derin dondurucudan çıkarılarak 37°C su banyosunda çözündürüldü. Ardından %10 oranında FBS, %1 penisilin-streptomisin, 2mM L-glutamin ve 1mM sodium pyruvate içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium-F12 (DMEM-F12) besiyeri kullanılarak AGS hücreleri ile aynı yöntemle uygun kültür kaplarında 37°C sıcaklık ve %5 CO₂'lik inkübatörde hücrelerin çoğalması beklendi.

3.1.2.4. Hücrelerin Takibi ve Pasajlanması

Bir hafta boyunca her gün hücrelerin doluluk oranı takip edildi ve gerektiğinde besiyeri değişikliği gerçekleştirildi. T25 cm² lik filtreli flasklardaki AGS ve HUVEC hücrelerinin yoğunluğu %80-90 doluluk oranına ulaştığında pasaj yapıldı. Kültür kabındaki 5 ml besiyeri pipet yardımı ile atık çöpü içerisine boşaltıldı. Ardından üzerine 2 ml fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) ile hücreleri yıkama işlemi gerçekleştirildi ve PBS uzaklaştırıldı. Hücrelerin tutundukları flask yüzeyi ile arasındaki adherent bağlantıyı koparmak için üzerine 2 ml 1X Tripsin-EDTA (%0.25 tripsin 1 mM EDTA) eklendi ve 5 dk boyunca 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletildi. 5 dk sonunda hücreler inverted mikroskobu ile kontrol edildi ve hücreleri flask yüzeyinden kaldırıldıktan sonra her bir flaskın içerisine sırasıyla F-12K Medyum ve DMEM-F12 4 ml olacak şekilde ilave edildi. Elde edilen hücre süspansiyonları 15 ml'lik falkonlara aktarıldı ve 1.200 rpm 'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine 1 ml besiyeri ilave edilerek pipet yardımıyla pipetaj uygulanarak homojen hale getirildi. Homejen haline getirilen

hücreler sayılarak yoğunluklarına göre flasklara ekildi ve 37°C sıcaklık ve % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

3.2.1.5. Hücre Sayımı

Pasajlama uygulaması esnasında canlı ve ölü hücrelerin birbirinden ayırt edilmesinde kullanılan negatif yüklü 'Trypan Blue' (%0,4'lük) boyası ile hücre sayımı gerçekleştirildi. Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler santrifüj işleminden sonra süpernantant kısmı atılıp kalan pelet üzerine 1 ml besiyeri ilave edildi ve pipetaj yapılarak homojen karışım oluşturuldu. 15 ml'lik falkon içerisindeki hücrelerden pipet yardımı ile 10 µl çekilerek steril eppendorfa aktarıldı. Ardından 90 µl Trypan Blue boyası üzerine eklenerek pipetaj yapılarak 2-3 dk oda sıcaklığında bekletildi. Elde edilen karışım üzeri lamel ile kapatılacak şekilde Thoma lamına alındı. Thoma lamı ışık mikroskobu altında analiz edilerek hücre sayımı gerçekleştirildi. Hücre sayımı üç tekrarlı olacak şekilde Thoma lamı üzerindeki 16 büyük karenin içerisinde bulunan 25 küçük karenin sağ ve üst bölgelerinde çizgileri kesen hücreler sayılarak gerçekleştirildi. Sayma işleminin sonunda sayılan hücrelerin ortalaması hesaplandı ve bu sayı 10⁴ ve dilüsyon faktörü ile çarpılarak 1000 µl içerisindeki hücre sayısı belirlendi.

$$\text{Hücre Sayımı} = \text{Sayılan Hücre Sayısı} * \text{Dilüsyon Faktörü} * 10^4$$

3.2.1.6. Hücrelerin Stoklanması

Hücre stoklama işlemi; her bir hücrenin yoğunluğu % 80-90'a ulaştınca pasajlama bölümünde anlatıldığı gibi hücreler Tripsin-EDTA ile kaldırılarak hücre sayma işlemi yapıldı. Stoklanarak kaldırılacak her bir kryo tüp içerisindeki hücre sayısının 5.000.000-20.000.000 aralığında olması istendiği için 10.000.000 hücre olacak şekilde ayarlandı. Stoklanacak miktar kadar kryo tüp etiketlenerek içerisine 900 µl F-12K Medyum (içerisinde 10.000.000 hücre olan) ve 100 µl DMSO eklendi. İlk olarak kryo tüpler -20°C' ye koyularak 3-4 saat bekletildi. Daha sonra ise -150°C derin dondurucuya aktarılarak stoklama işlemi gerçekleştirildi.

3.2.2. OLE ve Kemoterapötik Ajanların Ana Stoklarının Hazırlanması ve Uygun Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

3.2.2.1. OLE Ana Stoğunun Hazırlanması ve WST-1 Analizi ile Hücre Canlılığının Belirlenmesi

OLE ana stoğu, konsantrasyonu 1g/4ml (0.25 mg/1 ml) olacak şekilde 1g OLE hassas terazi yardımıyla tartılarak 4 ml dH₂O 'da çözdürüldü. Elde edilen bu çözelti -20°C'ye kaldırılarak saklandı. Ara Stok konsantrasyonu (AR1) ise 40 µl ana stok üzerine 60 µl dH₂O eklenerek hazırlandı. WST-1 analizi için Anabilim Dalımızda daha önceki gerçekleştirilen çalışmalardaki (Tablo 7) ve Melis Mutlu'nun Yüksek Lisans tezi kapsamındaki çalışmaların gerçekleştirildiği Tübitak 118S799 nolu projesi kapsamında belirlenen OLE dozları dikkate alınarak uygun doz aralığı belirlendi (Tablo 7; Tezcan ve ark., 2014; Mutlu ve ark., 2020).

Tablo 7. AGS hücrelerine muamele edilen OLE dozları

Muamele Edilen Dozlar	AR1 OLE (µl)	F-12K Medyum (µl)
100 µg/ml	0,1	99,9
250 µg/ml	0,25	99,75
500 µg/ml	0,5	99,5
1 mg/ml	1	99
1,5 mg/ml	1,5	99,5
2 mg/ml	2	98
2,5 mg/ml	2,5	97,5
3 mg/ml	3	97

GK hücre hattı olan AGS ve HUVEC hücreleri üzerindeki OLE'nin hücre canlılığı ve proliferasyonuna etkilerinin incelenmesi amacıyla WST-1 kit protokolü doğrultusunda WST-1 analizi yapıldı. Tripsin-EDTA ile kaldırılan hücreler Thoma lamı ile sayıldı ve her bir kuyucukta 20.000 hücre olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür plakalarına ekildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücreler Tablo 7 'deki doz skalasına göre OLE dozları ile muamele edildi. 37°C'de %5 CO₂ oranını sağlayan inkübatörde 24, 48 ve 72 boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu bekleme sürelerinin sonunda her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 (Biovision, ABD) boyası eklendi. Ardından 45-60 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda canlı ve ölü hücrelerin değerlendirilmesi 460-520 nm referans dalga boyu aralığındaki Elisa Reader (Tecan, İsviçre) cihazında ölçümleri ile gerçekleştirildi. Yapılan bu deney 3

tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. Muamele edilmemiş hücreler kontrol olarak değerlendirildi ve hücre canlılığı %100 kabul edildi. Dozlanan hücre gruplarının canlılık oranları kontrol grubu ile kıyaslanarak yüzdelik değerleriyle ifade edildi.

Seçicilik indeksi (SI) analizi gerçekleştirilecek olan bileşiğin normal ve kanser hücreleri arasındaki seçiciliğini gösteren bir indekstir (Badisa, Darling-Reed, Joseph & John, 2009; Rashidi, Seghatoleslam, Namavari & Amiri, 2017). SI >1 değerinde olması durumunda analiz edilecek olan bileşiğin doz grubunun kanser hücrelerine normal hücrelerden daha fazla toksik etki oluşturduğunu göstermektedir. WST-1 analiz sonuçlarına göre aşağıdaki formül doğrultusunda SI hesaplanarak AGS hücrelerinde OLE'nin etkin dozu belirlendi.

$$SI = \frac{\text{Normal Hücrelerin IC50 Değeri}}{\text{Kanser Hücrelerinin IC50 Değeri}}$$

3.2.2.2. 5 Fluorourasil Ana Stoğunun Hazırlanması ve WST-1 Analizi

50 mg 5-FU 1 ml DMSO'da çözdürülerek ana stok hazırlandı ve +4°C 'de saklama koşulları altında saklandı. Ardından ara stok konsantrasyonları AR1 (1mM) ve AR1a (0,1 mM) hazırlandı. AGS hücre hattında muamele edilecek doz aralığı literatürde yer alan çalışmalar dikkate alınarak Tablo 8 'de belirtilen uygun doz aralığı belirlendi (Xu ve ark., 2015; Yang ve ark., 2017; Tablo 8).

$$\text{Ara Stok1 (AR1)} = 4 \mu\text{l Ana Stok} + 1496 \mu\text{l F12K Medyum}$$

$$\text{Ara Stok1a (AR1a)} = 150 \mu\text{l AR1} + 1350 \mu\text{l F12K Medyum}$$

Tablo 8. AGS ve HUVEC hücre hatlarına belirlenen inkübasyon süreleri boyunca muamele edilen 5-FU dozları

Muamele Edilen Dozlar	5-FU (μl)	F-12K Medyum (μl)
10 μM	10 μl AR1a	90 μl
25 μM	25 μl AR1a	75 μl
50 μM	50 μl AR1a	50 μl
75 μM	7,5 μl AR1	92,5 μl
100 μM	10 μl AR1	90 μl
150 μM	15 μl AR1	85 μl
200 μM	20 μl AR1	80 μl
250 μM	25 μl AR1	75 μl
300 μM	30 μl AR1	70 μl
350 μM	35 μl AR1	65 μl
400 μM	40 μl AR1	60 μl

AGS ve HUVEC hücre hatlarına 5-FU'nun hücre canlılığı üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla 3.2.2.1.'de açıklandığı şekilde yöntem uygulanarak WST-1 analizi gerçekleştirildi. AGS hücrelerinde 5-FU'nun etkin doz konsantrasyonu SI hesaplanarak belirlendi.

3.2.2.3. Cisplatin Ana Stoğunun Hazırlanması ve WST-1 Analizi

Ana stok hazırlanması amacıyla 1 mg Cis 10 ml DMSO içerisinde çözdürüldü. Elde edilen ana stok karanlık ve nemsiz bir ortamda +4 °C'de saklandı. 1000 µM konsantrasyona sahip AR1, 100 µM konsantrasyona sahip AR2 ve 10 µM konsantrasyona sahip AR3 olmak üzere 3 tane ara stok hazırlandı. AGS hücre hattı için Cis doz aralığı literatür taraması yapılarak belirlendi (Lei ve ark., 2020; Tao ve ark., 2016). Bu çalışmalar dikkate alınarak doz aralığı oluşturuldu (Lei ve ark., 2020; Tao ve ark., 2016; Tablo 9). AGS ve HUVEC hücre hatlarında Cis'in hücre canlılığı üzerine etkisi 3.2.2.1.'de açıklanan yöntem doğrultusunda WST-1 analizi uygulanarak gerçekleştirildi. SI indeksi hesaplanarak AGS hücrelerinde Cis'in etkin doz konsantrasyonu belirlendi.

$$\text{Ara Stok1 (AR1)} = 45.54 \mu\text{l Ana Stok} + 1454.55 \text{ F12K Medyum}$$

$$\text{Ara Stok2 (AR2)} = 4.5 \mu\text{l Ana Stok} + 1495.5 \mu\text{l F12K Medyum}$$

$$\text{Ara Stok3 (AR3)} = 150 \mu\text{l AR1} + 1350 \mu\text{l F12K Medyum}$$

Tablo 9. AGS ve HUVEC hücre hatlarına muamele edilen Cis dozları

Muamele Edilen Dozlar	Cis (μ l)	F-12K Medyum (μ l)
0.1 μ M	1 μ l AR3	99 μ l
0.5 μ M	5 μ l AR3	95 μ l
1 μ M	10 μ l AR3	90 μ l
5 μ M	50 μ l AR3	50 μ l
10 μ M	10 μ l AR2	90 μ l
15 μ M	15 μ l AR2	85 μ l
20 μ M	20 μ l AR2	80 μ l
25 μ M	25 μ l AR2	75 μ l
30 μ M	30 μ l AR2	70 μ l
35 μ M	35 μ l AR2	65 μ l
40 μ M	40 μ l AR2	60 μ l
50 μ M	50 μ l AR2	50 μ l
60 μ M	6 μ l AR1	94 μ l
70 μ M	7 μ l AR1	93 μ l
80 μ M	8 μ l AR1	92 μ l
90 μ M	9 μ l AR1	91 μ l
100 μ M	10 μ l AR1	90 μ l

3.2.2.4. OLE'nin Kemoterapötik Ajanlar ile Oluşturacağı Sinerjik, Additive veya Antagonist Etkinin Araştırılması için Deney Gruplarının Oluşturulması ve WST-1 Analizi

Mevcut tez çalışması kapsamında OLE'nin AGS hücreleri üzerine olan etkilerinin kemoterapötik ajanların etkileriyle karşılaştırılması ve oluşturacağı sinerjik, additive veya antagonistlik etkinin araştırılması için Tablo10.'daki deney grupları oluşturuldu (Tablo 10). Tüm kombinasyon analizleri için hücreler 5-FU, Cis ve 5-FU+Cis ile 24 saat boyunca ön işleme tabi tutuldu. İnkübasyon süresinin ardından bu gruplar üzerine 1.5 mg/ml OLE eklenerek 24 saat boyunca tedavi edildi. Muamele süresinin ardından 3.2.2.1.'de açıklanan yöntem ile WST-1 analizi gerçekleştirilerek OLE ve kemoterapötik ajanların birlikte hücre canlılığı üzerine olası etkinliği analiz edildi.

Tablo10. OLE ve kemoterapötik ajanların birlikte oluşturacağı sinerjik, additive veya antagonist etkilerin araştırılacağı deney grupları

No	Deney Grupları
1	OLE'nin AGS hücrelerinde WST analizi ile belirlenen etkin dozu
2	5-FU in AGS hücrelerinde WST analizi ile belirlenen etkin dozu
3	OLE'nin etkin dozu, 5-FU nun etkin dozu birlikte
4	5-FU in AGS hücrelerinde WST analizi ile belirlenen düşük etkili dozu
5	OLE'nin etkin dozu, 5-FU nun düşük etkili dozu birlikte
6	Cis' in AGS hücrelerinde WST analizi ile belirlenen etkin dozu
7	OLE'nin etkin dozu, Cis' in etkin dozu birlikte
8	Cis'in AGS hücrelerinde WST analizi ile belirlenen düşük etkili dozu
9	OLE'nin etkin dozu, Cis'in düşük etkili dozu birlikte
10	5-FU ve Cis'in etkin dozları birlikte
11	OLE'nin etkin dozu, 5-FU ve Cis'in etkin dozları birlikte
12	5-FU ve Cis'in düşük etkili dozlarının birlikte
13	OLE'nin etkin dozu, 5-FU ve Cis'in düşük etkili dozları birlikte
14	Muamelesiz AGS hücreleri

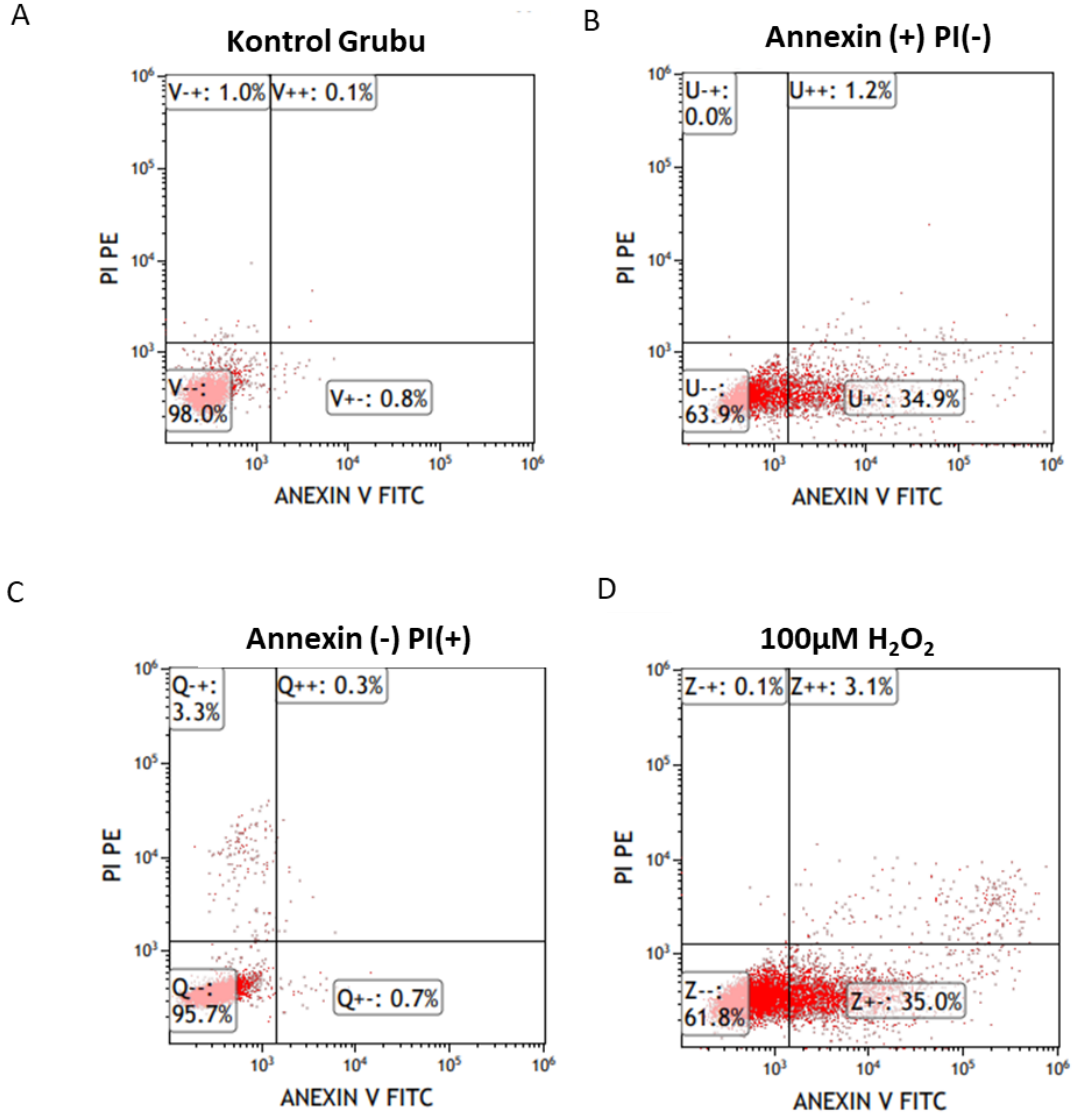
OLE'nin 5-FU ve Cis ile kombinasyon durumunda sinerjik, antagonistik veya aditive etki göstereceği SynergyFinder web application (version 2.0) programı kullanılarak hesaplandı (Ianevski, Giri & Aittokallio, 2020). Program doğrultusunda hesaplanan sinerji skoru -10 'dan küçük ise iki ilaç arasındaki etkileşim muhtemelen antagonistik, -10 ile 10 arasında bir değerde ise iki ilaç arasındaki muhtemel etki aditive, 10'dan büyük olursa ise iki ilaç arasındaki etkileşim muhtemelen sinerjik bir etki göstereceği dikkate alınarak sinerji skoru analiz edildi (Ianevski ve ark., 2020).

3.2.2.5. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Hücre Ölümü Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

AGS hücrelerinde OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte hüce ölümü üzerine etkisinin değerlendirilmesi Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC (Invitrogen TM, ABD) kullanılarak, kit protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Kısaca; AGS hücreleri 24 kuyulu hücre kültür plakasına 10⁵ hücre/500mL besiyeri olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat boyunca 37°C ve %5'lik CO₂ içeren inkübatörde bekletilerek hücrelerin kültür kabı zeminine tutunması sağlandı. Kültür kabı zeminine tutunan hücreler OLE, 5-FU ve Cis'in uygun etkin doz grupları ile WST-1 analizinde etkin olduğu belirlenen inkübasyon süreleri boyunca muamele edildi. İnkübasyon süresinin ardından hücrelerin kültüre edildiği besiyeri toplandı ve kültür kabı zeminindeki hücreler 500 µl % 25 Trypsin ile 3 dk muamele

edildi. Hücreler adherent özelliklerini kaybetmeye başladığında, daha önce kültür kabından toplanan besiyeri kullanılarak tripsin inaktivasyonu gerçekleştirildi. Besiyerinde süspansiyon halinde bulunan hücreler 15ml'lik falkon tüplerine aktarılarak 12.000 xg'de 5dk santrifüj edildi. Supernatan uzaklaştırılarak pellette yer alan hücreler 2 defa aynı santrifüj koşullarında PBS ile yıkandı. Pellet 100µL 1X Annexin V Binding Buffer içerisinde hazırlanan 1:5 oranında Annexin V-FITC Reagent ve Propidium Iodide (PI) karışımı ile muamele edildi. Karanlıkta oda ısısında gerçekleştirilen 15 dk inkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerine 400µL 1X Annexin V Binding Buffer ilave edilerek karışımdaki Annexin V-FITC Reagent ve PI konsantrasyonlarının azaltıldı. Böylece PI'nın uzun inkübasyon sürelerindeki sitotoksik etkisinden kaçınıldı.

Akan hücre ölçüm analizinde AGS hücrelerinden uygun kapıyı alabilmek için hiçbir ajanla muamele edilmemiş AGS hücreleri kullanıldı. Histogram görüntülerinde canlı hücre kadran ayarı yalnızca Annexin V ve yalnızca PI kullanılarak boyanan hiçbir ajan ile muamele edilmemiş AGS hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi. Kadranın doğruluğu 3 saat boyunca 100µM H₂O₂ ile muamele edilerek apoptoz indüklenmiş AGS hücreleri kullanılarak test edildi. Annexin V analizi için gerçekleştirilen kadran ayarı şekil 39' da gösterilmektedir (Şekil 39). Tüm kontrol grupları ve OLE, 5-FU ve Cis dozları ve kombinleri ile muamele edilen AGS hücreleri Flow Sitometride (Beckman Coulter, ABD) okutuldu. Her bir ajanla gerçekleştirilen Annexin V analizi ayrı ayrı günlerde en az 3 defa tekrarlandı. Her analizde kadran yeniden hesaplandı. Annexin V (+)/PI (-) boyanan hücrelerin erken apoptozda, Annexin V (+)/PI (+) boyanan hücrelerin geç apoptozda olduğu, Annexin V (-)/PI (+) boyanan hücrelerin ise nekrotik yolla öldüğü kabul edildi.



Şekil 39. Annexin V analizi için gerçekleştirilen örnek bir kadrana ayarı. **A:** Muamele edilmemiş AGS hücreleri. **B:** Yalnızca Annexin V boyanan hücreler. **C:** Yalnızca PI boyanan hücreler. **D:** 100µM H₂O₂ muamele edilen AGS hücreleri.

3.2.3. OLE'nin AGS Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkinliğinin Akridin Orange /Propidium İyodür Yöntemi Kullanılarak Analiz edilmesi

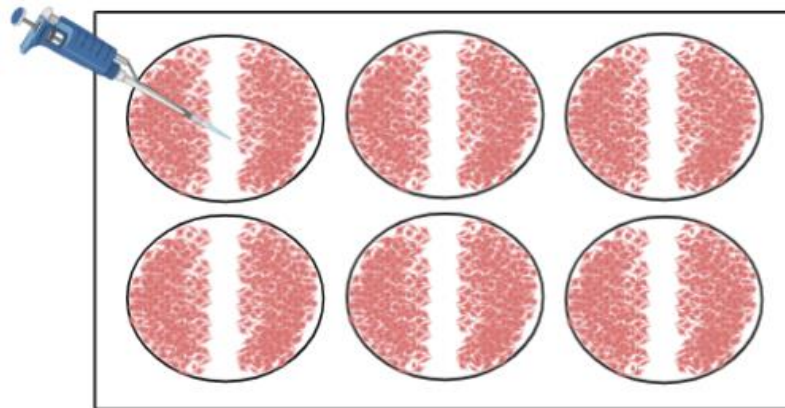
Muamele edilmemiş ve yalnızca OLE ile muamele edilmiş AGS hücrelerinin morfolojik değerlendirmeleri, bir çift floresan boya boyama yöntemi olan Akridin Orange (AO)/Propidium İyodür (PI) kullanılarak analiz edildi. AGS hücreleri 24 kuyulu hücre kültür plakasına 10⁵ hücre/500mL besiyeri olacak şekilde ekim yapıldı ve 24 saat boyunca 37°C ve %5'lik CO₂ içeren inkübatörde bekletilerek hücrelerin kültür kabı zeminine tutunması sağlandı. Ardından 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilerek etkin süre olan 24h boyunca inkübe edildi. 24 saat sonunda hücreler iki kez

PBS ile yıkandı ve 5 dakika boyunca 10 µg/ml AO /PI ile boyanması sağlandı. Hücrelerin morfolojisi, floresan yoğunluğu azalmaya başlamadan 30 dakika önce inverted floresan mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya) ile görüntüleri çekildi. Sağlam yeşil çekirdeğe sahip hücreler canlı olarak kabul edildi, çekirdekte yoğun yeşil kromatin yoğunlaşması alanları olan hücreler erken apoptotik, yoğun kırmızı kromatin yoğunlaşması alanları olan hücreler geç apoptotik ve kırmızı çekirdeği bozulmamış hücreler nekrotik hücreler olarak kabul edildi (Anasamy ve ark., 2013; Ciapetti ve ark., 2002).

3.2.4. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Tümörün Agresifliği Üzerine Etkinliğinin Belirlenmesi

3.2.4.1. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Gastrik Kanser Hücreleri Üzerindeki İnvazyon Etkisinin Belirlenmesi

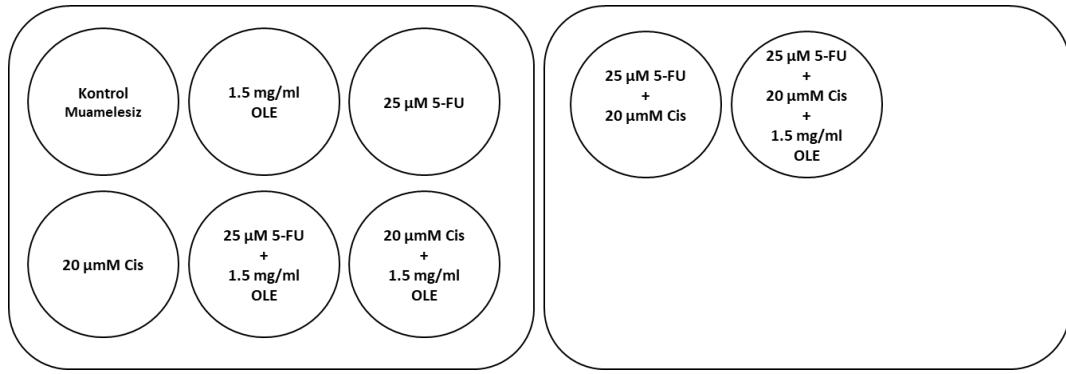
OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte GK hücreleri üzerindeki invazyon etkinliği yara iyileşmesi analizi ile belirlendi. AGS hücreleri 6 kuyulu hücre kültür plakalarının üzerine tek katman halinde 1×10^6 hücre olacak şekilde ekilerek inkübasyona bırakıldı. Her bir kuyudaki hücre yoğunluğu yaklaşık %90'a ulaştığında üzerindeki medyum çekilerek uzaklaştırıldı. Ardından 1X PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Kültür kuyularının içerisindeki açıklığın yaklaşık 1 mm olması için 200 µl' lik mikropipet ucu yardımıyla çizik oluşturuldu. Kuyulardaki hücre artıklarının uzaklaştırılabilmesi için 2 kere 1X PBS ile yıkama yapıldı ve çizik oluşumu inverted mikroskobu ile 0. saati görüntülendi (Şekil 40).



Şekil 40. AGS hücrelerinde pipet ucu ile yara alanı oluşumu

Görüntüleme işlemi sonrasında F-12K Medyum içerisinde WST-1 analizi ile belirlenen OLE, 5-FU, Cis, OLE + 5-FU, OLE + Cis, Cis + 5-FU ve Cis + 5-FU +

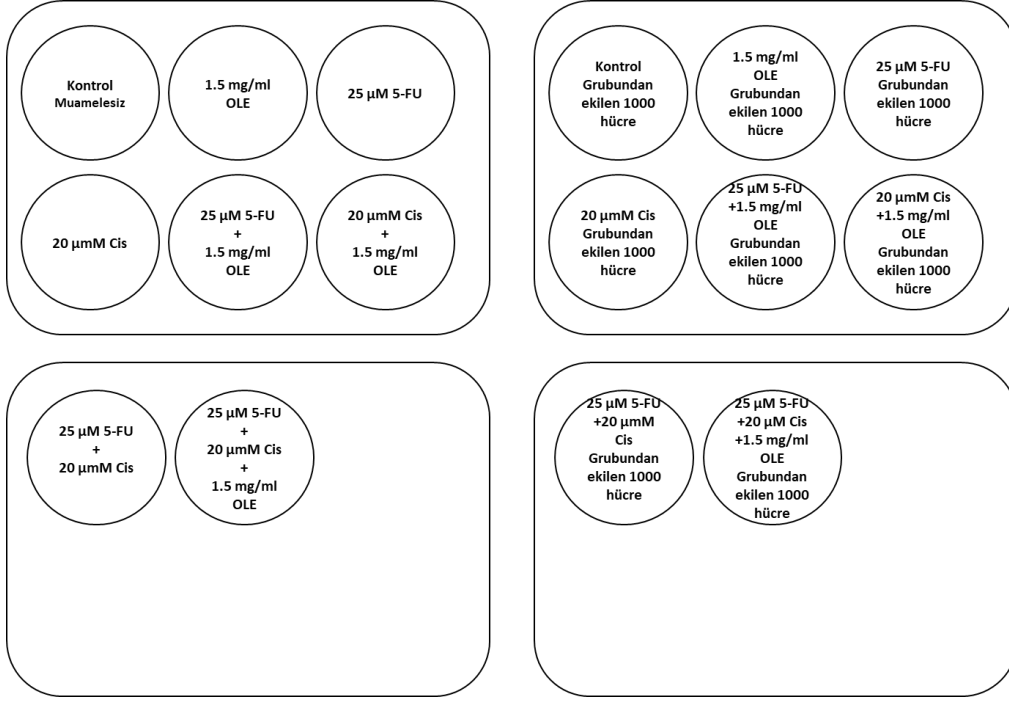
OLE etkin doz grupları ile muamele edilerek 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübasyona bırakıldı (Şekil 41). 6 kuyulu kültür plakası inverted mikroskop yardımıyla 6, 12, 24, 36 ve 48. saatlerin sonunda görüntüleri çekildi. Her durum için üç tekrar kuyusu incelendi ve her deney üç set halinde gerçekleştirildi. Elde edilen görüntüler incelenerek çizik aralıklarının kapanma oranlarının yüzdelik hesabı üç farklı görüntü dikkate alınarak PowerPoint programı ile ölçüldü ve hesaplandı. Muamele edilmemiş kontrol grubuna karşı yara kapanması olarak sonuçlar ifade edildi ve Two-way Anova testi ile analiz edildi.



Şekil 41. AGS hücrelerinde yara deneyi için muamele edilen doz grupları

3.2.4.2. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Koloni Oluşumu Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi

OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte koloni oluşturma yeteneği üzerine olası etkileri CellMAX™ Colonogenic Assay Kit (BioPioneer, ABD) kullanılarak belirlendi. İlk olarak 2ml F12K Medyum içerisinde her bir kuyu başına 1×10^6 hücre olacak şekilde 6 kuyulu kültür plakasına ekim yapıldı. 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilerek hücre yoğunluğu kontrol edildi. %80 hücre yoğunluğuna ulaşıldığında kombinasyon analizleri için hücreler 5-FU, Cis ve 5-FU+Cis ile dozlandı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından bu gruplar üzerine 1.5 mg/ml OLE eklendi ve tekrardan 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda deney grupları 500 ml Tripsin ile kaldırılarak Thoma lamı ile hücre sayımı gerçekleştirildi. Her bir deney grubu için 1×10^3 hücre 2 ml F12K Medyum içerisinde olacak şekilde 6 kuyulu kültür plakasına ekim yapıldı (Şekil 42).



Şekil 42. AGS hücrelerinde koloni oluşumu analizi için doz grupları ve ekim yapılan hücreler

Beşinci gün sonunda hücrelerin medyumunu değiştirildi. On günlük inkübasyon süresinin ardından medyum çekilerek hücreler 2 kere 1X PBS ile yıkama işlemi yapıldı. Ardından 1ml Fiksasyon Tamponu eklenerek 15 dk boyunca oda ısısında inkübe edildi. Bu sürenin sonunda 1ml Boyama Solüsyonu eklendi ve 45 dk boyunca oda ısısında ışık almayan ortamda bekletilerek kolonilerin mavi renk ile boyanması sağlandı. Daha sonra her bir hücre grubu 1X PBS ile 3 kere yıkandı ve ışık mikroskobu altında oluşan koloniler sayıldı. Her bir deney grubu 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi. AGS hücrelerinin koloni oluşturma oranları ve canlılık fraksiyonları kaplama verimliliği ve koloni oluşum oranı formülleri kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Kaplama verimliliği} = \frac{\text{Oluşan Koloni Sayısı}}{\text{Ekilen Hücre Sayısı}} * 100$$

$$\text{Koloni oluşum oranı} = \frac{\text{Doz Verilen Hücrenin Kaplama Alanı}}{\text{Kontrol Grubu Kaplama Verimliliği}} * 100$$

3.2.4.3. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Epitelyal–Mezenkimal Geçiş Mekanizması Üzerine Olası Etkinliğinin İncelenmesi

GK mekanizmasında EMT tümörün agresifliği, tümör nüksü ve metastaz ile büyük ölçüde ilişkilendirilmiştir. GK hücrelerinde OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte EMT mekanizması üzerine olan etkinliğinin

belirlenebilmesi amacıyla EMT ana regülatör genlerinin (*SNAIL*, *TWIST*, *ZEB1*, *N-Kaderin* ve *E-Kaderin*) ekspresyon seviyeleri analiz edildi (Tablo 11). Taqman Master Mix kullanılarak 3.2.3.3.3. yönteminde anlatıldığı gibi RT-PCR analizi ile ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. *GAPDH* (Hs02786624_g1) kontrol geni olarak kullanıldı ve deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 11. AGS hücrelerinde incelenen EMT belirteç genleri ve hs numaraları

EMT Genleri	Primer Numaraları
<i>TWIST</i>	Hs01675818_s1
<i>ZEB1</i>	Hs01566408_m1
<i>SNAIL</i>	Hs_00195591_m1
<i>E-Kaderin</i>	Hs01013959_m1
<i>N-Kaderin</i>	Hs00983056_m1
<i>GAPDH</i>	Hs02786624_g1

3.2.4.3.1. AGS Hücrelerinde RNA İzolasyonu

AGS hücrelerinden RNA izolasyonu Zymo RNA Isolation Kit (Zymo Research, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. İlk olarak her bir kuyuda 1×10^6 hücre olacak şekilde 6 kuyulu kültür plakasına ekim yapılarak 37°C 'de %5 CO_2 'lik inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hücreler %90 doluluk oranına ulaştığında üzerlerindeki medyum çekilerek 1X PBS ile bir defa yıkama işlemi gerçekleştirildi. OLE tek başına ve kemoterapi ajanlar ile kombinasyon halinde WST-1 analizine göre etkili bulunan dozlarda ve sürelerde dozlandı. Ardından tripsinizasyon işlemi ile hücrelere kaldırılarak temiz 1.5 ml'lik ependorfa alındı ve 12.000 g 'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant atılarak oluşan peletin üzerine kit protokolü doğrultusunda $400 \mu\text{l}$ RNA Lysis Buffer eklenerek vortekslendi ve 12.000 g 'de 1 dk santrifüj edildi. Oluşan karışım Zymo-Spin IIC filtreli tüpe aktarıldı ve 8.000 g 'de 30 sn santrifüjlendi. Ardından kolon tüpte kalan sıvı üzerine $320 \mu\text{l}$ %100'lük ethanol eklenerek Zymo-Spin IIC filtreli tüpe aktarıldı. 12.000 g 'de 1 dk boyunca santrifüj edildi. Kolon tüpte kalan sıvı atılarak filtreli tüplerin üzerine $400 \mu\text{l}$ RNA Prep Buffer ilave edilerek 12.000 g 'de 2 dk santrifüjlendi. Ardından kolon tüpte kalan sıvı atılarak birinci yıkama aşaması olan $800 \mu\text{l}$ RNA Wash Buffer ilave edildi ve 12.000 g 'de 1 dk santrifüjlendi. Aynı işlem basamağı ikinci yıkama aşaması için $400 \mu\text{l}$ RNA Wash Buffer koyularak gerçekleştirildi. Filtreli tüpler temiz 1.5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı ve her bir tüp üzerine $35 \mu\text{l}$ sulandırma solüsyonu eklendi. 10.000 g 'de 30 sn boyunca santrifüjlendi.

Elde edilen RNA'ların kalite ve konsantrasyon tayini 260/280 nm dalga boyundaki optik dansitileri UV / Vis Spektrofotometresi (Beckman Coulter, ABD) kullanılarak ölçüldü.

3.2.4.3.2. AGS Hücrelerinde Komplementer DNA (Complamenter DNA, cDNA) Sentezi

Deney gruplarının izolasyonu sonucu elde edilen RNA'lardan High Capacity cDNA Synthesis Kit kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonlarını eşitleyebilmek amacıyla 500 ng'lık ara stoklar oluşturuldu. Kit protokolüne göre 0.2 ml'lik PCR tüpleri içerisine Tablo 12' de belirtilen miktarlar doğrultusunda reaksiyon karışımı hazırlandı (Tablo 12). Elde edilen reaksiyon karışımından Tablo 13 'de belirtilen PCR reaksiyon koşulları altında cDNA sentezi gerçekleştirildi (Tablo 13). Sentezlenen cDNA'lar -20°C'de saklandı.

Tablo12. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı

	1 Örnek İçin (µL)
10X RT Buffer	2.0 µL
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8 Ml
10X RT Random Primer	2.0 µL
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0 µL
RNase Inhibitor	1.0 µL
Nuclease-free H ₂ O	3.2 µL
Total	10.0 µL

Tablo 13. PCR reaksiyon koşulları

PCR Programı	
25 °C	10 dakika
37 °C	120 dakika
85 °C	5 dakika
4 °C	∞

3.2.4.3.3. RT-PCR Analizi

İlgili genlerin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi amacıyla sentezlenen cDNA'lardan Taqman Master Mix kullanılarak RT-PCR analizi yapıldı. İlk olarak RT-PCR analizi için gerekli olan reaksiyon karışımı Tablo 14'deki belirtilen miktarlar ve bileşenler kullanılarak hazırlandı (Tablo 14). Tablo 15'deki reaksiyon koşulları doğrultusunda Step one Plus™ RT-PCR (Applied Biosystem, ABD) cihazı kullanılarak RT-PCR analizi gerçekleştirildi (Tablo 15). RT-PCR sonuçları Applied Biosystem StepOne™ RT-PCR Software yazılımı sayesinde CT değeri olarak elde edildi. "RT2 Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5" kullanılarak CT değerleri incelendi.

Tablo 14. RT-PCR analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı.

	1 Örnek için
20X Taqman Gene Expression Assay	0.5 µL
2X Taqman Gene Expression Assay Master Mix	5 µL
cDNA (500 ng)	2 µL
RNase-free water	2.5 µL
Toplam hacim	10 µL

Tablo15. Reaksiyon koşulları.

50 °C	2 dk	
95 °C	10 dk	
95 °C	15 sn	40 döngü
60 °C	60 dk	

3.2.4.4. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Kanser Kök Hücre Biyobelirteçlerinin Ekspresyon Seviyelerine Olası Etkinliğinin Analiz Edilmesi

GK mekanizmasında CSC'lerin varlığı tümör agresifliği ve tedavi direnci ile ilişkilendirilmektedir. AGS hücrelerinde OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte CSC mekanizması üzerine olası etkinliği *CD133*, *NANOG*, *SOX2* ve *OCT4* biyobelirteçlerinin ekspresyon seviyeleri analiz edildi (Tablo 16). Kontrol geni olarak *GAPDH* kullanıldı. Deney gruplarından 3.2.3.3.2.'daki yöntemle cDNA sentezi gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lardan Taqman Master Mix kullanılarak 3.2.3.3.3.

yöntem doğrultusunda uygun reaksiyon koşulları altında RT-PCR analizi gerçekleştirilerek ilgili genlerin ekspresyon seviyeleri analiz edildi.

Tablo 16. Analiz edilen CSC biyobelirteçleri ve Hs numaraları

Genler	Primer Numaraları
<i>CD133</i>	Hs01009259_m1
<i>NANOG</i>	Hs02387400_g1
<i>SOX2</i>	Hs01053049_s1
<i>OCT4</i>	Hs04260367_gH

3.2.4.5. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Tedavi Yanıtı ile İlişkili Çoklu İlaç Direnci Mekanizması Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

MDR mekanizması GK'larda kemoterapi etkinliğinin azalmasında oldukça etkili olmaktadır. OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte bu mekanizma üzerindeki etkinliği MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri analiz edilerek belirlendi (Tablo 17). *GAPDH* kontrol geni olarak kullanıldı. Deney gruplarından 3.2.3.3.2.'de sentezlenen cDNA'lar 3.2.3.3.3. yöntem ile uygun reaksiyon koşulları doğrultusunda RT-PCR analizi gerçekleştirildi.

Tablo 17. MDR analizinde kullanılan biyobelirteçler ve primer numaraları.

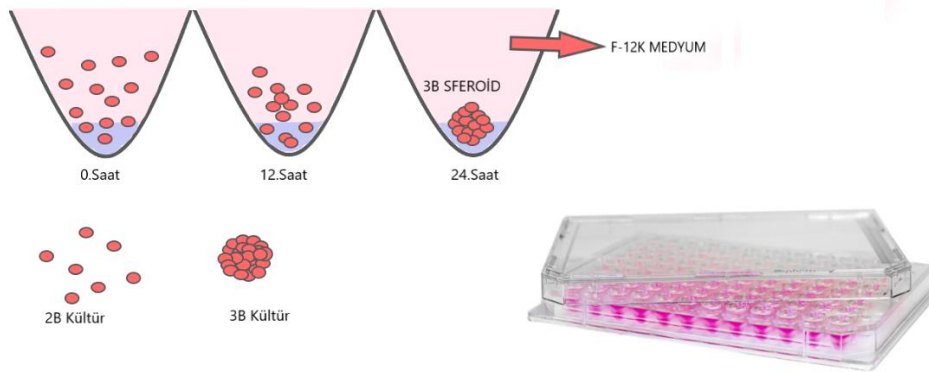
Genler	Primer Numaraları
<i>MDR1</i>	Hs00184500_m1
<i>MRP5</i>	Hs00981089_m1
<i>LRP1</i>	Hs00233856_m1

3.2.5. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Tümör Büyüklüğü ve Damar Oluşumu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

3.2.5.1. Asılı Damla Modeli ile Hücrelerin 3 Boyutlu Kültür Ortamında Çoğaltılarak Tümör Boyutunun Belirlenmesi

Asılı damla modeli ile 3B hücre kültürü için PerkinElmer'in CellCarrier Sferoid ULA 96 kuyulu polistiren mikropalakaları kullanılarak sferoid yapısı oluşturuldu (Şekil 43). Polistiren mikropalakalar hücrelerin yuvarlak yapılı sferoid yapısının oluşmasını sağlayan Ultra Düşük Tutunma (Ultra-Low Attachment, ULA) yapılardan meydana gelmektedir. ULA yapısı, polistiren kap yüzeyine kovalent olarak bağlı hidrofilik nötr yüklü bir kaplamadır. Hidrojel, spesifik ve spesifik olmayan bağlanmayı inhibe ederek hücreleri askıya alınmış bir duruma zorlayarak 3B sferoid

oluşumunu sağlamaktadır. PerkinElmer'ın CellCarrier Sferoid ULA mikroplaka kaplaması veri eldesini ve analizini daha kolay hale getirmekle birlikte aynı zamanda satellit sferoid oluşumunda engellemektedir. 3B hücre kültürü oluşturulabilmesi için T25'lik hücre kültür flaskında AGS hücreleri çoğaltıldı. Flasktaki hücre yoğunluğu %80'e ulaştığında üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve 1X PBS ile yıkandı. Tripsinizasyon ile kaldırılan hücreler Thoma Lamı ile sayıldı. İlk olarak mikroplakalardaki 96 kuyunun her biri için gerekli hücre sayısı farklı hücre konsantrasyonunda ve farklı hücre tiplerinde değişiklik gösterebileceği için AGS hücre hattına yönelik optimizasyon gerçekleştirildi. Her bir kuyunun toplam hacmi 100 µl medyum içerisinde, en fazla 40.000 hücre, en az 40 hücre sayısı olacak şekilde hücreler 2X seyreltilerek 11 farklı hücre popülasyonu hazırlandı. Hazırlanan hücreler ULA yüzeyine zarar vermeden dikkatlice ekilerek 37°C'de %5 CO₂' lik inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hücre içermeyen 1. kuyuya 100 µl F-12K medyum negatif kontrol grubu olarak kullanılmak üzere eklendi (Tablo 18). 3 gün boyunca her gün sferoid yapısının oluşumu ve büyümesi takip edildi ve görüntülendi. Medyum değişikliği ise sferoid yapıya zarar vermemek amacıyla 50 µl çekilip yerine 50 µl yeni medyum (toplam hacmi 100 µl) eklenerek yapıldı. İnkübasyon süresinin 3. günü sonunda sferoid oluşumu tamamlandığında WST-1 analizi ile etkinliği belirlenen dozlar ile hücreler muamele edildi. Etkin doz ile muamele edilmeden önceki süreç 0. gün kabul edilerek, doz işleminden sonraki 5 gün boyunca inverted mikroskobu ile görüntüleri çekildi. 3B tümör büyüklüğü, 4 farklı yarıçap ölçülerinin ortalaması ile hacmi hesaplanarak ölçüldü. Optimizasyon uygulamasının sonrasında belirlenen uygun hücre sayısı ile analizlere devam edildi (Tablo 19).



Şekil 43. AGS hücrelerinde sferoid oluşumu ve 96 kuyulu PerkinElmer'in CellCarrier Sferoid ULA mikroplakası

Tablo 18. Optimizasyon amacıyla 96 kuyulu mikrolakaya ekilen hücreler ve üzerine verilen doz miktarları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Hücre İçermeyen Kontrol	40 Hücre	80 Hücre	156 Hücre	312 Hücre	625 Hücre	1.250 Hücre	2.500 Hücre	5.000 Hücre	10.000 Hücre	20.000 Hücre	40.000 Hücre
		Muamelesiz	Muamelesiz	Muamelesiz	Muamelesiz	Muamelesiz	Muamelesiz	Muamelesiz	Muamelesiz	Muamelesiz	Muamelesiz	Muamelesiz
B	Hücre İçermeyen Kontrol	40 Hücre	80 Hücre	156 Hücre	312 Hücre	625 Hücre	1250 Hücre	2.500 Hücre	5.000 Hücre	10.000 Hücre	20.000 Hücre	40.000 Hücre
		*OLE	*OLE	*OLE	*OLE	*OLE	*OLE	*OLE	*OLE	*OLE	*OLE	*OLE
C	Hücre İçermeyen Kontrol	40 Hücre	80 Hücre	156 Hücre	312 Hücre	625 Hücre	1.250 Hücre	2.500 Hücre	5.000 Hücre	10.000 Hücre	20.000 Hücre	40.000 Hücre
		**5-FU	**5-FU	**5-FU	**5-FU	**5-FU	**5-FU	**5-FU	**5-FU	**5-FU	**5-FU	**5-FU
D	Hücre İçermeyen Kontrol	40 Hücre	80 Hücre	156 Hücre	312 Hücre	625 Hücre	1.250 Hücre	2.500 Hücre	5.000 Hücre	10.000 Hücre	20.000 Hücre	40.000 Hücre
		OLE+5-FU	OLE+5-FU	OLE+5-FU	OLE+5-FU	OLE+5-FU	OLE+5-FU	OLE+5-FU	OLE+5-FU	OLE+5-FU	OLE+5-FU	OLE+5-FU
E	Hücre İçermeyen Kontrol	40 Hücre	80 Hücre	156 Hücre	312 Hücre	625 Hücre	1.250 Hücre	2.500 Hücre	5.000 Hücre	10.000 Hücre	20.000 Hücre	40.000 Hücre
		***Cis	***Cis	***Cis	***Cis	***Cis	***Cis	***Cis	***Cis	***Cis	***Cis	***Cis
F	Hücre İçermeyen Kontrol	40 Hücre	80 Hücre	156 Hücre	312 Hücre	625 Hücre	1.250 Hücre	2.500 Hücre	5.000 Hücre	10.000 Hücre	20.000 Hücre	40.000 Hücre
		OLE+Cis	OLE+Cis	OLE+Cis	OLE+Cis	OLE+Cis	OLE+Cis	OLE+Cis	OLE+Cis	OLE+Cis	OLE+Cis	OLE+Cis
G	Hücre İçermeyen Kontrol	40 Hücre	80 Hücre	156 Hücre	312 Hücre	625 Hücre	1.250 Hücre	2.500 Hücre	5.000 Hücre	10.000 Hücre	20.000 Hücre	40.000 Hücre
		5-FU+Cis	5-FU+Cis	5-FU+Cis	5-FU+Cis	5-FU+Cis	5-FU+Cis	5-FU+Cis	5-FU+Cis	5-FU+Cis	5-FU+Cis	5-FU+Cis
H	Hücre İçermeyen Kontrol	40 Hücre	80 Hücre	156 Hücre	312 Hücre	625 Hücre	1.250 Hücre	2.500 Hücre	5.000 Hücre	10.000 Hücre	20.000 Hücre	40.000 Hücre
		OLE+5-FU+Cis	OLE+5-FU+Cis	OLE+5-FU+Cis	OLE+5-FU+Cis	OLE+5-FU+Cis	OLE+5-FU+Cis	OLE+5-FU+Cis	OLE+5-FU+Cis	OLE+5-FU+Cis	OLE+5-FU+Cis	OLE+5-FU+Cis

*OLE: 1.5 mg/ml OLE **5-FU: 25 µM 5-FU ***Cis: 20 µM Cis

Tablo 19. AGS hücrelerinde belirlenen uygun hücre sayıları ve üzerlerine verilen doz miktarlarının 96 kuyulu mikropalakadaki gösterimi

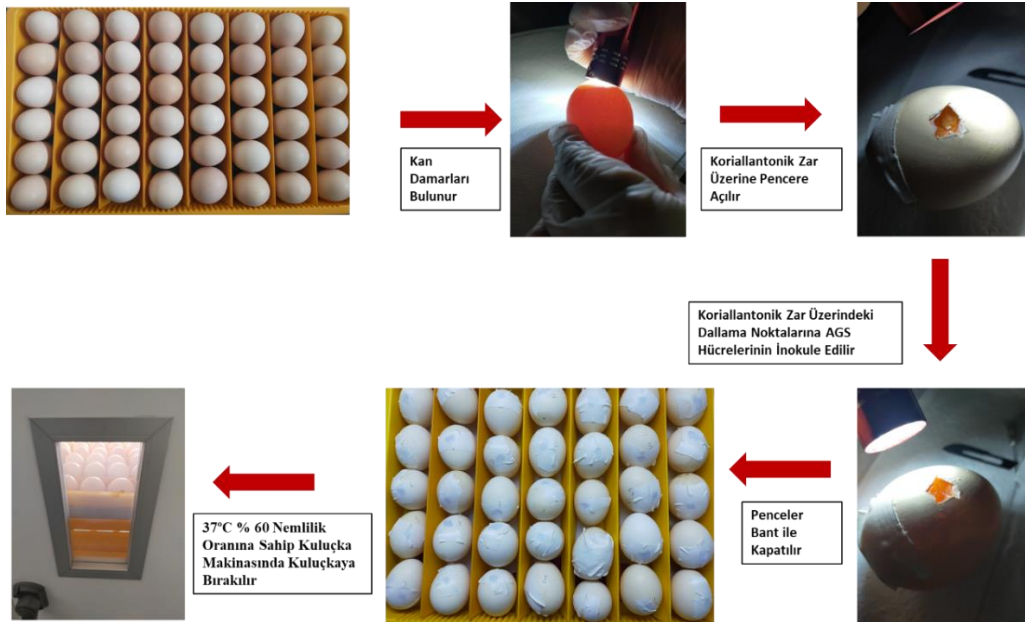
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Hücre İçermeyen Kontrol	80 Hücre Muamelesiz	80 Hücre Muamelesiz	80 Hücre Muamelesiz	80 Hücre Muamelesiz	156 Hücre Muamelesiz	156 Hücre Muamelesiz	156 Hücre Muamelesiz	156 Hücre Muamelesiz	312 Hücre Muamelesiz	312 Hücre Muamelesiz	312 Hücre Muamelesiz
B	Hücre İçermeyen Kontrol	80 Hücre *OLE	80 Hücre *OLE	80 Hücre *OLE	80 Hücre *OLE	156 Hücre *OLE	156 Hücre *OLE	156 Hücre *OLE	156 Hücre *OLE	312 Hücre *OLE	312 Hücre *OLE	312 Hücre *OLE
C	Hücre İçermeyen Kontrol	80 Hücre **5-FU	80 Hücre **5-FU	80 Hücre **5-FU	80 Hücre **5-FU	156 Hücre **5-FU	156 Hücre **5-FU	156 Hücre **5-FU	156 Hücre **5-FU	312 Hücre **5-FU	312 Hücre **5-FU	312 Hücre **5-FU
D	Hücre İçermeyen Kontrol	80 Hücre OLE+5-FU	80 Hücre OLE+5-FU	80 Hücre OLE+5-FU	80 Hücre OLE+5-FU	156 Hücre OLE+5-FU	156 Hücre OLE+5-FU	156 Hücre OLE+5-FU	156 Hücre OLE+5-FU	312 Hücre OLE+5-FU	312 Hücre OLE+5-FU	312 Hücre OLE+5-FU
E	Hücre İçermeyen Kontrol	80 Hücre ***Cis	80 Hücre ***Cis	80 Hücre ***Cis	80 Hücre ***Cis	156 Hücre ***Cis	156 Hücre ***Cis	156 Hücre ***Cis	156 Hücre ***Cis	312 Hücre ***Cis	312 Hücre ***Cis	312 Hücre ***Cis
F	Hücre İçermeyen Kontrol	80 Hücre OLE+Cis	80 Hücre OLE+Cis	80 Hücre OLE+Cis	80 Hücre OLE+Cis	156 Hücre OLE+Cis	156 Hücre OLE+Cis	156 Hücre OLE+Cis	156 Hücre OLE+Cis	312 Hücre OLE+Cis	312 Hücre OLE+Cis	312 Hücre OLE+Cis
G	Hücre İçermeyen Kontrol	80 Hücre 5-FU+Cis	80 Hücre 5-FU+Cis	80 Hücre 5-FU+Cis	80 Hücre 5-FU+Cis	156 Hücre 5-FU+Cis	156 Hücre 5-FU+Cis	156 Hücre 5-FU+Cis	156 Hücre 5-FU+Cis	312 Hücre 5-FU+Cis	312 Hücre 5-FU+Cis	312 Hücre 5-FU+Cis
H	Hücre İçermeyen Kontrol	80 Hücre OLE+5-FU+Cis	80 Hücre OLE+5-FU+Cis	80 Hücre OLE+5-FU+Cis	80 Hücre OLE+5-FU+Cis	156 Hücre OLE+5-FU+Cis	156 Hücre OLE+5-FU+Cis	156 Hücre OLE+5-FU+Cis	156 Hücre OLE+5-FU+Cis	312 Hücre OLE+5-FU+Cis	312 Hücre OLE+5-FU+Cis	312 Hücre OLE+5-FU+Cis

*OLE: 1.5 mg/ml OLE ** 5-FU: 25 µM 5-FU *** Cis: 20µM Cis

3.2.5.2. Ex Vivo Analiz Yöntemi ile Damar Oluşumunun Değerlendirilmesi

CAM Assay, tümör boyutu, invazyon, metastaz, angiogenez ve tümör kemosenitivitesini incelemesine olanak sağlayan in vitro ve in vivo analizleri arasında dolduran bir yöntemdir. Bu analiz için 100 adet fertilize tavuk yumurtası 0. Gününde Bursa Has Tavuk firmasından satın alınarak 37°C ve % 60 nemlilik oranına sahip kuluçka makinesinde (Fındık Kuluçka Makinası, Türkiye) inkübasyona bırakıldı. Analize başlamadan önce AGS hücreleri Tripzinizasyon yöntemi ile kaldırılarak yumurta başına 1×10^6 hücre olacak şekilde sayıldı. 15 mL'lik falkonlara (muamelesiz hücre grubu, OLE, 5-FU, Cis, OLE+5-FU, OLE+Cis, 5-FU+Cis ve OLE+5-FU+Cis) deney grupları hazırlandı. Aseptik koşullar altında civciv embriyosunun 7. Gününde yumurta kabuğu üzerinde bistüri yardımı ile pencere açılarak koriallantonik zara

ulaşıldı (Şekil 44). Ulaşılan bu zara damar dallanma noktası üzerine yumurta başına $1 \times 10^6/20 \mu\text{l}$ olacak şekilde AGS hücreleri inoküle edildi. Ardından hücreler hazırlanan OLE ve kemoterapötik ajanlar ile muamele edildi. Her bir yumurta üzerinde açılan pencereler bant ile kapatılarak 37°C ve % 60 nemlilik oranına sahip kuluçka makinasında 10 gün boyunca kuluçkaya bırakıldı. Kuluçkanın 10. gün sonunda yumurtaların kabukları soyuldu ve fotoğrafları çekilerek damar gelişim durumu incelendi. Damar sayıları sayılarak kontrol gruplarına kıyasla muameleli grupların damar oluşumunu nasıl etkilediği analiz edildi. Kontrol grubu olarak muamelesiz yalnızca hücrelerin inoküle edildiği grup kullanıldı. Her bir deney grubu embriyonun ortamının bozularak ölmesine ve kırılmalarına karşı en az 10 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 44. Cam Assay Analizinin şematize edilmesi.

3.2.6. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Epigenetik Mekanizma Olan LncRNA Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

GK dokularında PVT1, MALAT1, H19, HULC ve HOTAIR, LncRNA moleküllerinin anormal ekspresyon seviyelerinin hücre proliferasyonu, tümör gelişimi, migrasyon, invazyon, anjiyogenez, apoptoz, EMT mekanizması ve ilaç direnci gelişimi gibi biyolojik süreçlerde rol oynadıkları gösterilmiştir. OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte bu LncRNA molekülleri üzerine olası etkinliği ekspresyon seviyeleri analiz edilerek gerçekleştirildi (Tablo 20). Kontrol geni

olarak *GAPDH* kullanıldı. Elde edilen 8 deney grubuna ait 3.2.3.3.2. sentezlenen cDNA'ların 3.2.3.3.3. yöntem doğrultusunda uygun reaksiyon koşulları altında RT-PCR analizi gerçekleştirildi.

Tablo 20. Analiz edilen LncRNA molekülleri ve primer numaraları.

LncRNA Molekülleri	Primer Numaraları
PVT1	Hs01069023_m1
MALAT1	Hs03453854_g1
H19	Hs03663733_g1
HULC	Hs01909631_s1
SNHG16	Hs01598403_g1

3.2.7. İstatiksel Analiz

Elde edilen veriler doğrultusunda OLE'nin tek başına ve OLE+kemoterapötik ajanlar ile kombinasyon durumunda AGS hücrelerinin biyolojik davranışlarına olan etkisi GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) ve SPSS 23.0 (IBM SPSS Inc., Armonk, NY) programları kullanılarak analiz edildi. Tüm verilere ait tamamlayıcı istatistikler sayı, yüzde ve ortalama olarak ifade edildi. One Way ve Two Way ANOVA testi ile gruplar arası farklılıklar tespit edildi. OLE'nin tek başına ve OLE+kemoterapötik ajanlar ile kombinasyonunun gen ekspresyonları üzerindeki analizi web tabanlı “RT2 Profiler PCR Array Data Analysis v3.5” programı kullanılarak Independent t testi ile belirlendi (<https://www.qiagen.com/tr/shop/genes-and-pathways/data-analysis-center/overview-page/other-real-time-pcr-probes-or-primersdata-analysis-center>). Tüm grafikler GraphPad Prism 6 programından yararlanılarak çizildi. Tüm deneyler için 0,05'ten küçük p değerleri %95 güven aralığında (confidence interval; CI) anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS ve HUVEC Hücre Hatlarındaki Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

4.1.1. OLE'nin AGS Hücreleri ve Kontrol Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

4.1.1.1. OLE'nin AGS Hücrelerinin Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Belirlenmesi

OLE'nin GK hücre hattı olan AGS hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi WST-1 analizi ile belirlendi. Ana Bilim Dalımızda gerçekleştirilen daha önceki çalışmalar dikkate alınarak belirlenen doz aralığı (Tablo 7) ile hücreler 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele edildi. AGS hücrelerindeki OLE dozları ile muamelesinin 24, 48 ve 72 saatin sonunda WST-1 analizi doğrultusunda elde edilen değerleri Tablo 21'de gösterilmiştir (Tablo 21). Elde edilen bulgular doğrultusunda şekil 45'deki gösterildiği gibi OLE'nin AGS hücrelerindeki canlılık oranları belirlendi (Şekil 45).

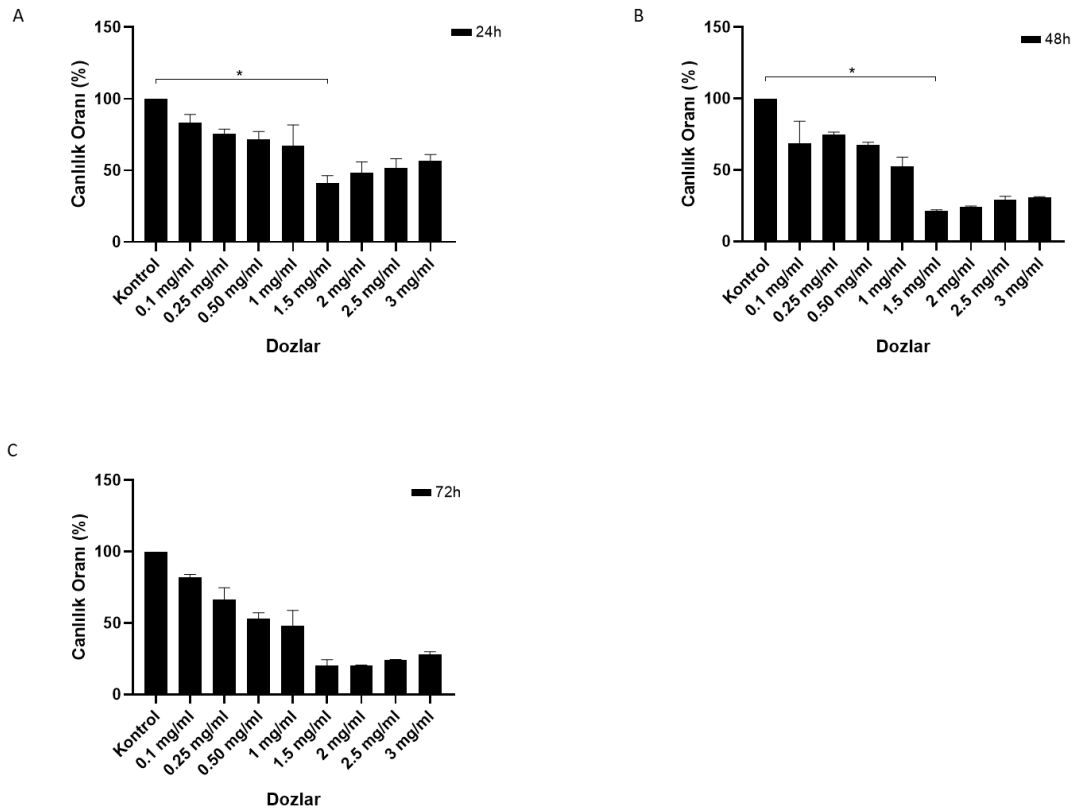
Tablo 21. AGS hücrelerindeki 24, 48 ve 72 saat boyunca OLE ile muamelesinin WST-1 analizi sonucuna göre elde edilen canlılık değerleri

24 Saat									
	Kontrol (-)	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.50 mg/ml	1 mg/ml	1.5 mg/ml	2 mg/ml	2.5 mg/ml	3 mg/ml
1. deneme	0,95	0,78	0,67	0,56	0,56	0,41	0,37	0,51	0,53
2. deneme	0,85	0,69	0,68	0,65	0,65	0,34	0,5	0,41	0,48
3. deneme	0,82	0,7	0,63	0,66	0,66	0,32	0,39	0,43	0,46
Ortalama	0,87	0,73	0,66	0,62	0,62	0,36	0,42	0,45	0,49

48 Saat									
	Kontrol (-)	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.50 mg/ml	1 mg/ml	1.5 mg/ml	2 mg/ml	2.5 mg/ml	3 mg/ml
1. deneme	1,38	1,3	1,13	0,99	0,84	0,33	0,35	0,47	0,45
2. deneme	1,52	0,93	1,14	1	0,85	0,32	0,37	0,43	0,46
3. deneme	1,6	0,86	1,09	1,04	0,67	0,31	0,36	0,41	0,46
Ortalama	1,5	1,03	1,12	1,01	0,78	0,32	0,36	0,44	0,46

72 Saat									
	Kontrol (-)	0.1 mg/ml	0.25 mg/ml	0.50 mg/ml	1 mg/ml	1.5 mg/ml	2 mg/ml	2.5 mg/ml	3 mg/ml
1. deneme	1,75	1,47	1,28	0,92	0,75	0,44	0,35	0,42	0,53
2. deneme	1,75	1,44	1,01	0,86	1,06	0,3	0,35	0,43	0,48
3. deneme	1,75	1,39	1,2	1	0,73	0,3	0,36	0,41	0,46
Ortalama	1,75	1,43	1,17	0,93	0,84	0,35	0,35	0,42	0,49

WST-1 analizi sonucuna göre OLE'nin AGS hücreleri üzerindeki etkin saati 24 saat olarak belirlendi (Şekil 45). 24. saatteki OLE'nin sitotoksik etkisi incelendiğinde 1mg/ml OLE dozu ile muamele edilen hücre grubundaki canlılık oranı % 67,3 oranında, 1.5 mg/ml OLE dozunda ise % 41,03 olarak tespit edildi ($p<0,0001$). AGS hücrelerindeki OLE'nin 48 saat muamelesi sonucunda canlılık oranının 1 mg/ml OLE dozunun % 52,4 olarak, 1.5 mg/ml OLE dozunun ise % 21,58 olduğu belirlendi ($p<0,0001$). OLE'nin AGS hücrelerindeki 72 saat sonucundaki sitotoksik etkisi analiz edildiğinde ise 1 mg/ml OLE dozunun canlılık oranının % 48,32 olduğu, 1.5 mg/ml dozunun % 20,04 olduğu tespit edildi ($p<0,0001$). AGS hücrelerinde hesaplanan SI'ne göre OLE'nin lethal dozu 24. saatteki 1.5 mg/ml dozu olduğu tespit edildi ($p<0,0001$).



Şekil 45. A: OLE dozları ile muamelesinin AGS hücrelerinin 24. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları. B: OLE dozları ile muamelesinin AGS hücrelerinin 48. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları. C: OLE dozları ile muamelesinin AGS hücrelerinin 72. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları.

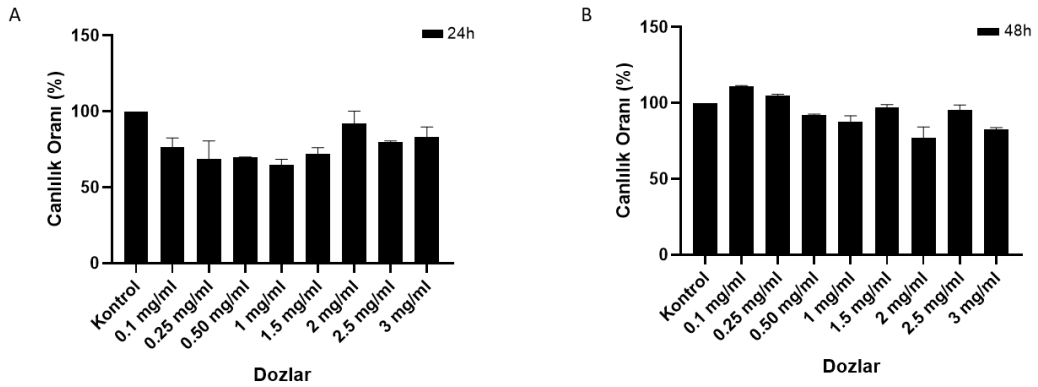
4.1.1.2. OLE'nin HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

OLE'nin HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi AGS hücrelerinde etkin bulunan doz ve saatler doğrultusunda WST-1 analizi ile gerçekleştirildi. WST-1 analizine göre elde edilen sonuçlar Tablo 22'de verildi (Tablo 22).

Tablo 22. HUVEC hücrelerinde 24 ve 48 saat boyunca OLE ile muamelesi sonucunda gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçları

24 saat									
	(-) Kontrol	0.1 mg/ml	0.25mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml	1,5 mg/ml	2 mg/ml	2,5 mg/ml	3 mg/ml
1. deneme	0,44	0,30	0,23	0,29	0,29	0,28	0,35	0,34	0,34
2. deneme	0,42	0,32	0,33	0,3	0,27	0,32	0,41	0,34	0,39
3. deneme	0,42	0,35	0,31	0,30	0,27	0,31	0,42	0,34	0,33
Ortalama	0,43	0,32	0,29	0,29	0,28	0,31	0,39	0,34	0,35
48 saat									
	(-) Kontrol	0.1 mg/ml	0.25mg/ml	0.5 mg/ml	1 mg/ml	1,5 mg/ml	2 mg/ml	2,5 mg/ml	3 mg/ml
1. deneme	0,32	0,35	0,34	0,3	0,27	0,3	0,27	0,31	0,27
2. deneme	0,31	0,34	0,32	0,28	0,28	0,31	0,26	0,29	0,26
3. deneme	0,30	0,35	0,32	0,28	0,26	0,30	0,21	0,30	0,25
Ortalama	0,31	0,34	0,33	0,29	0,27	0,30	0,24	0,30	0,26

Elde edilen verilere göre 24 saat süresince uygulanan OLE'nin HUVEC hücrelerindeki sitotoksik etkisi incelendiğinde 0.1 mg/ml doz ile muamelesi sonucu canlılık oranı % 76,4, 1mg/ml doz ile muamelesi sonucu % 64,96 ve AGS hücrelerinde belirlenen etkin doz olan 1.5 mg/ml OLE dozu ile muamelesi sonucu canlılık oranı % 71,92 olduğu tespit edildi (Şekil 46). OLE'nin 48. saatteki HUVEC üzerindeki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde, 0.1 mg/ml muamele sonucunda canlılık oranı % 109,67, 1 mg/ml OLE dozunda % 87,09, 1.5 mg/ml OLE dozuyla muamelesi sonucunda ise % 96,77 olduğu belirlendi.



Şekil 46. A: OLE dozları ile muamelesinin HUVEC hücrelerinin 24. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları. **B:** OLE dozları ile muamelesinin HUVEC hücrelerinin 48. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları.

4.1.2. 5-Fluorourasil'in AGS ve HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

4.1.2.1. 5-Fluorourasil'in AGS Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

5-FU'nun AGS hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini incelemek amacıyla Anabilim dalımızda yapılan çalışmalar ve AGS hücreleri ile 5-FU'nun yer aldığı literatürdeki çalışmalar dikkate alınarak belirlenen uygun doz aralığında WST-1 analizi gerçekleştirildi. Tablo 8 'de yer alan uygun doz grupları ile 24, 48 ve 72 saat boyunca muamelesi sonucunda elde edilen WST-1 analizi verileri Tablo 23'de gösterilmiştir (Tablo 23). AGS hücrelerinde 5-FU'nun etkin doz ve saate bağlı olarak sitotoksik etkisi WST-1 analizi oluşturulan değerlendirmeler şekil 47'de gösterilmiştir (Şekil 47).

Tablo 23. AGS hücrelerindeki 24, 48 ve 72 saat boyunca 5-FU ile muamelesinin WST-1 analizi sonucuna göre elde edilen canlılık oranları

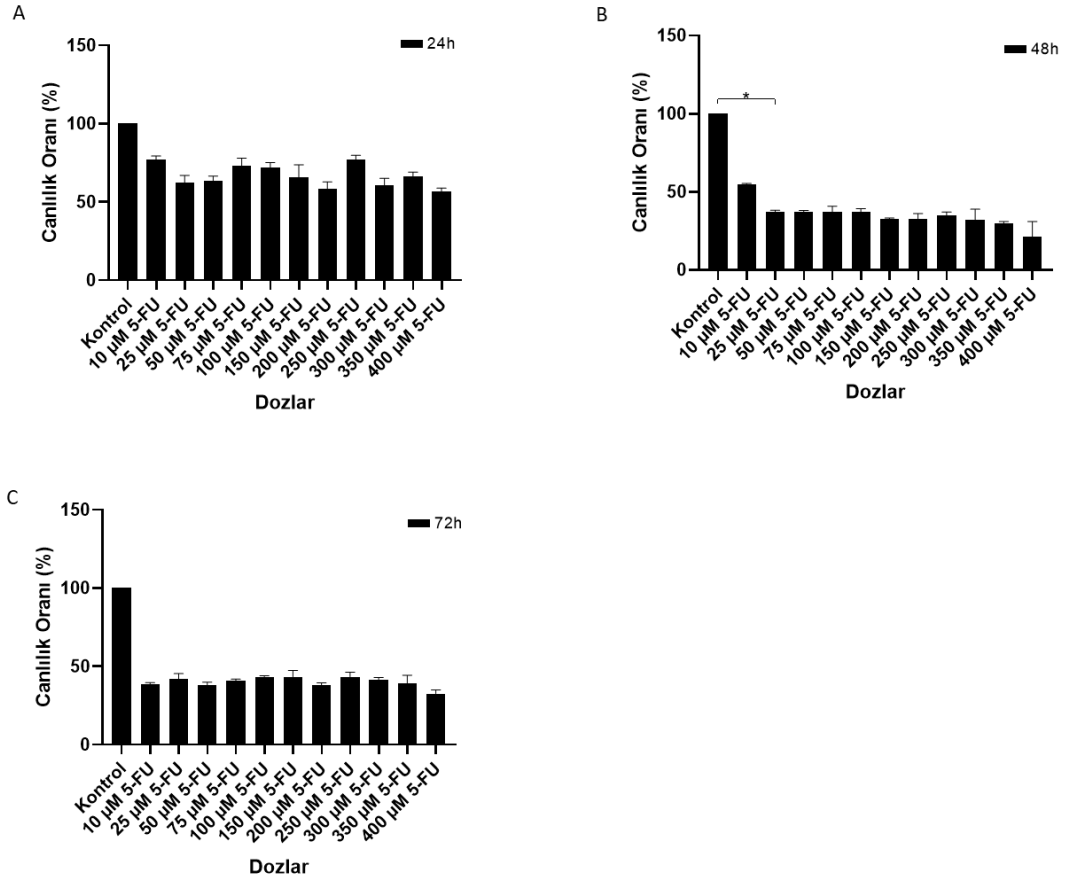
24 Saat												
	Kontrol (-)	10 uM 5-FU	25 uM 5-FU	50 uM 5-FU	75 uM 5-FU	100 uM 5-FU	150 uM 5-FU	200 uM 5-FU	250 uM 5-FU	300 uM 5-FU	350 uM 5-FU	400 uM 5-FU
1. deneme	0,45	0,37	0,32	0,31	0,38	0,36	0,33	0,26	0,38	0,3	0,32	0,27
2. deneme	0,49	0,36	0,29	0,29	0,33	0,33	0,27	0,28	0,37	0,27	0,31	0,26
3. deneme	0,5	0,38	0,28	0,31	0,35	0,34	0,34	0,3	0,36	0,3	0,33	0,28
Ortalama	0,48	0,37	0,3	0,3	0,35	0,34	0,31	0,28	0,37	0,29	0,32	0,27

48 Saat												
	Kontrol (-)	10 uM 5-FU	25 uM 5-FU	50 uM 5-FU	75 uM 5-FU	100 uM 5-FU	150 uM 5-FU	200 uM 5-FU	250 uM 5-FU	300 uM 5-FU	350 uM 5-FU	400 uM 5-FU
1. deneme	0,97	0,49	0,35	0,34	0,34	0,33	0,3	0,33	0,32	0,29	0,26	0,26
2. deneme	0,88	0,49	0,34	0,35	0,37	0,36	0,29	0,26	0,33	0,23	0,27	0,23
3. deneme	0,89	0,51	0,33	0,33	0,3	0,32	0,3	0,3	0,3	0,36	0,28	0,09
Ortalama	0,91	0,5	0,34	0,34	0,34	0,34	0,3	0,3	0,32	0,29	0,27	0,19

72 Saat												
	Kontrol (-)	10 uM 5-FU	25 uM 5-FU	50 uM 5-FU	75 uM 5-FU	100 uM 5-FU	150 uM 5-FU	200 uM 5-FU	250 uM 5-FU	300 uM 5-FU	350 uM 5-FU	400 uM 5-FU
1. deneme	1,65	0,61	0,64	0,61	0,65	0,69	0,67	0,62	0,64	0,65	0,64	0,53
2. deneme	1,55	0,59	0,72	0,56	0,62	0,68	0,74	0,59	0,73	0,64	0,67	0,53
3. deneme	1,51	0,61	0,62	0,61	0,65	0,67	0,62	0,57	0,67	0,67	0,51	0,47
Ortalama	1,57	0,6	0,66	0,59	0,64	0,68	0,68	0,59	0,68	0,65	0,61	0,51

AGS hücrelerindeki 5-FU'nun etkin süresi 48 saat olarak belirlendi. 5-FU'nun sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde 24. saate 150 µM 5-FU ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 65,76 olarak, 200 µM 5-FU ile muamele sonrası canlılık oranı % 58,59 olarak belirlendi. 5-FU'nun 48. saatteki sitotoksik etkisi, 10 µM 5-FU

dozu ile muamele edilen gruptaki canlılık oranı % 54,72 olduğu, 25 μ M 5-FU ile muamele edilen hücrelerin canlılık oranı ise % 37,45 olduğu tespit edildi. 5-FU'nun 72. saatteki sitotoksik etkisi ise 10 μ M ile muamlesi sonucunda canlılık oranının % 38,75 olduğu, 25 μ M 5-FU ile muamelesi sonucunda hücrelerin canlılık oranı % 42,22 olduğu belirlendi ($p < 0,0001$). WST-1 analizi sonucuna göre AGS hücrelerindeki 5-FU'nun lethal dozunun 48 saatte 25 μ M 5-FU olduğu belirlendi.



Şekil 47. A: 5-FU dozları ile muamele edilen AGS hücrelerinin 24. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları. B: 5-FU dozları ile muamele edilen AGS hücrelerinin 48. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları. C: 5-FU dozları ile muamele edilen AGS hücrelerinin 72. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları.

4.1.2.2. 5-Fluorourasil'in HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

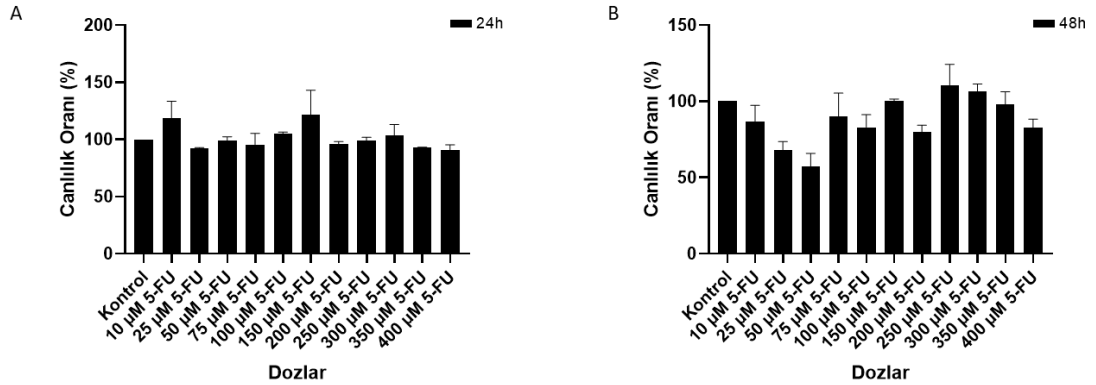
5-FU'nun HUVEC hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi AGS hücrelerinde etkin bulunan doz ve saatler doğrultusunda WST-1 analizi ile gerçekleştirildi. WST-1 analizine göre elde edilen sonuçlar Tablo 24'de verildi (Tablo 24).

Tablo 24. HUVEC hücrelerinde 5-FU ile 24 ve 48 saat muamelesinin WST-1 analizi sonucuna göre elde edilen değerleri

24 Saat												
	Kontrol (-)	10 uM 5-FU	25 uM 5-FU	50 uM 5-FU	75 uM 5-FU	100 uM 5-FU	150 uM 5-FU	200 uM 5-FU	250 uM 5-FU	300 uM 5-FU	350 uM 5-FU	400 uM 5-FU
1. deneme	0,33	0,45	0,31	0,34	0,28	0,35	0,34	0,31	0,34	0,38	0,31	0,32
2. deneme	0,32	0,37	0,3	0,32	0,35	0,36	0,48	0,33	0,33	0,31	0,33	0,29
3. deneme	0,34	0,37	0,32	0,32	0,32	0,35	0,41	0,32	0,32	0,35	0,31	0,29
Ortalama	0,33	0,4	0,31	0,33	0,32	0,35	0,41	0,32	0,33	0,34	0,31	0,3

48 Saat												
	Kontrol (-)	10 uM 5-FU	25 uM 5-FU	50 uM 5-FU	75 uM 5-FU	100 uM 5-FU	150 uM 5-FU	200 uM 5-FU	250 uM 5-FU	300 uM 5-FU	350 uM 5-FU	400 uM 5-FU
1. deneme	1,56	1,35	0,96	0,8	1,52	1,22	1,53	1,17	1,83	1,71	1,65	1,18
2. deneme	1,26	1,16	1,04	1,03	1,5	1,41	1,51	1,21	1,8	1,57	1,43	1,27
3. deneme	1,77	1,48	1,12	0,8	1,1	1,17	1,56	1,3	1,45	1,62	1,41	1,35
Ortalama	1,53	1,33	1,04	0,88	1,38	1,27	1,53	1,22	1,69	1,63	1,5	1,27

Analiz sonucuna göre 24 saat süresince uygulanan 5-FU'nun HUVEC hücrelerindeki sitotoksik etkisi incelendiğinde 10 μ M 5-FU doz ile muamelesi sonucu canlılık oranı % 118,99, 25 μ M 5-FU doz ile muamelesi sonucu % 92,52 olduğu tespit edildi. 5-FU'nun 48. saatteki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde 10 μ M 5-FU doz ile muamelesi sonucu canlılık oranı % 86,78 olduğu, AGS hücrelerinde belirlenen etkin doz olan 25 μ M 5-FU için canlılık oranı ise %68,21 olduğu tespit edildi (Şekil 48).



Şekil 48. A: 5-FU dozları ile muamelesinin HUVEC hücrelerinin 24. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları. B: 5-FU dozları ile muamelesinin HUVEC hücrelerinin 48. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları.

4.1.3. Cisplatin'in AGS ve Kontrol Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

4.1.3.1. Cisplatin'in AGS Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

AGS hücrelerinde Cis'in sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla literatür çalışmaları sonucunda belirlenen uygun Tablo 9'daki belirlenen doz aralığı ile 24, 48

ve 72 saat boyunca muamele sonrasında WST-1 analizi gerçekleştirildi. WST-1 analizi sonucunda elde edilen veriler Tablo 25’de belirtilmiştir (Tablo 25). AGS hücrelerinde Cis’in etkin doz ve saate bağlı olarak sitotoksik etkisi WST-1 analizi oluşturulan değerlendirmeler sonucunda şekil 49 ’da gösterildiği gibi sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 49).

Tablo 25. AGS hücrelerindeki 24, 48 ve 72 saat boyunca Cis ile muamelesinin WST-1 analizi sonucuna göre elde edilen değerleri

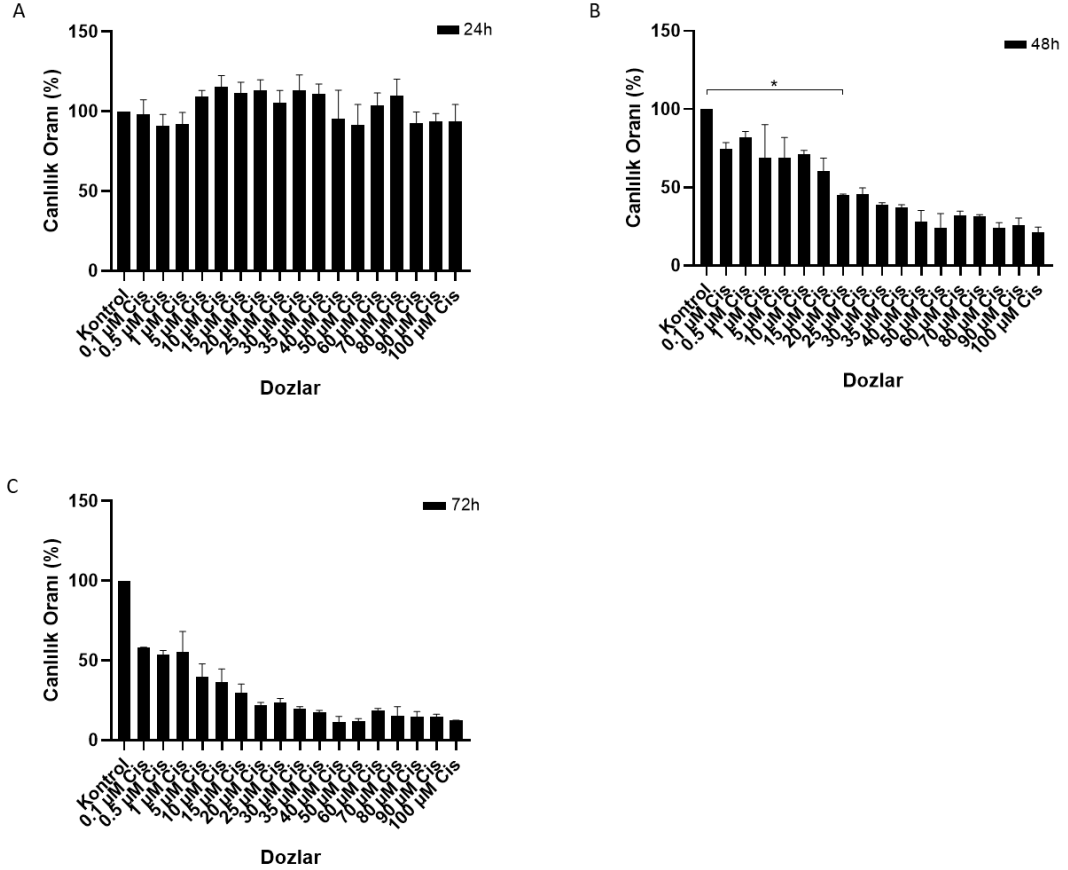
24 Saat																		
	Kontrol (-)	0.1 uM Cis	0.5 uM Cis	1 uM Cis	5 uM Cis	10 uM Cis	15 uM Cis	20 uM Cis	25 uM Cis	30 uM Cis	35 uM Cis	40 uM Cis	50 uM Cis	60 uM Cis	70 uM Cis	80 uM Cis	90 uM Cis	100 uM Cis
1. deneme	1	1,02	0,94	0,96	1,03	0,79	0,57	0,61	0,41	0,65	0,66	0,72	0,48	0,45	0,71	0,62	0,39	0,08
2. deneme	0,93	0,95	0,85	0,84	1,02	0,82	0,55	0,61	0,64	0,55	0,65	0,65	0,53	0,6	0,55	0,66	0,44	0,08
3. deneme	0,9	0,84	0,81	0,83	1,08	0,81	0,61	0,49	0,5	0,66	0,82	0,52	0,49	0,55	0,56	0,73	0,5	0,54
Ortalama	0,94	0,93	0,87	0,88	1,04	0,81	0,58	0,57	0,52	0,62	0,71	0,63	0,5	0,53	0,61	0,67	0,44	0,23

48 Saat																		
	Kontrol (-)	0.1 uM Cis	0.5 uM Cis	1 uM Cis	5 uM Cis	10 uM Cis	15 uM Cis	20 uM Cis	25 uM Cis	30 uM Cis	35 uM Cis	40 uM Cis	50 uM Cis	60 uM Cis	70 uM Cis	80 uM Cis	90 uM Cis	100 uM Cis
1. deneme	1,52	1,18	1,2	1,31	1,23	1,07	0,97	0,68	0,74	0,58	0,55	0,48	0,51	0,47	0,47	0,37	0,45	0,34
2. deneme	1,45	1,07	1,28	1,08	0,85	1,01	0,96	0,66	0,65	0,55	0,57	0,47	0,29	0,45	0,47	0,4	0,38	0,25
3. deneme	1,49	1,08	1,17	0,68	0,98	1,08	0,76	0,67	0,64	0,59	0,51	0,29	0,28	0,52	0,45	0,3	0,32	0,35
Ortalama	1,48	1,11	1,22	1,02	1,02	1,05	0,9	0,674	0,68	0,57	0,54	0,41	0,36	0,48	0,47	0,35	0,38	0,31

72 Saat																		
	Kontrol (-)	0.1 uM Cis	0.5 uM Cis	1 uM Cis	5 uM Cis	10 uM Cis	15 uM Cis	20 uM Cis	25 uM Cis	30 uM Cis	35 uM Cis	40 uM Cis	50 uM Cis	60 uM Cis	70 uM Cis	80 uM Cis	90 uM Cis	100 uM Cis
1. deneme	2,01	1,3	1,18	1,53	1,09	0,95	0,55	0,5	0,58	0,46	0,38	0,2	0,3	0,42	0,41	0,37	0,36	0,27
2. deneme	2,45	1,28	1,13	1,2	0,78	0,61	0,77	0,52	0,48	0,44	0,41	0,2	0,25	0,42	0,41	0,36	0,28	0,28
3. deneme	2,2	1,28	1,25	0,94	0,78	0,87	0,67	0,45	0,52	0,42	0,35	0,34	0,23	0,37	0,18	0,25	0,31	0,26
Ortalama	2,22	1,29	1,19	1,22	0,88	0,81	0,66	0,49	0,53	0,44	0,38	0,24	0,26	0,4	0,33	0,32	0,32	0,27

AGS hücrelerindeki Cis’in etkin süresi 48 saat olarak belirlendi. Cis’in sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde 24. saatte 80 µM Cis ile muamele edilen hücrelerde canlılık oranı % 71,68 olarak, 90 µM Cis ile muamele sonrası canlılık oranı % 47,49 olarak belirlendi. Cis’in 48. saatteki sitotoksik etkisi, 15 µM Cis dozu ile muamele edilen gruptaki canlılık oranı % 60,67 olduğu, 20 µM Cis ile muamele edilen hücrelerin canlılık oranı ise % 45,29 olduğu tespit edildi (p<0,0001). Cis’in 72.

saatteki sitotoksik etkisi ise 15 μ M ile muamelesi sonucunda canlılık oranının % 29,98, 20 μ M Cis ile muamelesi sonucunda hücrelerin canlılık oranı % 22,20 olduğu belirlendi. WST-1 analizi sonucuna göre AGS hücrelerindeki Cis'in öldürücü dozunun 48. saatte 20 μ M Cis olduğu belirlendi.



Şekil 49. A: Cis dozları ile muamele edilen AGS hücrelerinin 24. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları. **B:** Cis dozları ile muamele edilen AGS hücrelerinin 48. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları. **C:** Cis dozları ile muamele edilen AGS hücrelerinin 72. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları.

4.1.3.2. Cisplatin'in HUVEC Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

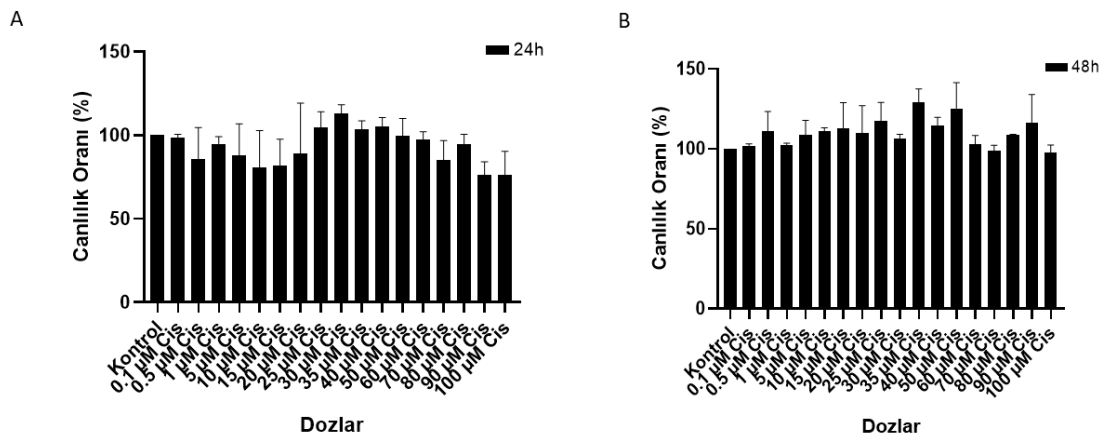
HUVEC hücreleri üzerinde Cis'in sitotoksik etkisi AGS hücrelerinde etkin bulunan doz ve saatler doğrultusunda WST-1 analizi ile gerçekleştirildi. WST-1 analizine göre elde edilen sonuçlar Tablo 26 'da verildi (Tablo 26).

Tablo 26. HUVEC hücrelerindeki Cis ile 24 ve 48 muamelesinin WST-1 analizi sonucuna göre elde edilen değerleri

		24 Saat																
	Kontrol (-)	0.1 uM Cis	0.5 uM Cis	1 uM Cis	5 uM Cis	10 uM Cis	15 uM Cis	20 uM Cis	25 uM Cis	30 uM Cis	35 uM Cis	40 uM Cis	50 uM Cis	60 uM Cis	70 uM Cis	80 uM Cis	90 uM Cis	100 uM Cis
1. deneme	0,98	0,98	0,92	0,93	0,98	1,03	0,97	0,53	0,99	1,09	1,03	1,08	0,99	0,97	0,7	0,95	0,67	0,72
2. deneme	0,95	0,95	0,96	0,88	0,95	0,66	0,67	1,01	1,12	1,05	0,95	0,97	1,06	0,98	0,86	0,85	0,83	0,61
3. deneme	0,99	0,94	0,62	0,96	0,64	0,66	0,75	1,06	0,95	1,16	1,05	1,03	0,86	0,89	0,92	0,96	0,72	0,89
Ortalama	0,97	0,96	0,83	0,92	0,86	0,78	0,79	0,87	1,02	1,1	1,01	1,02	0,97	0,95	0,83	0,92	0,74	0,74

		48 Saat																
	Kontrol (-)	0.1 uM Cis	0.5 uM Cis	1 uM Cis	5 uM Cis	10 uM Cis	15 uM Cis	20 uM Cis	25 uM Cis	30 uM Cis	35 uM Cis	40 uM Cis	50 uM Cis	60 uM Cis	70 uM Cis	80 uM Cis	90 uM Cis	100 uM Cis
1. deneme	1,19	1,2	1,46	1,23	1,16	1,29	1,52	1,41	1,39	1,26	1,54	1,43	1,7	1,29	1,17	1,28	1,15	1,2
2. deneme	1,18	1,22	1,16	1,2	1,34	1,35	1,36	1,43	1,53	1,23	1,43	1,32	1,43	1,15	1,21	1,28	1,46	1,17
3. deneme	1,18	1,2	1,31	1,22	1,36	1,3	1,13	1,06	1,26	1,29	1,62	1,33	1,33	1,22	1,13	1,29	1,54	1,09
Ortalama	1,18	1,21	1,31	1,22	1,29	1,31	1,33	1,3	1,39	1,26	1,53	1,36	1,49	1,22	1,17	1,29	1,38	1,16

WST-1 analizi sonucuna göre 24 saat süresince uygulanan Cis'in HUVEC hücrelerindeki sitotoksik etkisi incelendiğinde 15 μ M Cis dozu %81,66 olduğu, 20 μ M Cis dozu ile muamelesi sonucu canlılık oranı % 89,19 olduğu tespit edildi. Cis'in 48. saatteki sitotoksik etkisi değerlendirildiğinde 15 μ M Cis dozu ile muamelesi sonucu canlılık oranı % 112,61 olduğu, AGS hücrelerinde belirlenen etkin doz olan 20 μ M Cis için canlılık oranı ise % 109,69 olduğu tespit edildi (Şekil 50).



Şekil 50. A: Cis dozları ile muamelesinin HUVEC hücrelerinin 24. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları. **B:** Cis dozları ile muamelesinin HUVEC hücrelerinin 48. saat sonundaki tespit edilen canlılık oranları.

4.1.4. OLE'nin Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Kombinasyon Durumunun AGS Hücreleri Üzerindeki Oluşturaçağı Olası Sinerjik, Additive veya Antagonist Etkinin Belirlenmesi

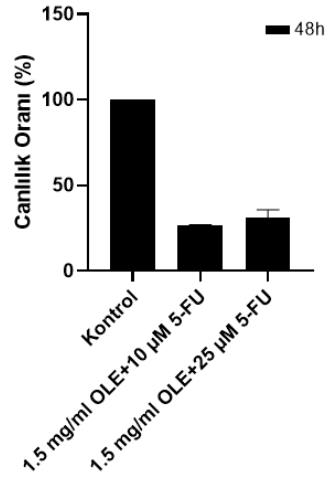
4.1.4.1. OLE ve 5-Fluorourasil Kombinasyonunun AGS Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

AGS hücrelerindeki OLE'nin 5-FU ile birlikte kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine olası etkinliği OLE'nin 24. saatindeki etkin dozu olan 1.5 mg/ml'nin, 5-FU'nun 48 saatlik etkin dozu 10 µM ve 25 µM ile birlikte muamele edilmesiyle belirlendi. WST-1 analizi sonucunda elde edilen veriler Tablo 27'de gösterildi (Tablo 27).

Tablo 27. AGS hücrelerindeki 24 saat 1.5 mg/ml OLE ve 48 saat 25 µM 5-FU ile kombinasyonunun WST-1 analiz sonucu

48 Saat			
	Kontrol (-)	10 uM 5-FU+1.5 ole	25 uM 5-FU+1.5 ole
1. deneme	1,08	0,29	0,30
2. deneme	1,16	0,28	0,32
3. deneme	1,06	0,29	0,40
Ortalama	1,10	0,29	0,34

Elde edilen verilere göre tek başına 10 µM 5-FU ve 25 µM 5-FU'ya göre 1.5 mg/ml OLE ile kombin halinde verilen hücrelerin canlılık oranında azalma olduğu belirlendi. 1.5 mg/ml OLE + 10 µM 5-FU, 1.5 mg/ml OLE + 25 µM 5-FU kombin grubunun AGS hücrelerindeki sitotoksik etkisi şekil 51'de ifade edildi (Şekil 51). AGS hücrelerinde 1.5 mg/ml OLE + 10 µM 5-FU, 1.5 mg/ml OLE + 25 µM 5-FU kombin ile muamelesi sonucunda sırasıyla % 26,43 ve % 31,08 canlılık oranlarına sahip olduğu tespit edildi.



Şekil 51. AGS hücrelerindeki OLE+5-FU kombinasyonunun WST-1 analizi sonucuna göre sitotoksik etkisi.

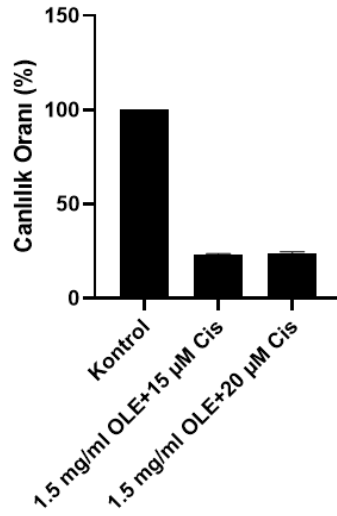
4.1.4.2. OLE ve Cisplatin Kombinasyonunun AGS Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

AGS hücrelerindeki OLE'nin Cis ile birlikte kombinasyonunun hücre canlılığı üzerine olası etkinliği OLE'nin 24. saatindeki etkin dozu olan 1.5 mg/ml'nin, Cis'in 48 saatlik etkin dozu 15 µM ve 20 µM ile birlikte muamele edilmesiyle belirlendi. WST-1 analizi sonucunda elde edilen veriler Tablo 28'de gösterildi (Tablo 28).

Tablo 28. AGS hücrelerindeki 24 saat OLE ve 48 saat Cis ile kombinasyonunun WST-1 analiz sonucu belirlenen canlılık oranları

	48 Saat		
	Kontrol (-)	15 uM cis+1.5 ole	20 uMcis+1.5 ole
1. deneme	1,08	0,25	0,26
2. deneme	1,16	0,25	0,27
3. deneme	1,06	0,24	0,24
Ortalama	1,10	0,25	0,26

WST-1 analizine göre tek başına 15 µM Cis ve 20 µM Cis' e göre 1.5 mg/ml OLE ile kombin halinde verilen hücrelerin canlılık oranında ciddi bir oranda azalma olduğu belirlendi. 1.5 mg/ml OLE + 15 µM Cis, 1.5 mg/ml OLE + 20 µM Cis kombin grubunun AGS hücrelerinde şekil 52'de gösterildiği gibi sitotoksik etkisi analiz edildi (Şekil 52). AGS hücrelerinde 1.5 mg/ml OLE + 15 µM Cis, 1.5 mg/ml OLE + 20 µM Cis kombin ile muamelesi sonucunda sırasıyla % 23,05 ve % 23,56 canlılık oranlarına sahip olduğu tespit edildi.



Şekil 52. AGS hücrelerindeki OLE+Cis kombinasyonunun WST-1 analizi sonucuna göre sitotoksik etkisi.

4.1.4.3. OLE, 5-Fluorourasil ve Cisplatin Üçlü Kombinasyonunun AGS Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

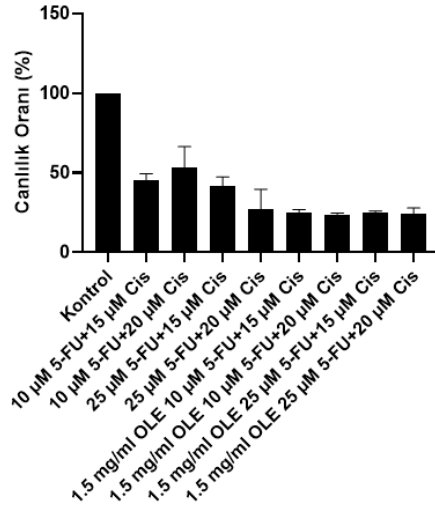
AGS hücrelerindeki OLE, 5-FU ve Cis üçlü kombinasyon durumunun hücre canlılığı üzerine olası etkinliği OLE'nin 24. saatindeki etkin dozu olan 1.5 mg/ml'nin, 5-FU'nun 10µM ve 25µM dozları, Cis'in 15 µM ve 20 µM dozları ile birlikte muamele edilmesiyle belirlendi. WST-1 analizi sonucunda elde edilen veriler Tablo 29'da gösterildi (Tablo 29).

Tablo 29. AGS hücrelerindeki 5-FU+Cis kombinasyonuna OLE'nin üçlü kombinasyonundaki etkisi

	48 Saat								
	Kontrol (-)	10 uM 5-FU+15 uM cis	10 uM 5-FU +20 uM cis	25 uM 5-FU +15 uM cis	25 uM 5-FU +20 uM cis	10 uM 5-FU + 15 uM cis+ole	10 uM 5-FU+20 uM cis+ole	25 uM 5-FU+15 uM cis+ole	25uM 5-FU+20uM cis+ole
1. deneme	1,08	0,55	0,42	0,38	0,41	0,29	0,25	0,26	0,25
2. deneme	1,16	0,47	0,66	0,47	0,34	0,26	0,27	0,29	0,31
3. deneme	1,06	0,48	0,67	0,51	0,14	0,27	0,25	0,26	0,24
Ortalama	1,1	0,5	0,58	0,45	0,3	0,27	0,26	0,27	0,26

WST-1 analizine göre OLE+5-FU+Cis kombinasyonunun Cis ve 5-FU'nun kombin durumuna göre hücrelerin canlılık oranını azalttığı belirlendi. 1.5 mg/ml OLE + 25µ M 5-FU+15 µM Cis, 1.5 mg/ml OLE +25µ M 5-FU + 20 µM Cis, 1.5 mg/ml OLE +10µ M 5-FU + 15 µM Cis, 1.5 mg/ml OLE +10µ M 5-FU + 15 µM Cis ,1.5 mg/ml OLE +25µ M 5-FU + 15 µM Cis, 1.5 mg/ml OLE +25µ M 5-FU + 20 µM Cis, kombin grubunun AGS hücrelerindeki sitotoksik etkisi şekil 53 'de ifade edildi (Şekil

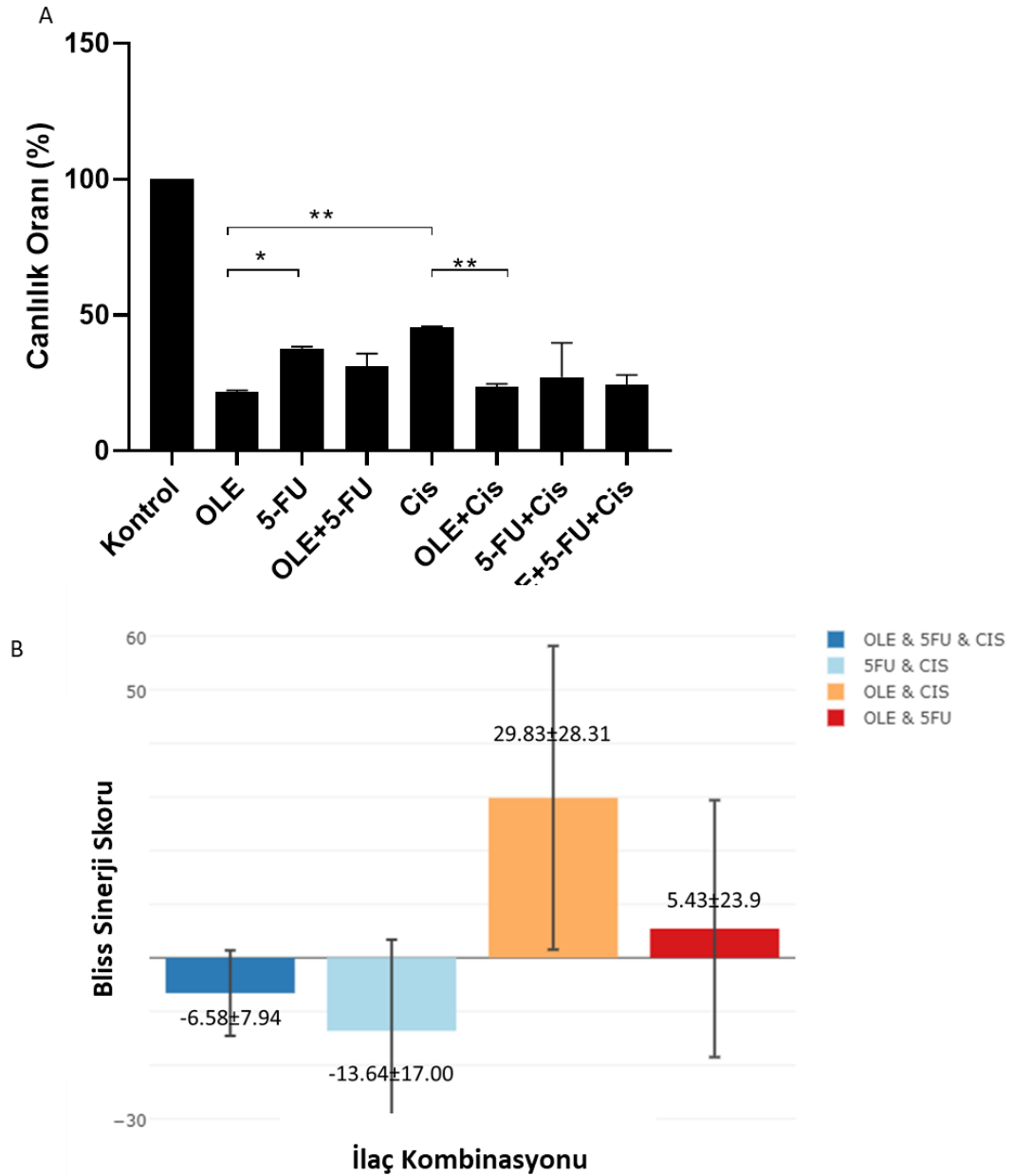
53). AGS hücrelerinde 25 μ M 5-FU+ 20 μ M Cis ile muamele edilen hücrelerin canlılık oranının % 27,19, 1.5 mg/ml OLE+ 25 μ M 5-FU + 20 μ M Cis kombin grubu ile muamelesi sonucunda ise % 24,38 canlılık oranına sahip olduğu tespit edildi.



Şekil 53. AGS hücrelerindeki OLE+5-FU+Cis kombinasyonunun WST-1 analizi sonucuna göre sitotoksik etkisi.

4.1.4.4. OLE'nin 5-Fluorourasil ve Cisplatin ile Kombinasyon Halinde Oluşturacağı Sinerjik, Additive veya Antagonist Etkileşimin Web Tabanlı Program Kullanılarak Değerlendirilmesi

AGS hücrelerinde OLE'nin kemoterapötik ajanlar ile birlikte oluşturacağı muhtemel etkinin analizi için WST-1 analizi gerçekleştirildi. OLE'nin 5-FU, Cis veya bunların kombinasyonları üzerindeki potansiyel sinerjik, additive veya antagonist etkisi, web tabanlı SynergyFinder (versiyon 2.0) kullanılarak hesaplandı. OLE'nin sinerji skoru <-10 kemoterapötik kombinasyonlar antagonistik etki, sinerji skoru -10 ile 10 arasında veya sinerji skoru>10 sırasıyla aditif ve sinerjik etki olarak kabul edildi. Elde edilen veriler doğrultusunda hesaplanan Bliss sinerji skoruna göre 1.5 mg/ml OLE +25 μ M 5-FU kombinasyonunun 5.43 sinerji skoru ile aditif etkisi olduğu belirlendi. Bliss sinerji skoruna göre 1.5 mg/ml OLE + 20 μ M Cis kombinasyonu durumunda 29.83 sinerji skoru ile sinerjik etki gösterdiği tespit edildi. 25 μ M 5-FU + 20 μ M Cis ikili kombinasyon ve 1.5 mg/ml OLE + 25 μ M 5-FU + 20 μ M Cis üçlü kombinasyon durumunda sinerji skoru sırasıyla -13.64, -6.58 olarak bulundu ve sırasıyla antagonistik ve aditif etki gösterdiği tespit edildi (Şekil 54). Sonuç olarak, Bliss modeline göre OLE'nin 5-FU ile kombinasyon halinde aditif, Cis ile kombinasyon halinde sinerjik bir etkiye sahip olduğu belirlendi.



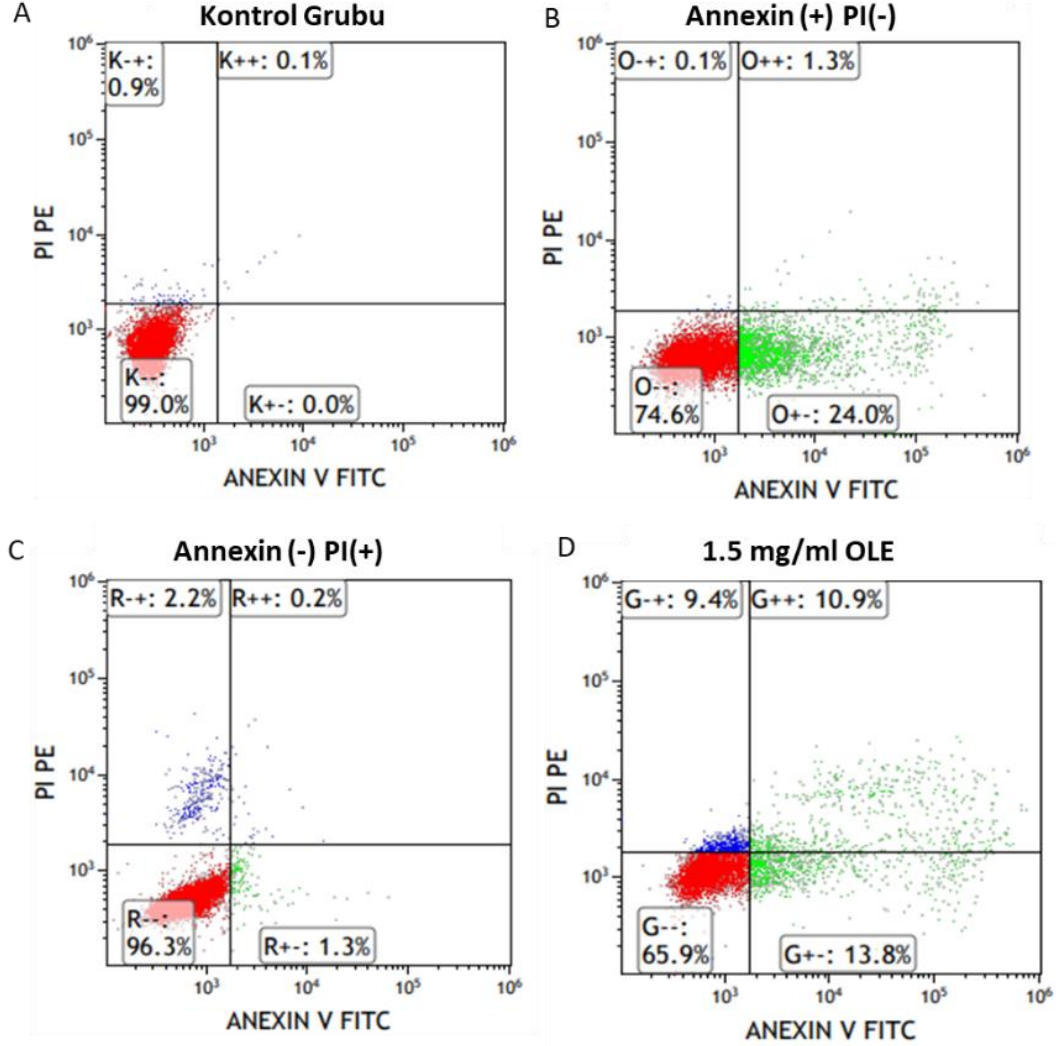
Şekil 54. OLE'nin kemoterapötik ajanları ile kombinasyonunun oluşturacağı sinerjik, additive veya antagonist etkileri. **A:** Yalnızca OLE tedavisinin ve bunun 5-FU ve Cis ile kombinasyonlarının AGS hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin karşılaştırılması. **B:** Bliss sinerji skoruna göre OLE'nin 5-FU ve Cis tedavileri üzerindeki sinerjik, additive veya antagonistik etkileri Kontrol: Muamele edilmemiş AGS hücreleri, OLE: 1.5 mg/ml OLE, 5-FU: 25 µM 5-FU, Cis: 20 µM Cis. * $p < 0,005$, ** $p < 0,0001$

4.2. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerinin Ölümü Üzerindeki Olası Etkinliğinin Belirlenmesi

AGS hücrelerinde OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte hücre ölümü üzerine olan etkisi Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC (Invitrogen™, ABD) kullanılarak analiz edildi.

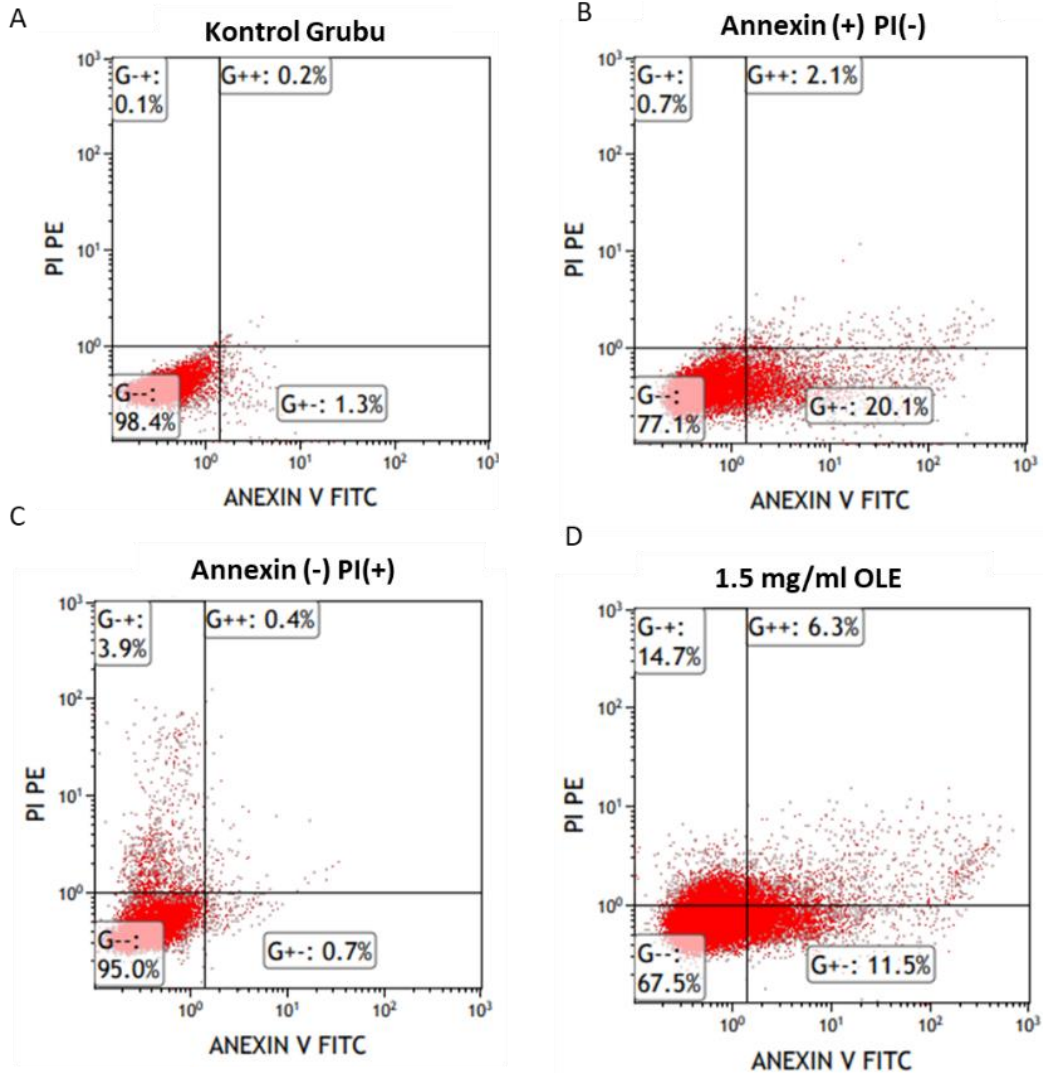
4.2.1. OLE'nin Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisi

1.5 mg/ml OLE'nin 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda % 24.7 apoptotik ve %9.4 nekrotik ölüme neden olduğu tespit edildi (Şekil 55).



Şekil 55. 1.5 mg/ml OLE'nin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda AGS hücre ölümü üzerindeki etkisi **A:** Muamele edilmemiş AGS hücreleri. **B:** Yalnızca Annexin V boyanan hücreler. **C:** Yalnızca PI boyanan hücreler. **D:** 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilen hücreler.

48 saatlik inkübasyon süresi sonucunda ise 1.5 mg/ml OLE'nin hücrelerin % 17.8'inin apoptotik ve % 14.7'inin nekrotik yolla ölümüne neden olduğu tespit edildi (Şekil 56).



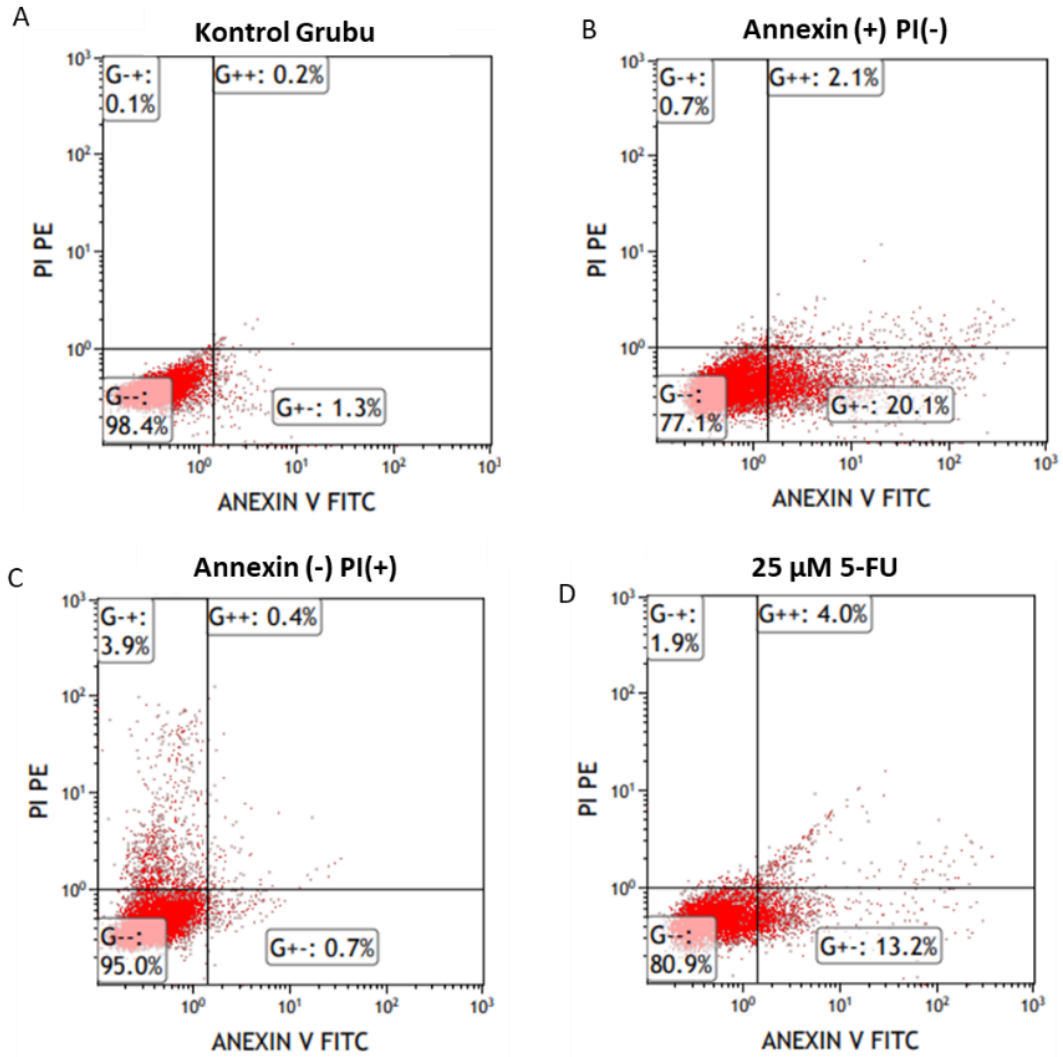
Şekil 56. 1.5 mg/ml OLE'nin 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda AGS hücre ölümü üzerindeki etkisi **A:** Muamele edilmemiş AGS hücreleri. **B:** Yalnızca Annexin V boyanan hücreler. **C:** Yalnızca PI boyanan hücreler. **D:** 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilen hücreler.

Bulgularımız 48 saat ve ileri inkübasyon süresinde OLE'nin nekrotik ölüm oranında artışa neden olduğunu ortaya koymuş olup mevcut deney koşullarımızda AGS hücrelerini apoptotik yolla öldürebilecek optimum OLE muamelesi süresinin 24 saat olduğu tespit edildi.

4.2.2. 5-Fluorourasil'in Tek Başına ve OLE ile Kombinasyon Durumunda Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisi

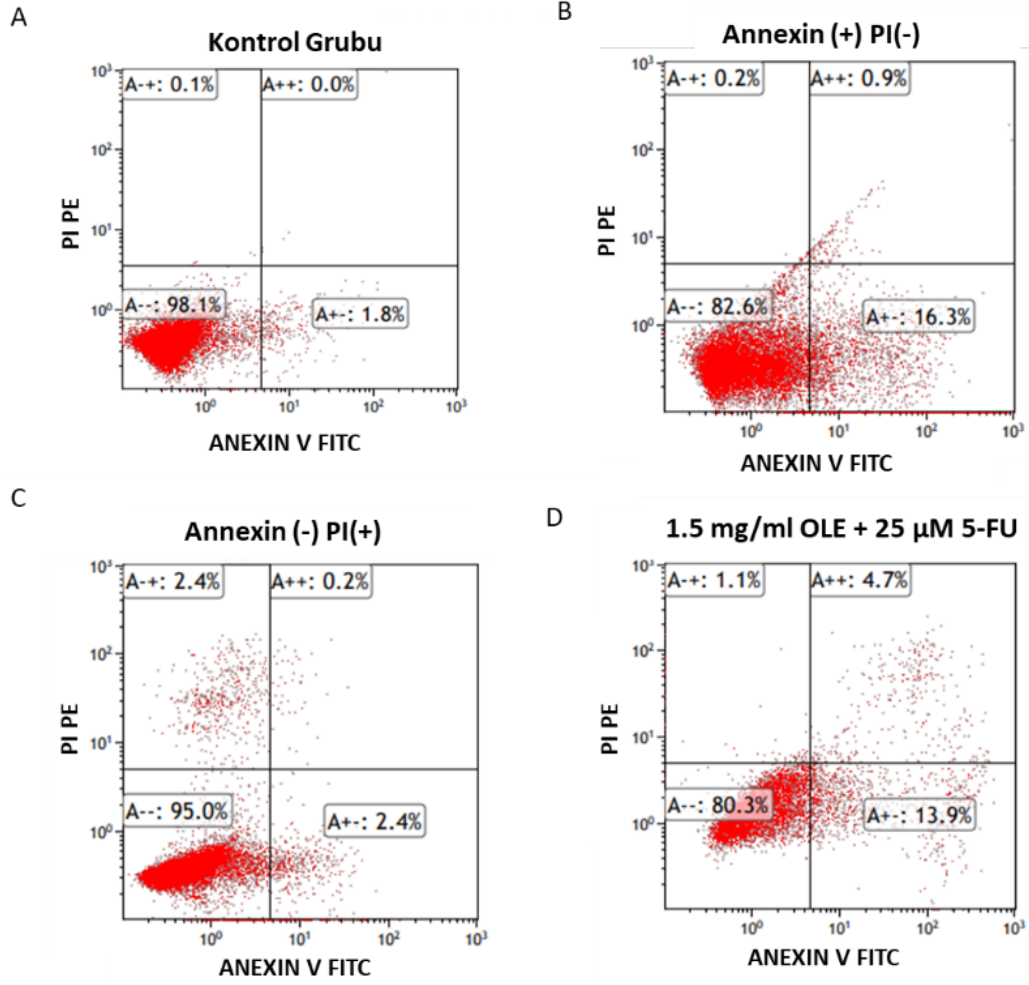
5-FU'nun 25 μ M konsantrasyonunun AGS hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresinde etkili olduğu WST-1 analizinde saptanmış olduğundan, AGS hücreleri 48 saat süresince 25 μ M 5-FU'ya maruz bırakılarak hücre ölüm analizi gerçekleştirildi.

Anneksin V analizi bulgularımız 25 μ M 5-FU'nun hücrelerin %17.2'sinin apoptotik ve %1.9'unun nekrotik yolla ölümüne yol açtığını ortaya koydu (Şekil 57).

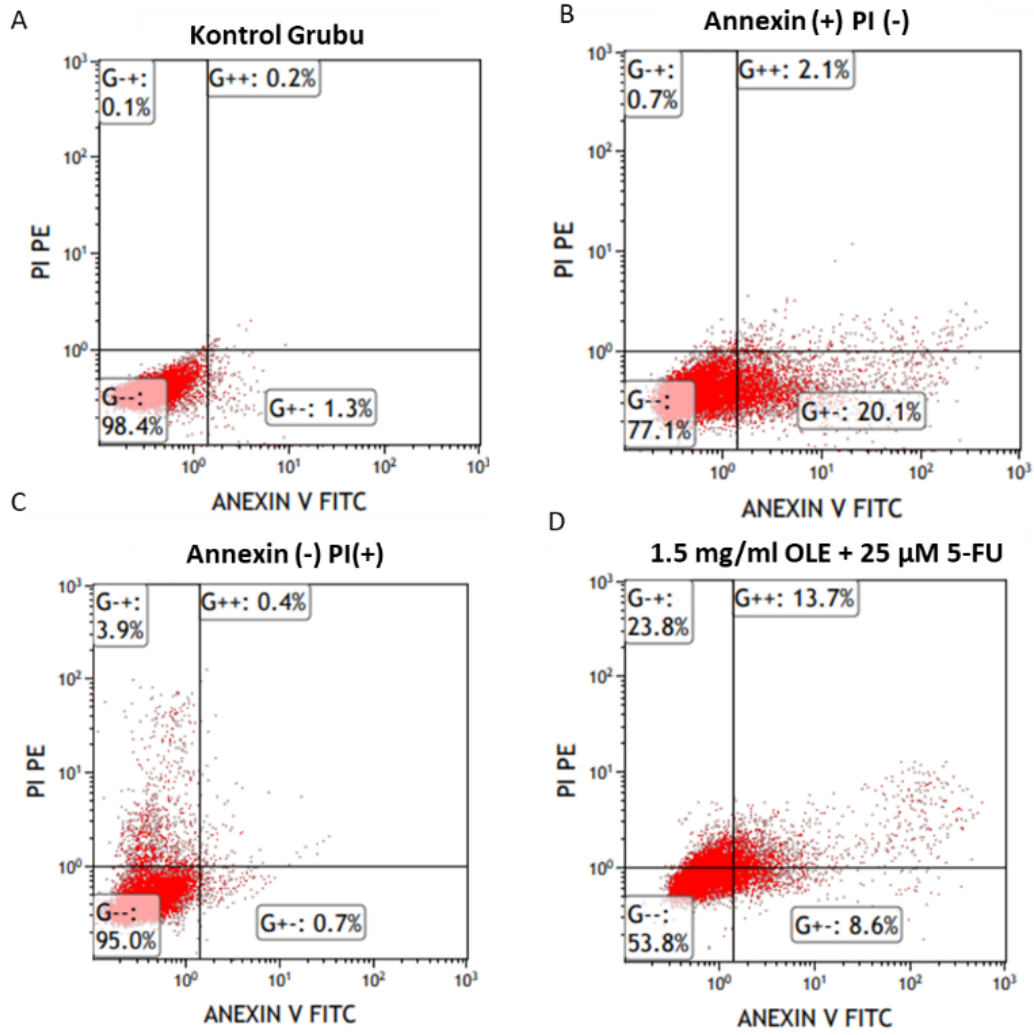


Şekil 57. 25 μ M 5-FU 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda AGS hücre ölümü üzerindeki etkisi **A:** Muamele edilmemiş AGS hücreleri. **B:** Yalnızca Annexin V boyanan hücreler. **C:** Yalnızca PI boyanan hücreler. **D:** 25 μ M 5-FU ile muamele edilen hücreler.

AGS hücrelerinde 1.5 mg/ml OLE'nin 25 μ M 5-FU ile kombinasyonunun 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda %18.6 apoptotik, %1.1 nekrotik yolla öldürdüğü tespit edildi (Şekil 58). WST-1 analizine göre AGS hücrelerinde 25 μ M 5-FU'nun etkili bulunan 48 saatlik inkübasyon süresinin 1.5 mg/ml OLE ile kombinasyonu sonucunda ise %22.3 oranında apoptotik ölüm, %23.8 nekrotik ölüm belirlendi (Şekil 59).



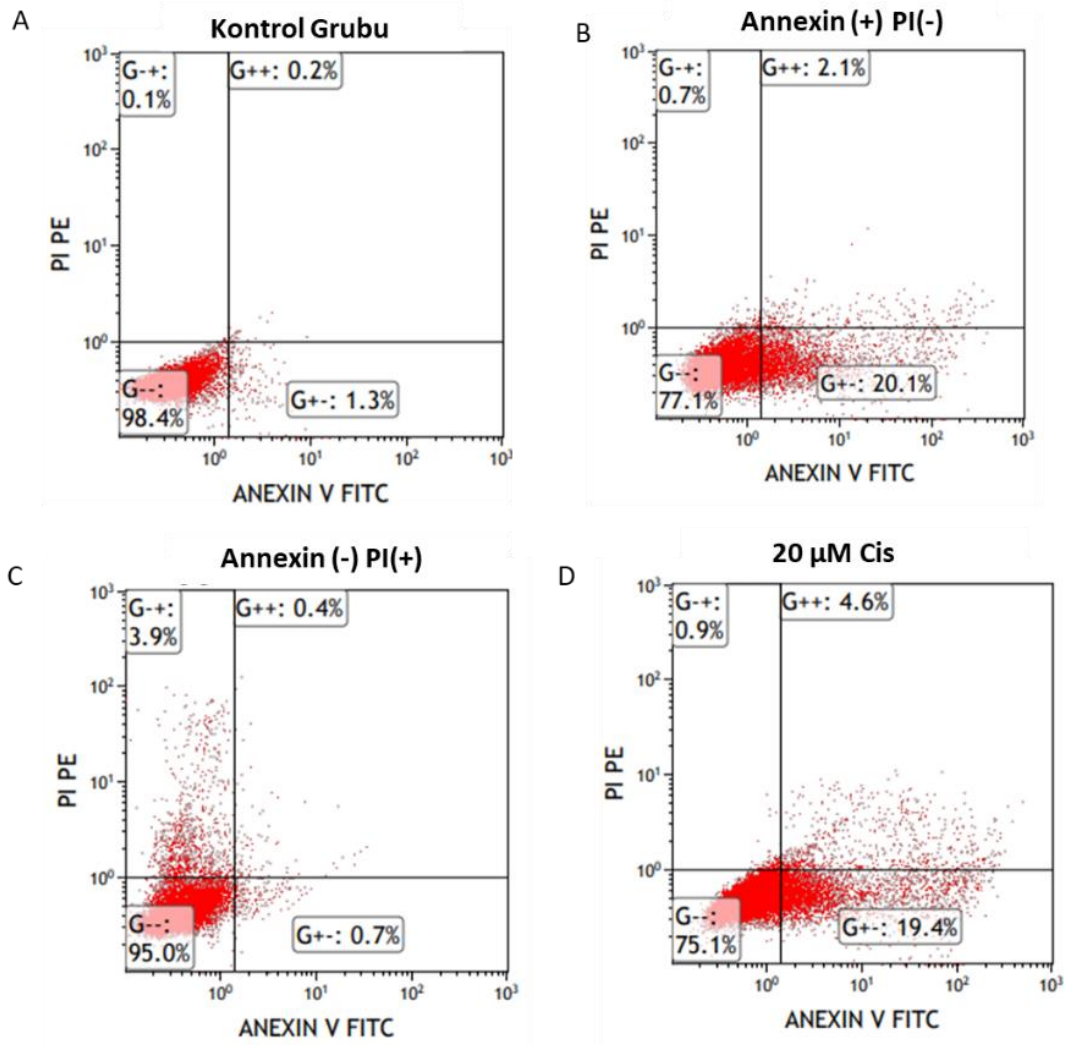
Şekil 58. 1.5 mg/ml OLE+25 µM 5-FU 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda AGS hücre ölümü üzerindeki etkisi **A:** Muamele edilmemiş AGS hücreleri. **B:** Yalnızca Annexin V boyanan hücreler. **C:** Yalnızca PI boyanan hücreler. **D:** 1.5 mg/ml OLE+25 µM 5-FU 24 kombinasyonu ile muamele edilen hücreler.



Şekil 59. 1.5 mg/ml OLE+25 µM 5-FU 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda AGS hücre ölümü üzerindeki etkisi A: Muamele edilmemiş AGS hücreleri. B: Yalnızca Annexin V boyanan hücreler. C: Yalnızca PI boyanan hücreler. D: 1.5 mg/ml OLE+25 µM 5-FU 24 kombinasyonu ile muamele edilen hücreler.

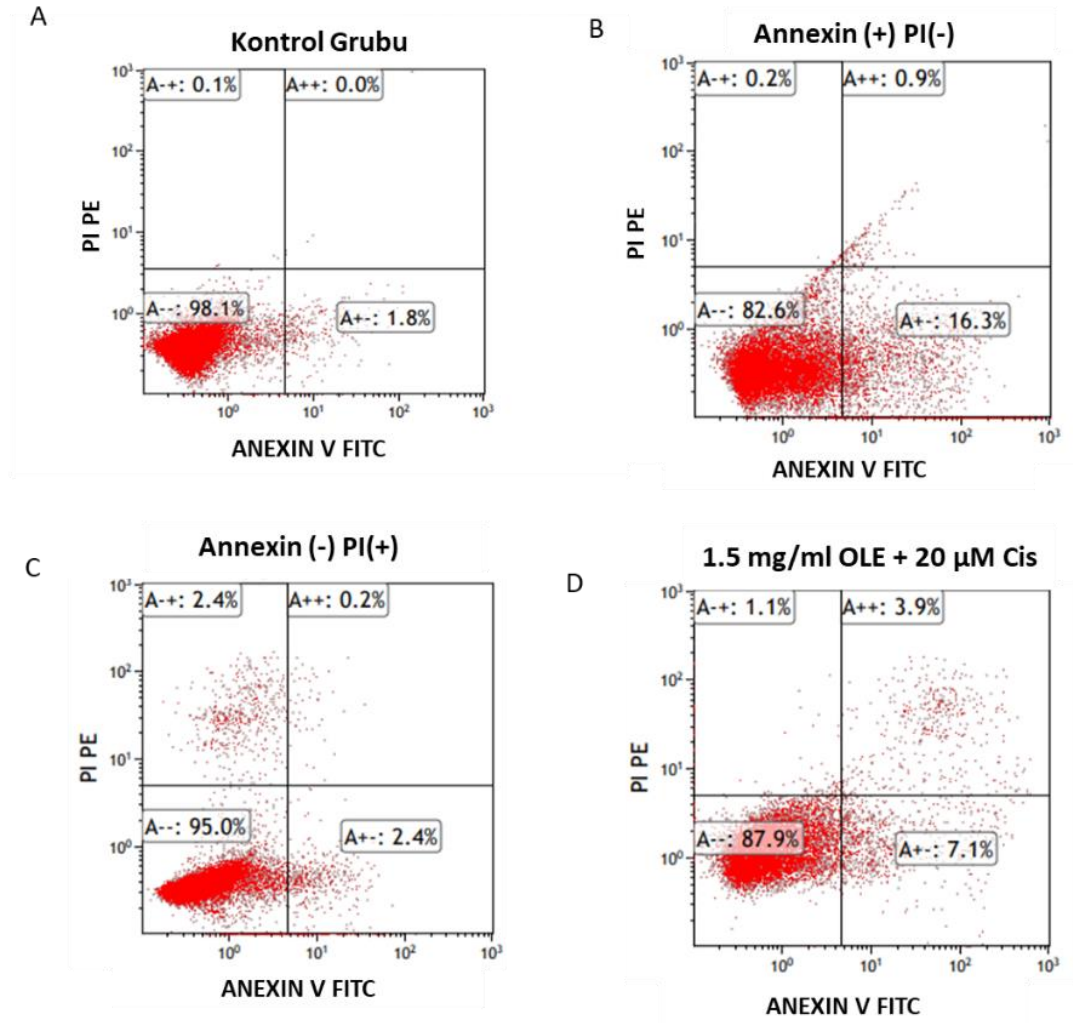
4.2.3. Cisplatin'in Tek Başına ve OLE ile Kombinasyonunun Hücre Ölümü Üzerindeki Etkisi

Annexin V analizine göre AGS hücrelerinde 20 µM Cis'in dozu ile 48 saat muamelesinin sonucunda %24 apoptotik ölüm, % 0.9 oranında nekrotik ölüm belirlendi (Şekil 60).

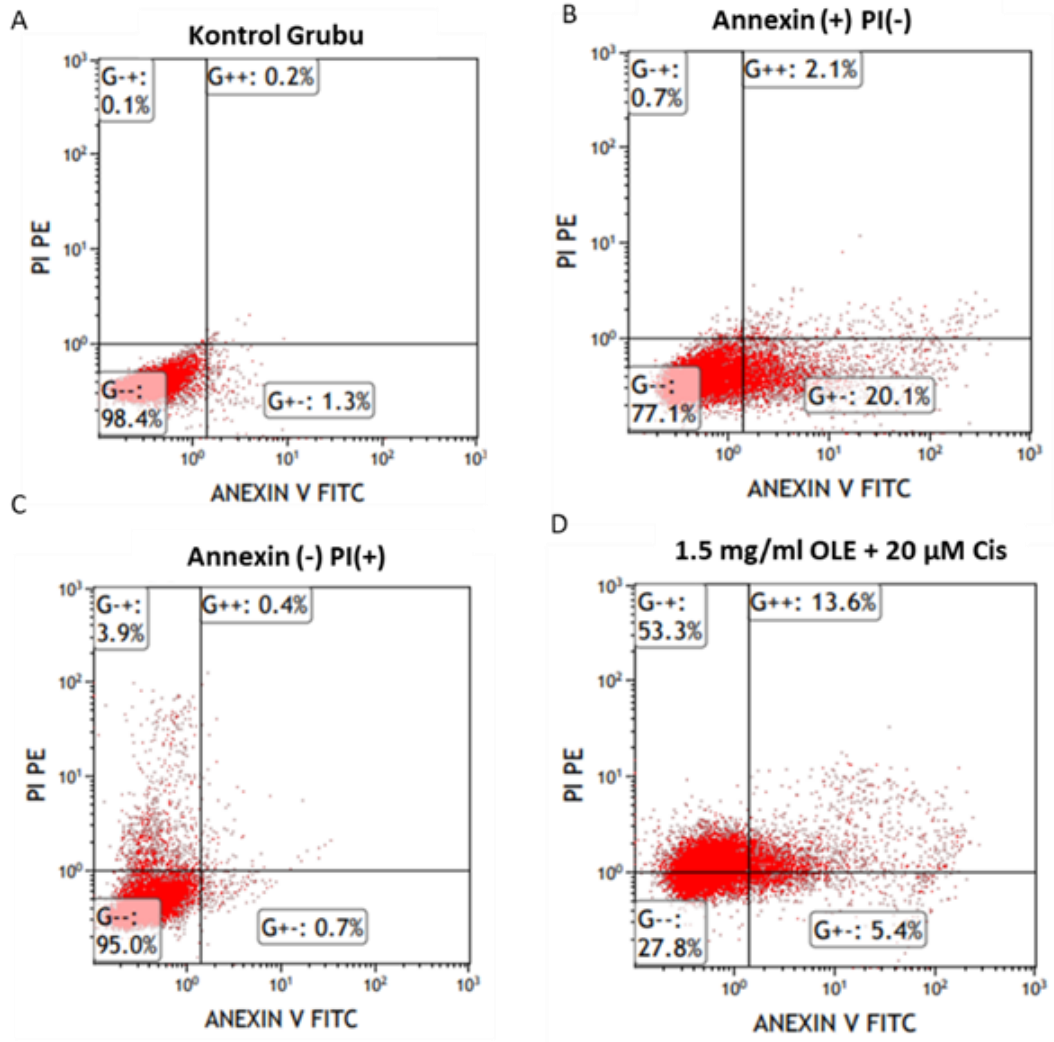


Şekil 60. 20 µM Cis 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda AGS hücre ölümü üzerindeki etkisi **A:** Muamele edilmemiş AGS hücreleri. **B:** Yalnızca Annexin V boyanan hücreler. **C:** Yalnızca PI boyanan hücreler. **D:** 20 µM Cis ile muamele edilen hücreler.

AGS hücrelerinde 1.5 mg/ml OLE'nin 20 µM Cis kombinasyonunun 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda % 11 apoptotik, %1.1 nekrotik yolla öldürdüğü tespit edildi (Şekil 61). WST-1 analizine göre AGS hücrelerinde 20 µM Cis'in etkili bulunan 48 saatlik inkübasyon süresinin 1.5 mg/ml OLE ile kombinasyonu sonucunda ise % 19 oranında apoptotik ölüm, %53.3 nekrotik ölüm belirlendi (Şekil 62).



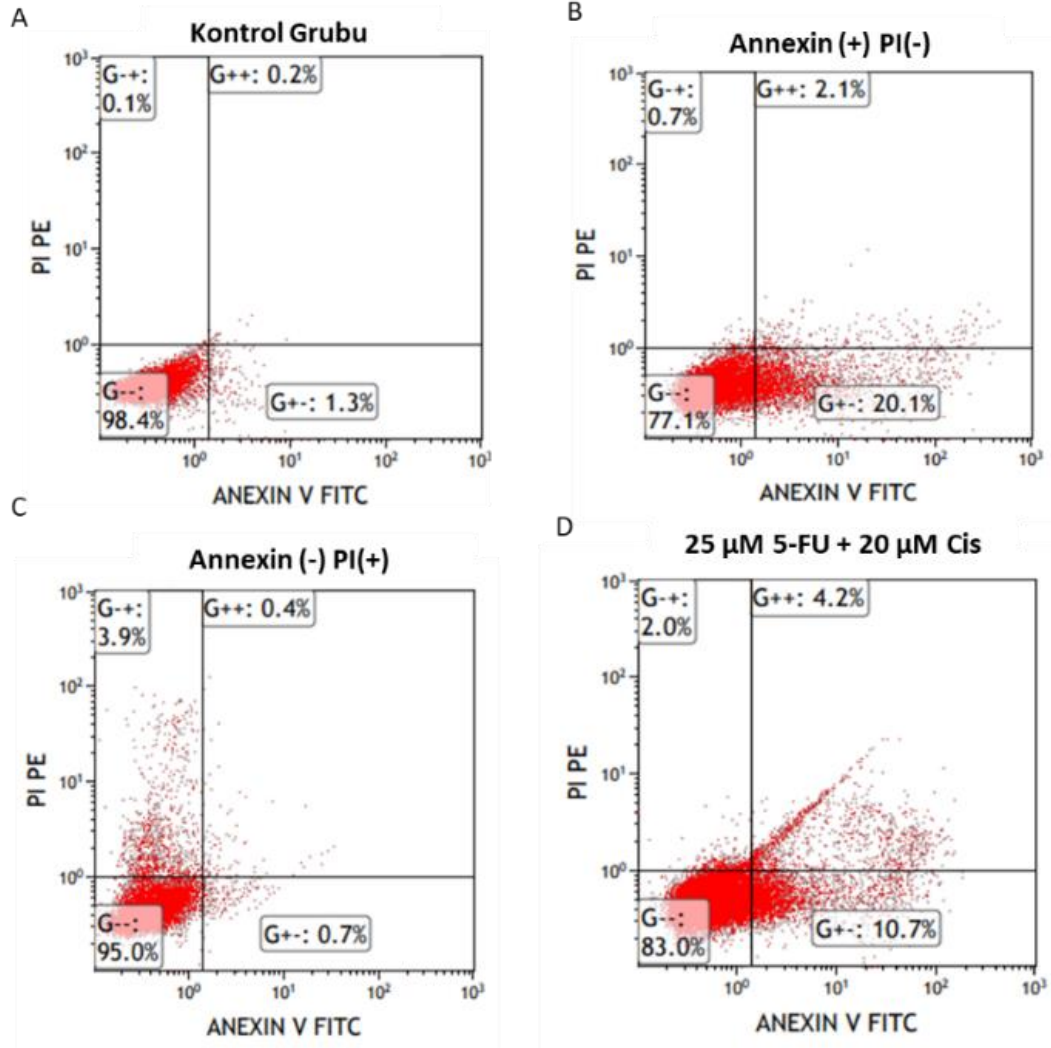
Şekil 61. 1.5 mg/ml OLE+20 µM Cis 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda AGS hücre ölümü üzerindeki etkisi **A:** Muamele edilmemiş AGS hücreleri. **B:** Yalnızca Annexin V boyanan hücreler. **C:** Yalnızca PI boyanan hücreler. **D:** 1.5 mg/ml OLE+ 20 µM Cis ile muamele edilen hücreler.



Şekil 62. 1.5 mg/ml OLE+20 µM Cis 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda AGS hücre ölümü üzerindeki etkisi **A:** Muamele edilmemiş AGS hücreleri. **B:** Yalnızca Annexin V boyanan hücreler. **C:** Yalnızca PI boyanan hücreler. **D:** 1.5 mg/ml OLE+ 20 µM Cis ile muamele edilen hücreler.

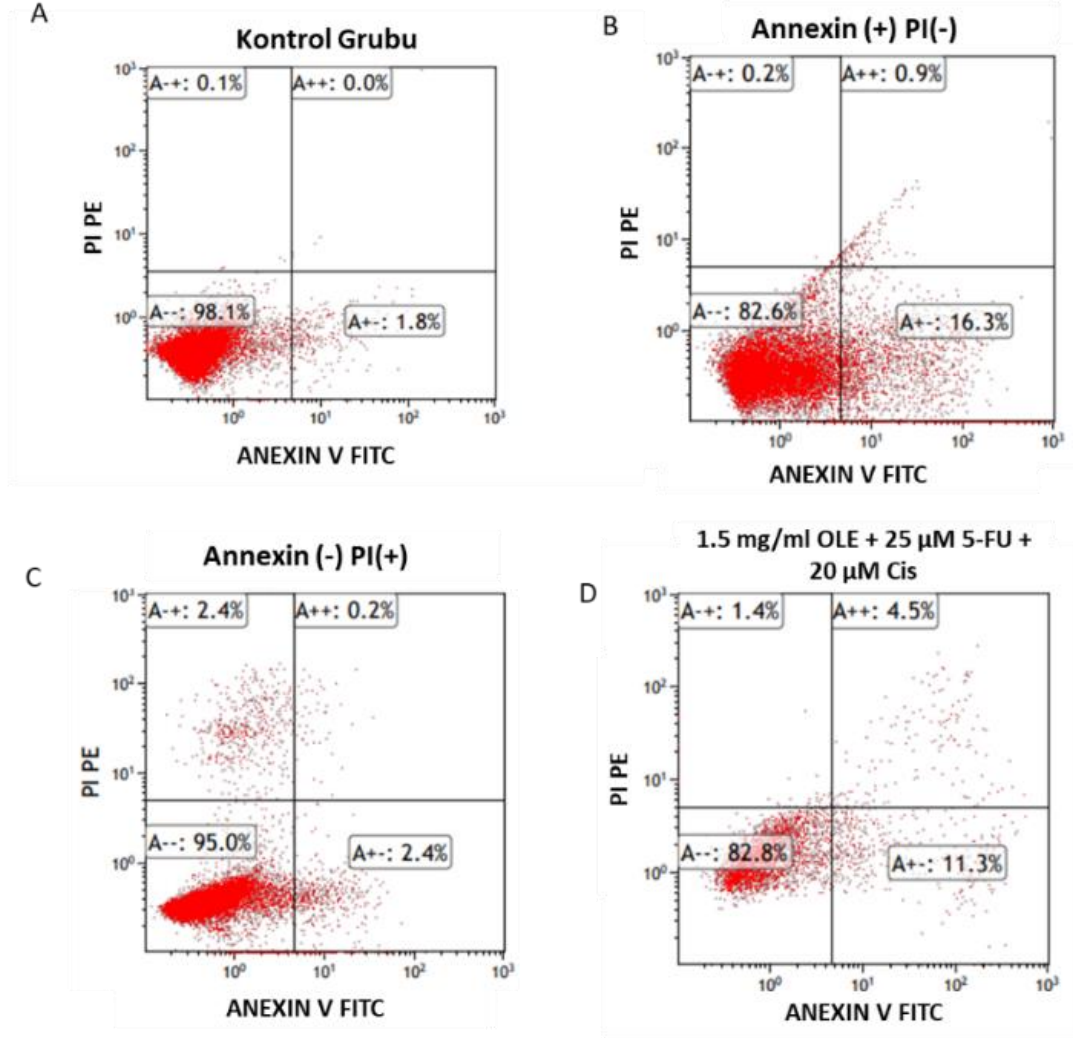
4.2.4. AGS hücrelerinde 5-Fluorourasil+Cisplatin İkili Kombinasyonunun Tek Başına ve OLE ile Kombinasyonu Durumunda Hücre Ölümüne Etkisi

AGS hücrelerinde 25 µM 5-FU+ 20 µM Cis kombinasyonunun 48 saatlik inkübasyon süresi sonucunda % 14.9 apoptotik, %2 nekrotik yolla öldürdüğü tespit edildi (Şekil 63).

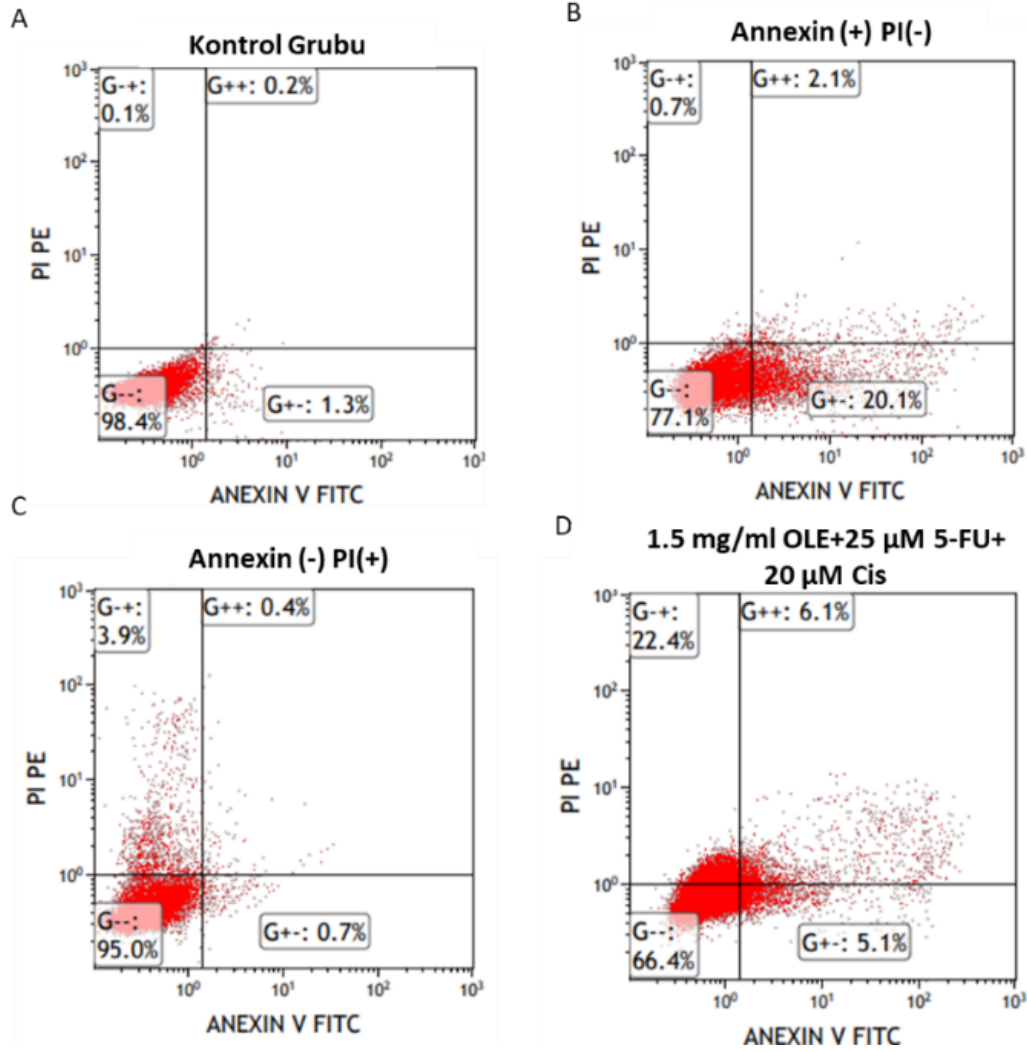


Şekil 63. 25 µM 5-FU+20 µM Cis 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda AGS hücre ölümü üzerindeki etkisi **A:** Muamele edilmemiş AGS hücreleri. **B:** Yalnızca Annexin V boyanan hücreler. **C:** Yalnızca PI boyanan hücreler. **D:** 25 µM 5-FU+20 µM Cis ile muamele edilen hücreler.

AGS hücrelerinde 1.5 mg/ml OLE'nin 25 µM 5-FU+ 20 µM Cis kombinasyonunun 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda % 15.8 apoptotik, %1.4 nekrotik yolla öldürdüğü tespit edildi (Şekil 64). WST-1 analizine göre AGS hücrelerinde 1.5 mg/ml OLE'nin 25 µM 5-FU+ 20 µM Cis kombinasyonunun 48 saatlik inkübasyon sonucuna göre ise % 11.2 oranında apoptotik ölüm, %22.4 nekrotik ölüm belirlendi (Şekil 65).

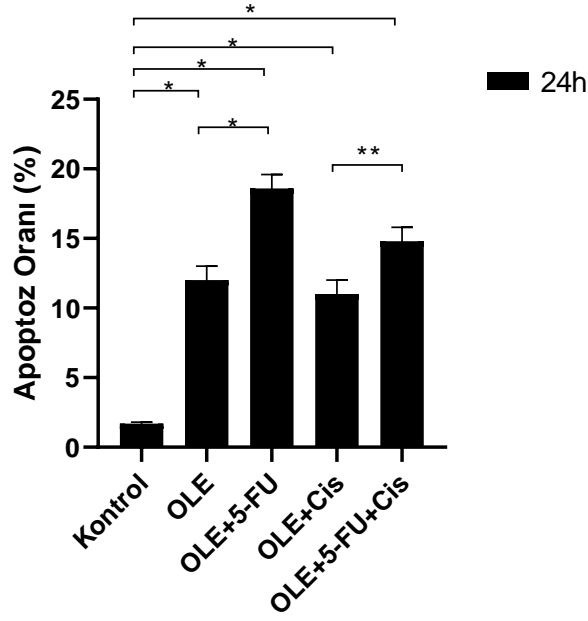


Şekil 64. 1.5 mg/ml OLE+ 25 µM 5-FU+20 µM Cis 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda AGS hücre ölümü üzerindeki etkisi **A:** Muamele edilmemiş AGS hücreleri. **B:** Yalnızca Annexin V boyanan hücreler. **C:** Yalnızca PI boyanan hücreler. **D:** 1.5 mg/ml OLE+ 25 µM 5-FU+20 µM ile muamele edilen hücreler.



Şekil 65. 1.5 mg/ml OLE+ 25 µM 5-FU+20 µM Cis 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda AGS hücre ölümü üzerindeki etkisi **A:** Muamele edilmemiş AGS hücreleri. **B:** Yalnızca Annexin V boyanan hücreler. **C:** Yalnızca PI boyanan hücreler. **D:** 1.5 mg/ml OLE+ 25 µM 5-FU+20 µM ile muamele edilen hücreler.

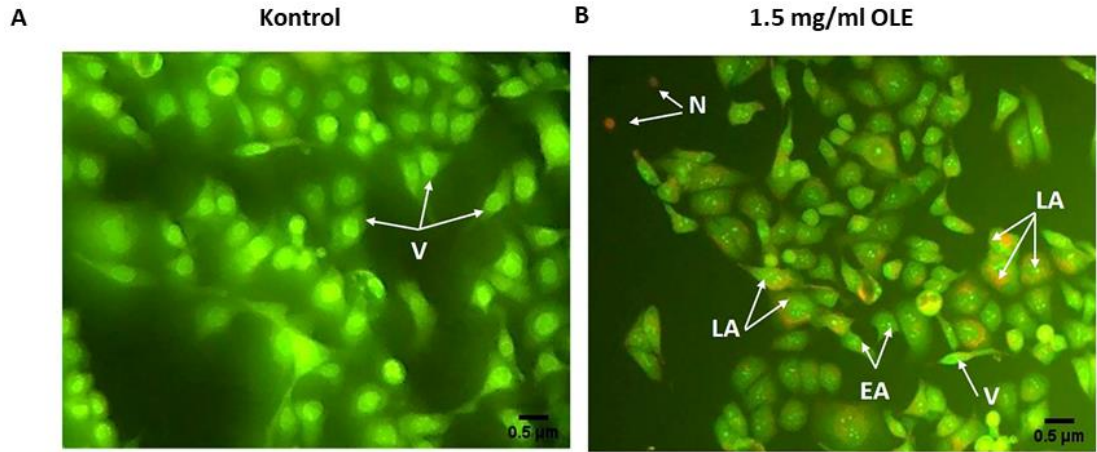
Elde edilen tüm bulgular doğrultusunda 24 saatlik inkübasyonunda OLE'nin tek başına ve 5-FU, Cis ve ve 5-FU+Cis ikili kombinasyonuna ilave eden tedavisinde apoptotik ölümü indükleyici etkisi olduğu saptandı (Şekil 66).



Şekil 66. OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile kombinasyonunun hücre ölümü üzerindeki etkisinin grafik halinde gösterilmesi. **Kontrol:** Muamelesiz AGS hücresi, **OLE:** 1.5 mg/ml OLE, **5-FU:** 25µM 5-FU, **Cis:** 20 µM Cis.

4.2.5. OLE'nin AGS Hücre Morfolojisi Üzerindeki Etkinliğinin Belirlenmesi

OLE ile muamele edilmiş AGS hücrelerinin morfolojik analizi, floresan boya boyama yöntemi olan Akridin Orange (AO)/Propidium İyodür (PI) kullanılarak analiz edildi. (AO)/ (PI) boyaması sonuçlarına göre elde edilen bulgular, 24 saatlik OLE tedavisinin apoptoz yoluyla hücre ölümüyle neden olduğunu gösterdi. Şekil 67'deki görüntüler doğrultusunda OLE ile muamele edilmiş hücrelerin kontrol hücre grubuna kıyasla sağlam yeşil çekirdeğe sahip hücreleri daha az içermesinden dolayı hücre canlılığının daha az olduğu tespit edildi (Şekil 67). AGS hücrelerinin 1.5 mg/ml OLE ile tedavisi sonucunda Şekil 67 B'de görüldüğü gibi çekirdekte yoğun yeşil kromatin yoğunlaşması alanları olan hücreleri içerdiğini ve bunların erken apoptotik hücreler olduğu, yoğun kırmızı kromatin yoğunlaşması alanları olan hücreleri içerdiğini bunların ise geç apoptotik hücreler olduğu tespit edildi. Ek olarak AGS hücrelerinin OLE ile muamelesi sonucunda çekirdeği bozulmamış kırmızı renkli hücreleri içerdiğini ve bunların nekrotik hücreler olduğu saptandı (Şekil 67B).

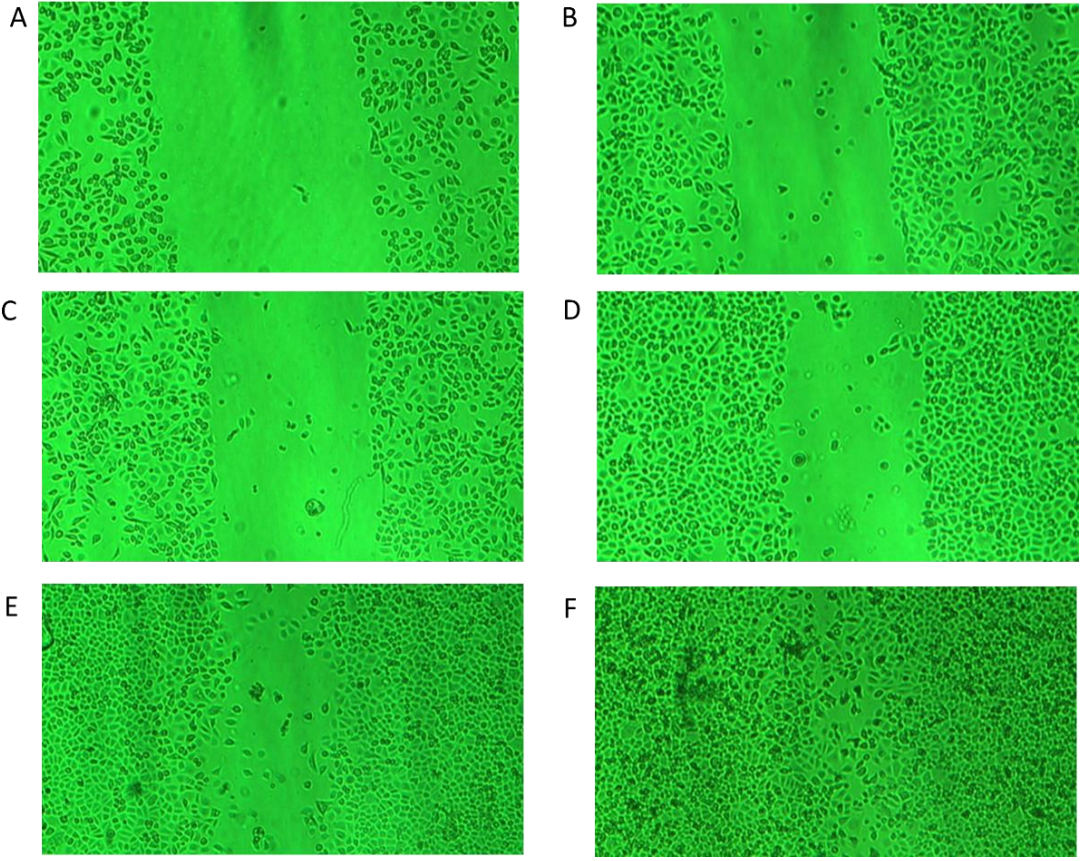


Şekil 67. AGS hücrelerinin AO/PI boyamasından sonra inverted floresan mikroskop görüntüleri. **A:** Kontrol; Muamelesiz AGS hücreleri. **B:** 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilen AGS hücreleri. **V:** Canlı hücre, **EA:** Erken Apoptoz, **LA:** Geç Apoptoz ve **N:** Nekroz.

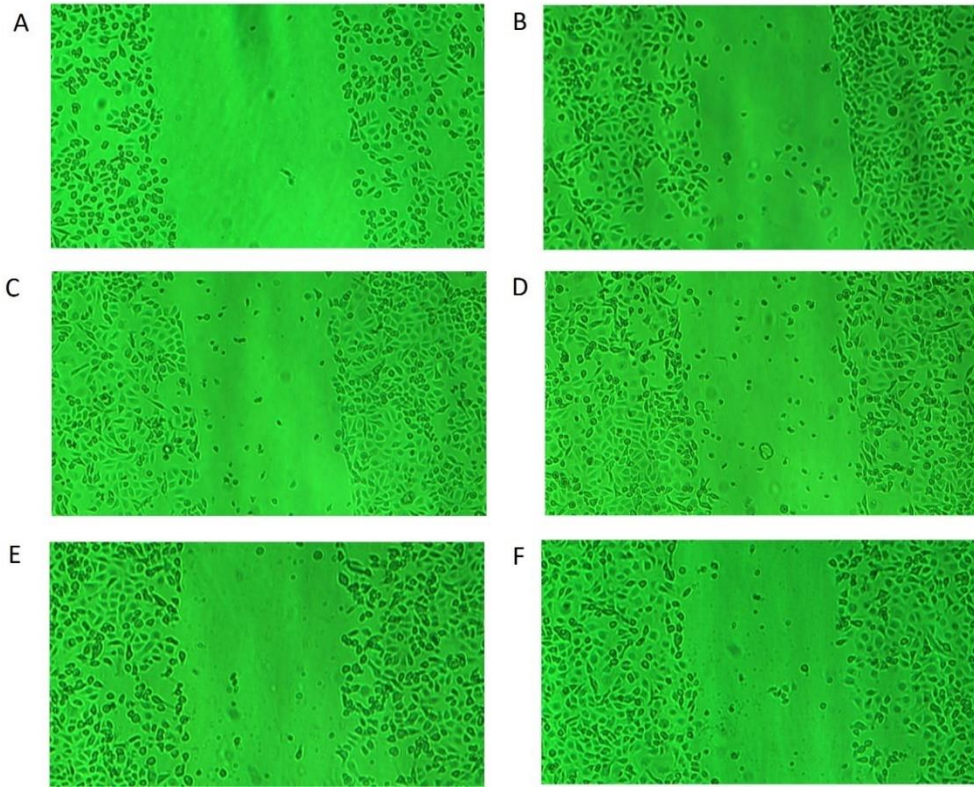
4.3. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerindeki Yara İyileşmesi Üzerindeki Olası Etkinliğinin Belirlenmesi

4.3.1. AGS Hücrelerinde OLE, 5-Fluorourasil, Cisplatin ile Tedavisinin Yara Alanının İyileşmesi Üzerindeki Olası Etkinliğinin Belirlenmesi

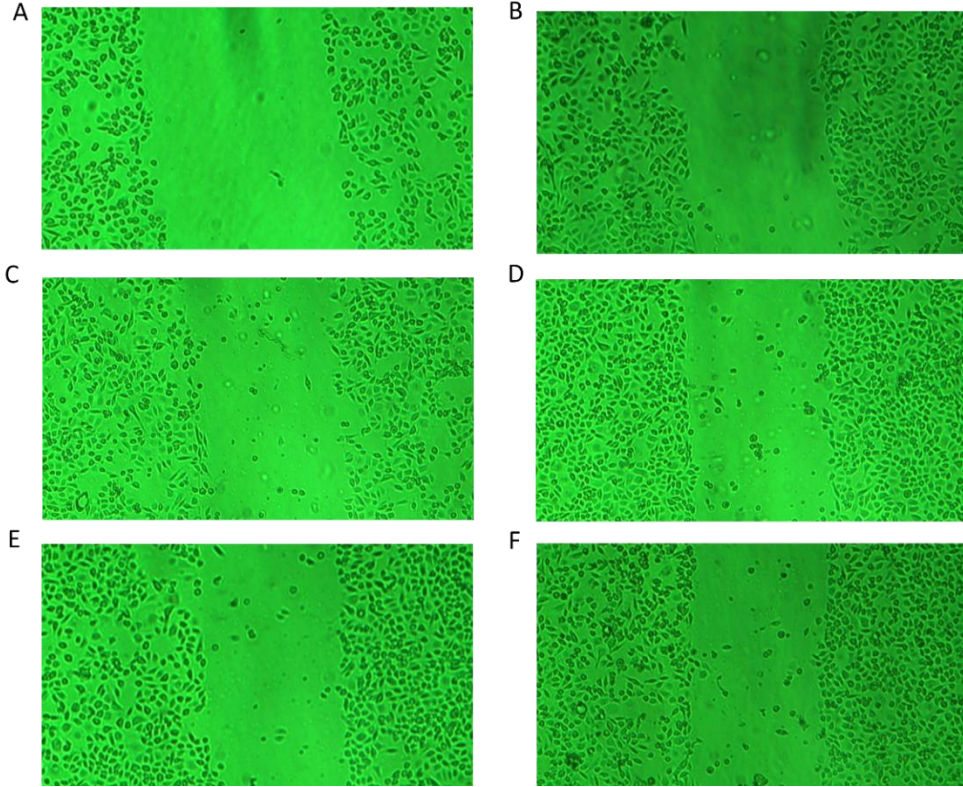
WST-1 analizi sonucuna göre AGS hücreleri için belirlenen OLE dozunun hücrelerin göç yeteneklerine olan etkinliğinin belirlenebilmesi amacı ile yara iyileşmesi deneyi gerçekleştirildi. Yara iyileşmesi deneyinin sonucuna göre muamele edilmeyen AGS hücrelerinde (kontrol grubu) oluşturulan yara alanında doz gruplarına kıyasla ciddi oranda kapanma tespit edildi (Şekil 68). OLE'nin AGS hücrelerinde belirlenen etkin dozu olan 1.5 mg/ml'de ve 25 µM 5-FU için doza bağımlı göç yeteneğinde anlamlı bir azalış belirlendi ($p < 0,0001$; Şekil 69, Şekil 70). AGS hücreleri için etkin doz olarak tespit edilen 20 µM Cis ile muamelesinin sonucunda yara alanında OLE ve 5-FU grubuna kıyasla daha az bir açıklık tespit edildi ($p < 0,0001$; Şekil 71). Cis ile muamele edilen hücre grubunda kontrol grubuna kıyasla hücre morfolojisinde de değişiklik gözlemlendi.



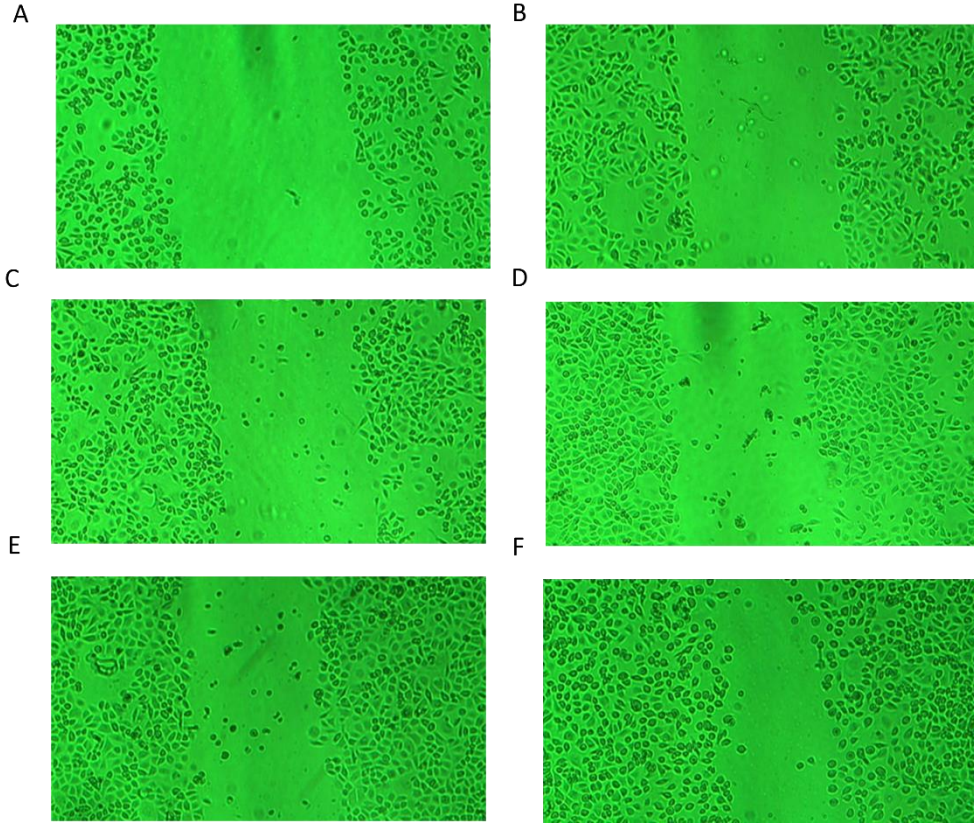
Şekil 68. Muamele edilmemiş (kontrol grubu) AGS hücrelerinin farklı saatlerdeki yara alanının kapanmasının gösterimi. **A:**0h, **B:** 6h, **C:** 12h, **D:** 24h, **E:** 36h, **F:** 48h.



Şekil 69. AGS hücrelerinin 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilmesinin sonucunda farklı saatlerdeki yara alanının kapanmasının gösterimi. **A:**0h, **B:** 6h, **C:** 12h, **D:** 24h, **E:** 36h, **F:** 48h.

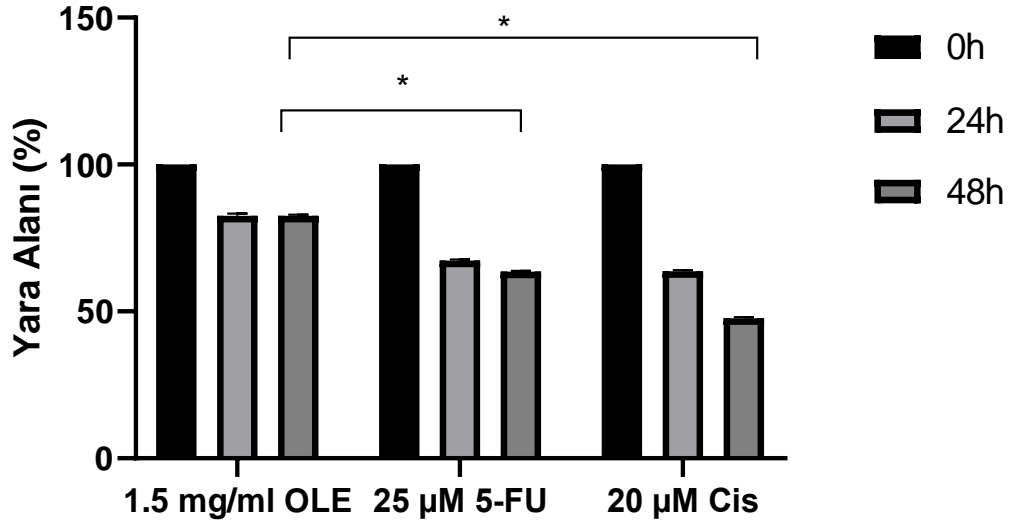


Şekil 70. AGS hücrelerinin 25 µM 5-FU ile muamele edilmesinin sonucunda farklı saatlerdeki yara alanının kapanmasının gösterimi. **A:**0h, **B:** 6h, **C:** 12h, **D:** 24h, **E:** 36h, **F:** 48h.

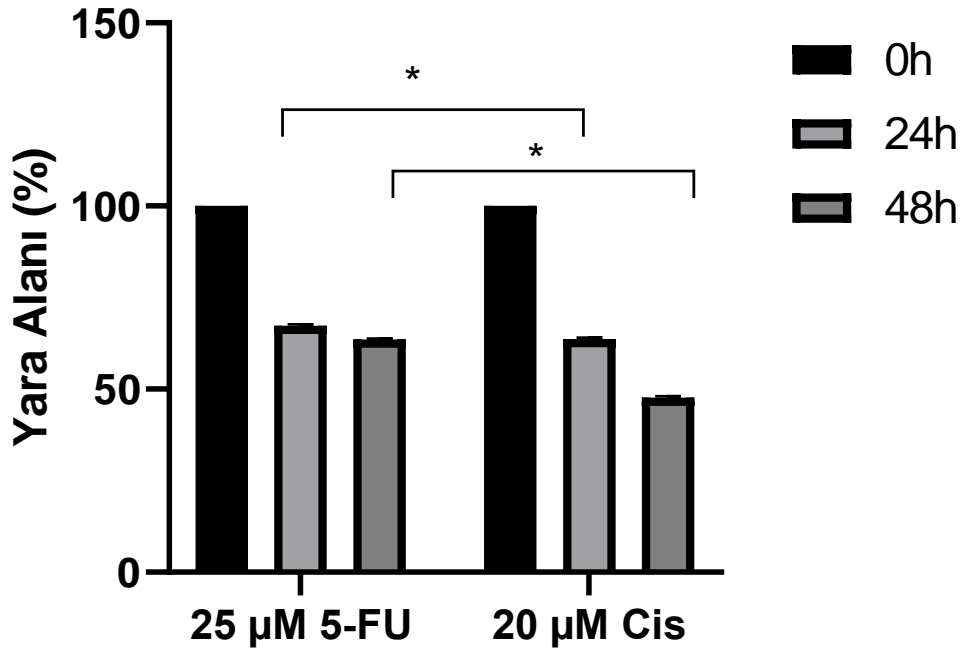


Şekil 71. AGS hücrelerinin 20 μ M Cis ile muamele edilmesinin sonucunda farklı saatlerdeki yara alanının kapanmasının gösterimi. **A:**0h, **B:** 6h, **C:** 12h, **D:** 24h, **E:** 36h, **F:** 48h.

Gerçekleştirilen deney sonucunda doz uygulanmamış (kontrol grubu) AGS hücrelerinin 48. saatin sonunda yara alanında %87,62 oranında kapanma olduğu tespit edildi. 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilen AGS hücrelerinde 48. saatin sonunda yara alanında % 17,31 oranında kapanma gözlemlendi. 25 μ M 5-FU ve 20 μ M Cis ile muamelesinin sonucunda ise sırasıyla 36,78 ve 57,22 oranında kapanma meydana geldi (Şekil 78). 1.5mg/ml OLE ile muamele edilen hücre gruplarında 25 μ M 5-FU ve 20 μ M Cis ile muamele edilen hücrelere göre yara alanında daha fazla açıklık olduğu tespit edildi (Şekil 72). Aynı zamanda 25 μ M 5-FU dozu uygulanan AGS hücrelerinde 20 μ M Cis dozu uygulanan hücrelere göre yara alanında daha fazla açıklık olduğu tespit edildi (Şekil 73).



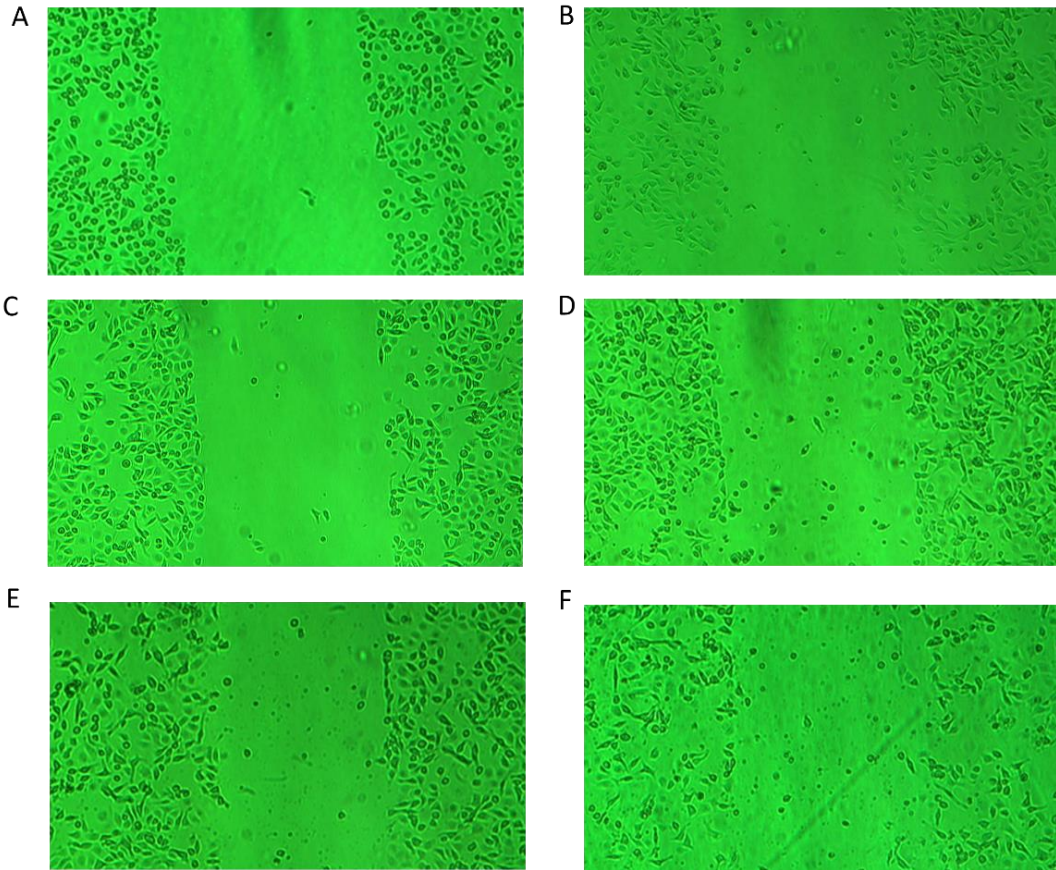
Şekil 72. AGS hücrelerinin 1.5 mg/ml OLE, 25 µM 5-FU ve 20 µM Cis ile muamelesinin sonucunda üç grubun birbirlerine göre kıyaslandığında OLE'nin AGS hücrelerinin migrasyon yeteneğini diğer doz gruplarına göre daha fazla baskıladığı tespit edildi. (* p <0.0001, İki yönlü ANOVA).



Şekil 73. AGS hücrelerinin 25 µM 5-FU ve 20 µM Cis ile muamelesinin sonucunda her iki grubun birbirine göre kıyaslandığında 5-FU'nun AGS hücrelerinin migrasyon yeteneğini Cis ile muamelesinin sonucuna göre daha fazla baskıladığı tespit edildi. (* p <0.0001, İki yönlü ANOVA).

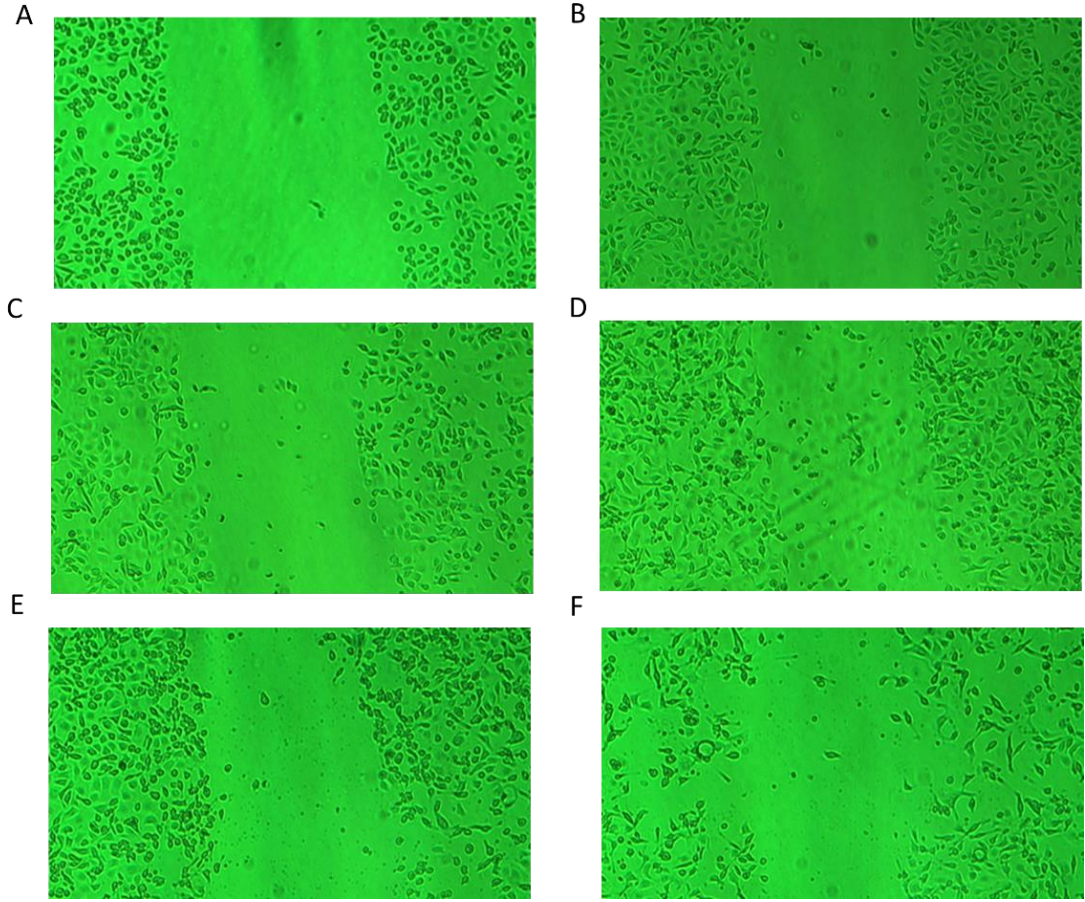
4.3.2. AGS Hücrelerinde OLE'nin 5-Fluorourasil+Cisplatin ile Kombinasyonu Sonucunda Yara Alanının İyileşmesi Üzerindeki Olası Etkiliğinin Belirlenmesi

AGS hücrelerinde WST-1 analizi sonucunda belirlenen OLE'nin etkin dozunun 5-FU ve Cis 'in kombinasyonu durumunda göç yetenekleri üzerine etkileri yara alanı deneyi ile analiz edildi. 1.5 mg/ml OLE, 25 µM 5-FU ve 20 µM Cis ile kombin doz grupları oluşturularak yara alanı oluşturuldu. Yara iyileşmesi deneyinin sonucuna göre muamele edilmeyen AGS hücrelerinde (kontrol grubu) oluşturulan yara alanında kombin doz gruplarına kıyasla ciddi oranda kapanma tespit edildi. OLE + 5-FU kombinasyonu ile muamelesi sonucunda tek başına 5-FU dozu uygulanan hücre gruplarına göre göç yeteneklerini baskılayarak yara alanında anlamlı bir açıklık olduğu tespit edildi ($p<0,0005$; Şekil 74).



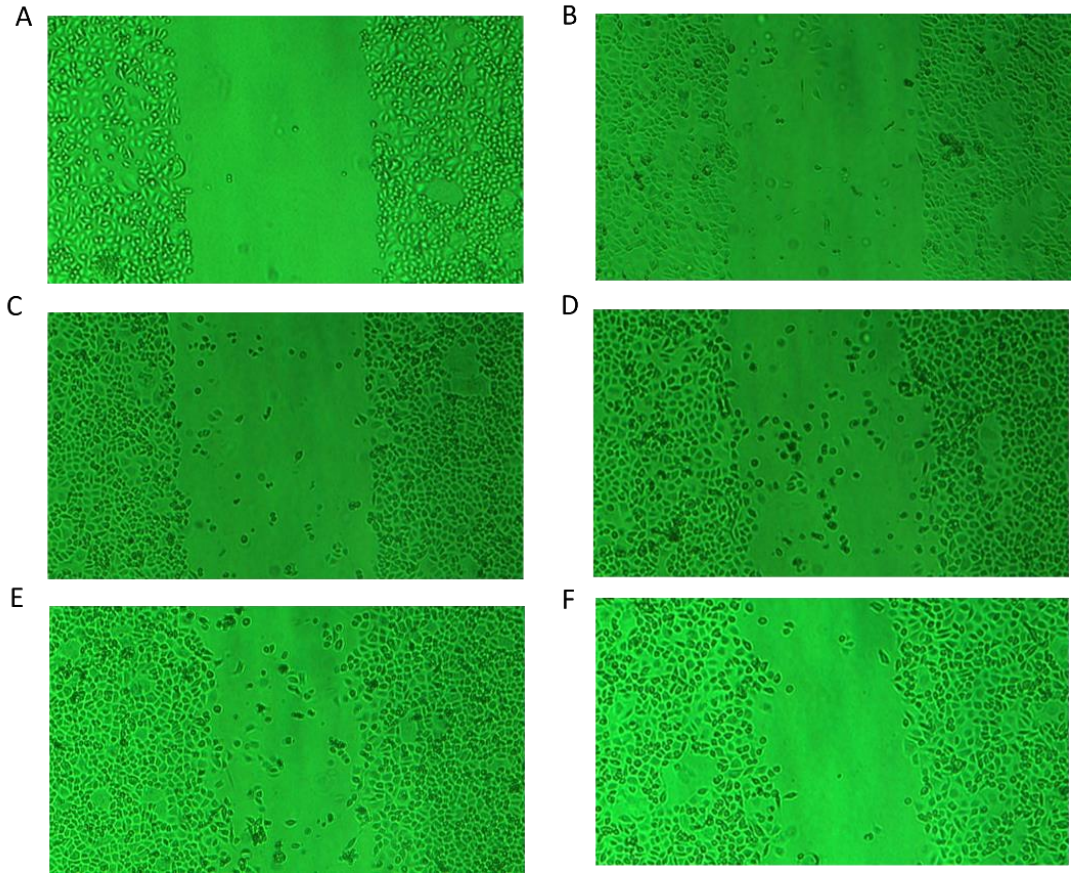
Şekil 74. AGS hücrelerinin 1.5mg/ml OLE + 25 µM 5-FU kombinasyonu ile muamele edilmesinin sonucunda farklı saatlerdeki yara alanının kapanmasının gösterimi. A:0h, B: 6h, C: 12h, D: 24h, E: 36h, F: 48h.

OLE + Cis kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerin tek başına Cis dozu uygulanan hücre gruplarına göre yara alanında anlamlı bir şekilde daha fazla açıklık olduğu tespit edildi ($p<0,0001$; Şekil 75).

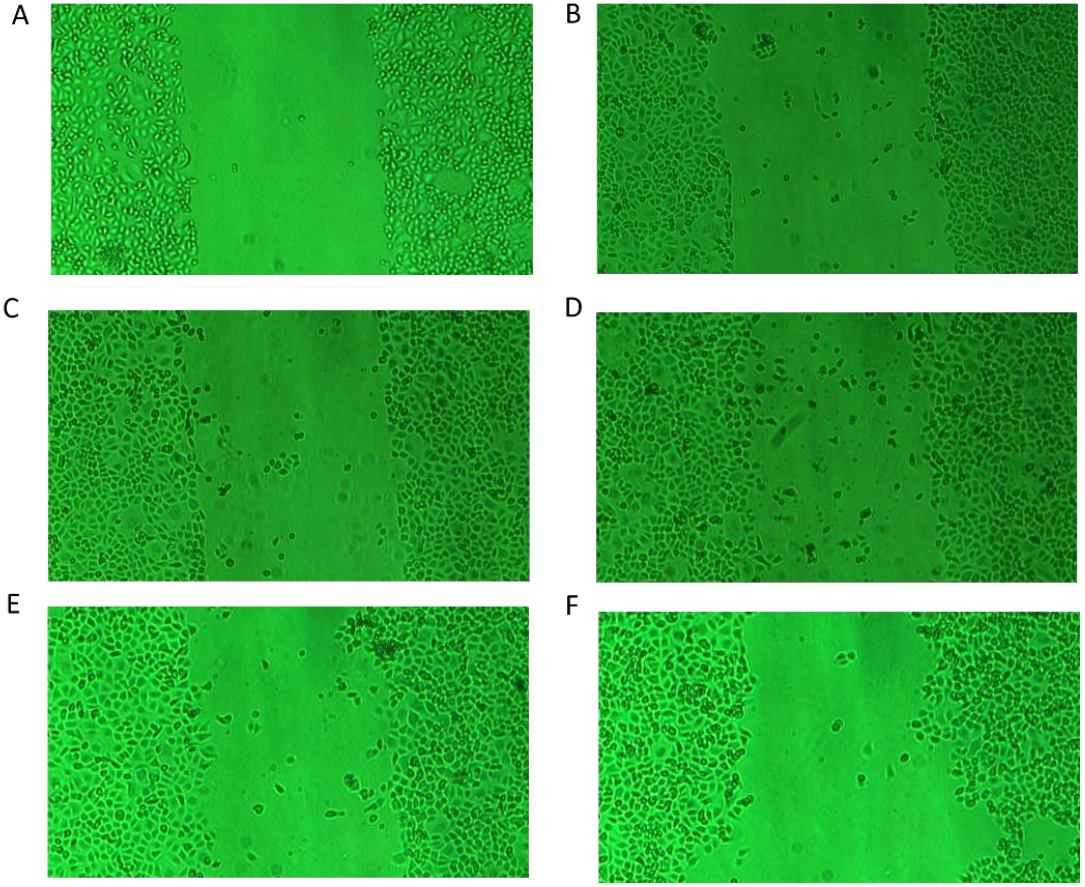


Şekil 75. AGS hücrelerinin 1.5mg/ml OLE + 20 µM Cis kombinasyonu ile muamele edilmesinin sonucunda farklı saatlerdeki yara alanının kapanmasının gösterimi. **A:**0h, **B:** 6h, **C:** 12h, **D:** 24h, **E:** 36h, **F:** 48h.

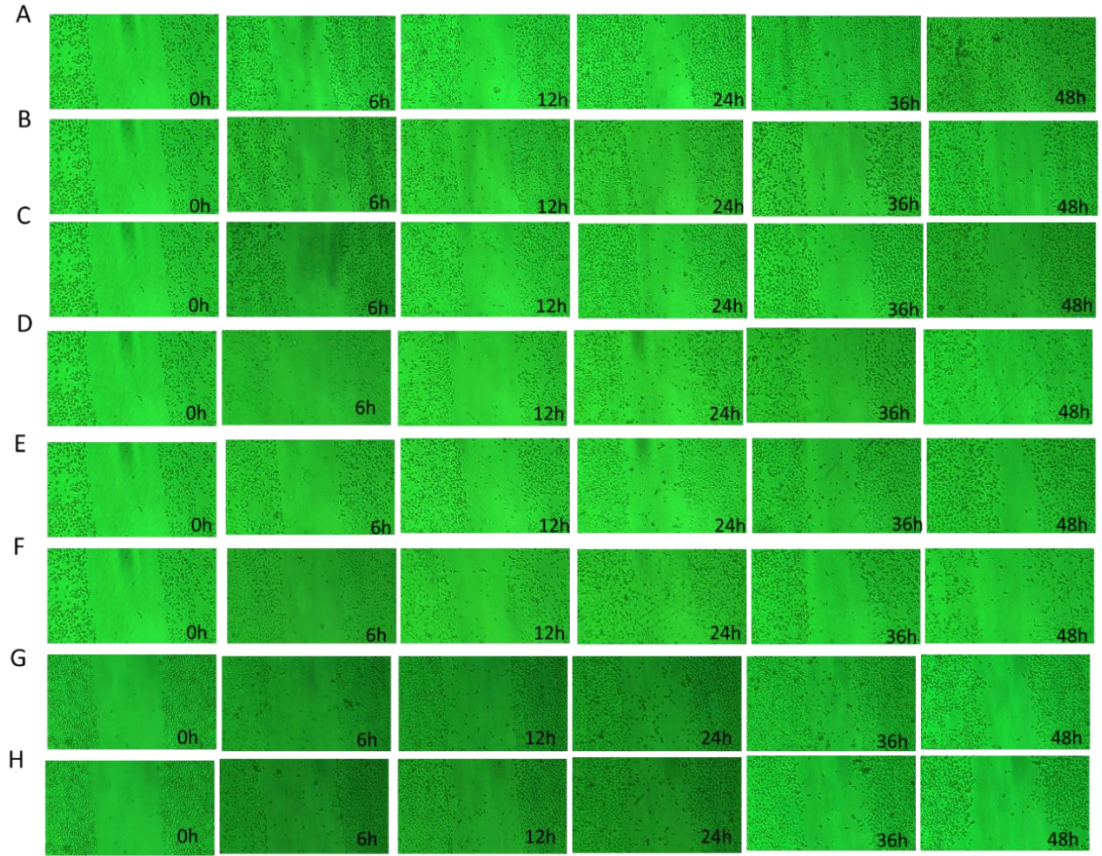
OLE + 5-FU + Cis üçlü kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerde 5-FU + Cis kombinasyonu ile muamele edilen hücrelere göre göç yeteneklerini ciddi oranda baskılayarak yara alanındaki açıklığı anlamlı bir şekilde artırdığı tespit edildi ($p < 0,0002$; Şekil 76). OLE + 5-FU, OLE + Cis ve OLE + 5-FU + Cis kombinasyonlarının tek başına 5-FU, Cis ve 5-FU + Cis kombinasyonu ile muamele edilen hücre grupları ile kıyaslandığında yara alanının kenarlarında yer alan hücre yoğunluklarında bir azalma olduğu tespit edildi. Kontrol grubu hücrelerinde 24 ve 48. saatin sonunda göç yeteneklerinin oldukça yüksek olduğu tespit edildi. Ancak OLE'nin tek başına ve kemoterapi ajanları ile birlikte kombinasyonu sonucunda 24 ve 48. saatin sonunda göç etme oranının oldukça düşük olduğu belirlendi (Şekil 77).



Şekil 76. AGS hücrelerinin 25 μ M 5-FU + 20 μ M Cis kombinasyonu ile muamele edilmesinin sonucunda farklı saatlerdeki yara alanının kapanmasının gösterimi. **A:**0h, **B:** 6h, **C:** 12h, **D:** 24h, **E:** 36h, **F:** 48h.



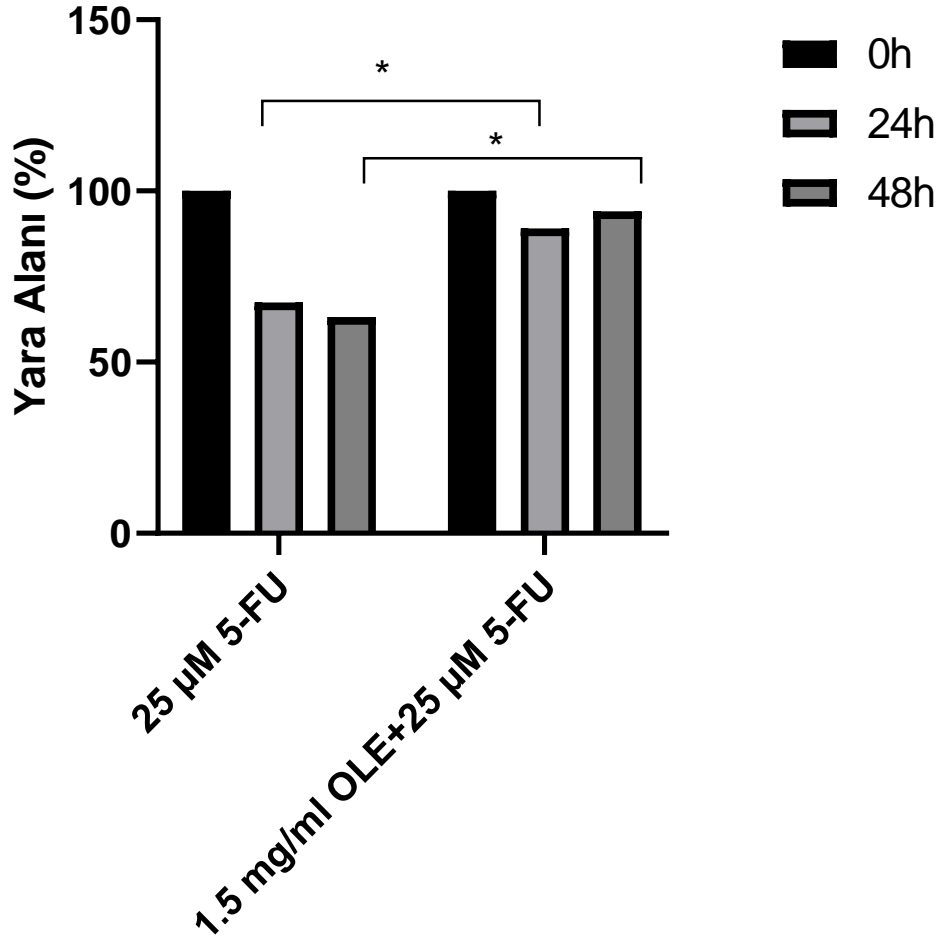
Şekil 77. AGS hücrelerinin 1.5 mg/ml OLE + 25 μ M 5-FU + 20 μ M Cis üçlü kombinasyonu ile muamele edilmesinin sonucunda farklı saatlerdeki yara alanının kapanmasının gösterimi. **A:**0h, **B:** 6h, **C:** 12h, **D:** 24h, **E:** 36h, **F:** 48h.



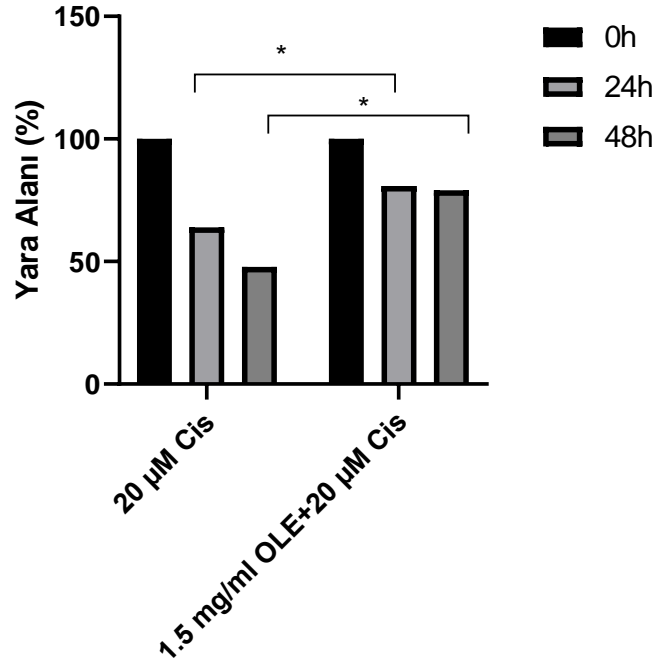
Şekil 78. AGS hücrelerinin farklı doz grupları ile muamelesi sonucunda farklı saatlerdeki yara alanının kapanmasının toplu gösterimi **A:** Muamele edilmemiş AGS hücresi, **B:** 1.5 mg/ml OLE, **C:** 25 µM 5-FU, **D:** 1.5 mg/ml OLE + 25 µM 5-FU **E:** 20 µM Cis, **F:** 1.5 mg/ml OLE + 20 µM Cis, **G:** 25 µM 5-FU + 20 µM Cis, **H:** 1.5 mg/ml OLE + 25 µM 5-FU + 20 µM Cis.

Analiz sonucuna göre 1.5 mg/ml OLE + 25 µM 5-FU muamelesinin sonucunda doz uygulanmamış (kontrol grubu) AGS hücrelerine göre yara alanında % 5,89 oranında kapanma meydana geldi. 1.5 mg/ml OLE + 25 µM 5-FU kombinasyonunun 5-FU'nun tek başına yara alanındaki kapanma oranına göre anlamlı bir azalış olduğu tespit edildi ($p < 0,0001$; Şekil 79). 1.5 mg/ml OLE + 20 µM Cis kombinasyonu sonucunda kontrol grubuna kıyasla yara alanında % 20,91 oranında kapanma tespit edildi. 1.5 mg/ml OLE + 20 µM Cis kombinasyonunun yalnızca Cis dozu uygulanan gruba göre OLE ile kombinasyonunda yara alanında anlamlı oranda artış belirlendi ($p < 0,0001$; Şekil 80). 25 µM 5-FU + 20 µM Cis ikili kombinasyonu ile muamele sonucunda yara alanında % 36,98 oranında kapanma belirlendi. 1.5 mg/ml OLE + 25 µM 5-FU + 20 µM Cis üçlü kombinasyonu ile muamelesi sonucunda yara alanında % 0,98 artış gözlemlendi (Şekil 81). Bütün veriler doğrultusunda OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte AGS hücrelerinin göç yeteneklerini önemli ölçüde baskıladığını ve OLE, 5-FU ve Cis üçlü kombinasyonu sonucunda additive etki

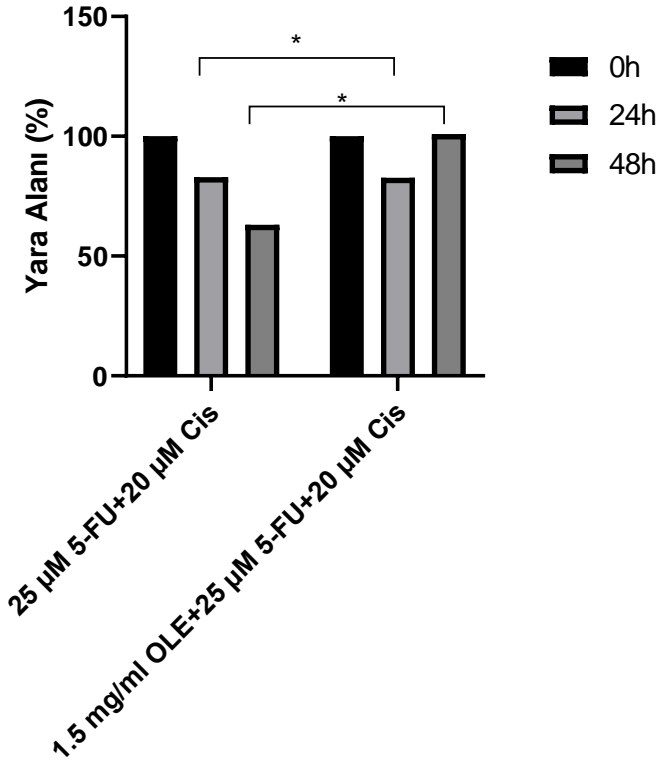
oluşturarak yara alanında kontrol grubuna kıyasla yüksek oranda açıklık oluşturduğu tespit edildi. Tüm veriler doğrultusunda, OLE ve 5-FU'nun AGS hücrelerindeki göç etme yeteneğini önemli ölçüde baskıladığı, Cis'in ise göç etme yeteneğini nispeten yavaşlattığı tespit edildi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$; Şekil 82).



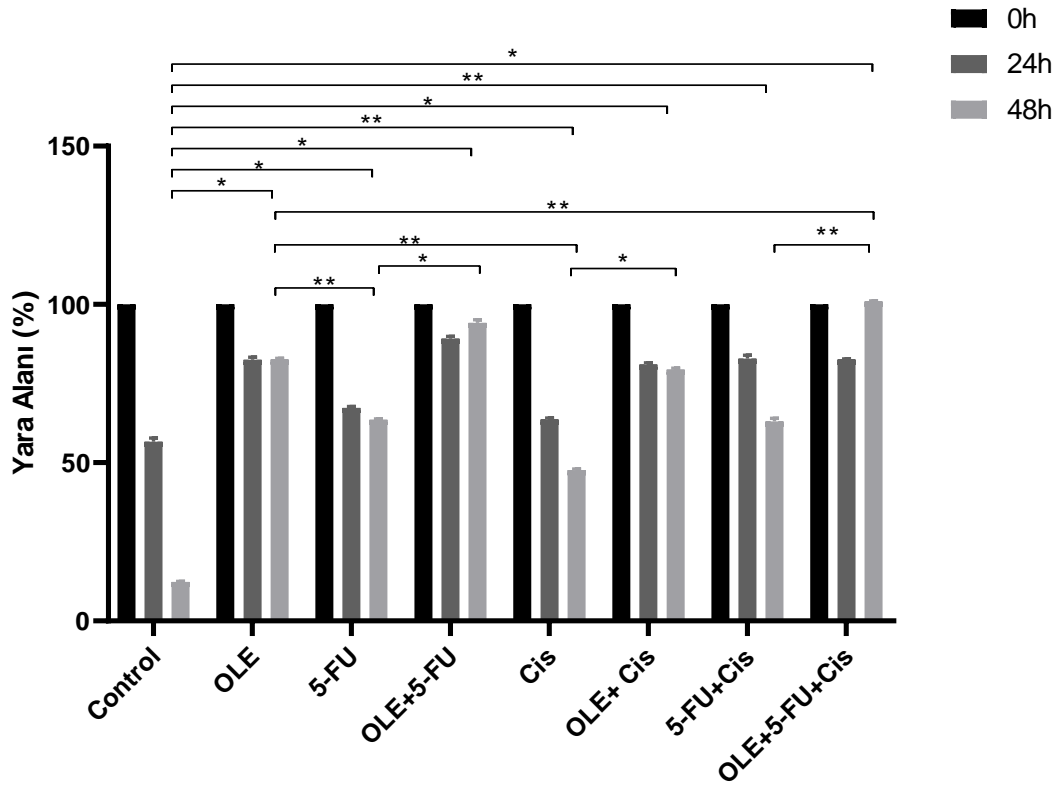
Şekil 79. AGS hücrelerinin 25 µM 5-FU ve 1.5 mg/ml OLE + 25 µM 5-FU ile muamelesinin sonucunda her iki grubun birbirine göre kıyaslandığında OLE + 5-FU kombinasyonunun yalnızca 5-FU dozu ile muamelesine göre AGS hücrelerinin migrasyon yeteneğini daha fazla baskıladığı tespit edildi. (* $p < 0,0005$, İki yönlü ANOVA).



Şekil 80. AGS hücrelerinin 20 µM Cis ve 1.5 mg/ml OLE + 20 µM Cis ile muamelesinin sonucunda her iki grubun birbirine göre kıyaslandığında OLE + Cis kombinasyonunun AGS hücrelerinin migrasyon yeteneğini yalnızca Cis ile muamelesinin sonucuna göre daha fazla baskıladığı tespit edildi (* p < 0,0001, İki yönlü ANOVA).



Şekil 81. AGS hücrelerinin 1.5 mg/ml OLE + 25µM 5-FU+ 20 µM Cis üçlü kombinasyonu ile muamelesinin her iki grubun birbirine göre kıyaslandığında üçlü kombinasyonunun AGS hücrelerinin migrasyon yeteneğini 5-FU + Cis ile muamelesinin sonucuna göre daha fazla baskıladığı tespit edildi (* p < 0,05, İki yönlü ANOVA).



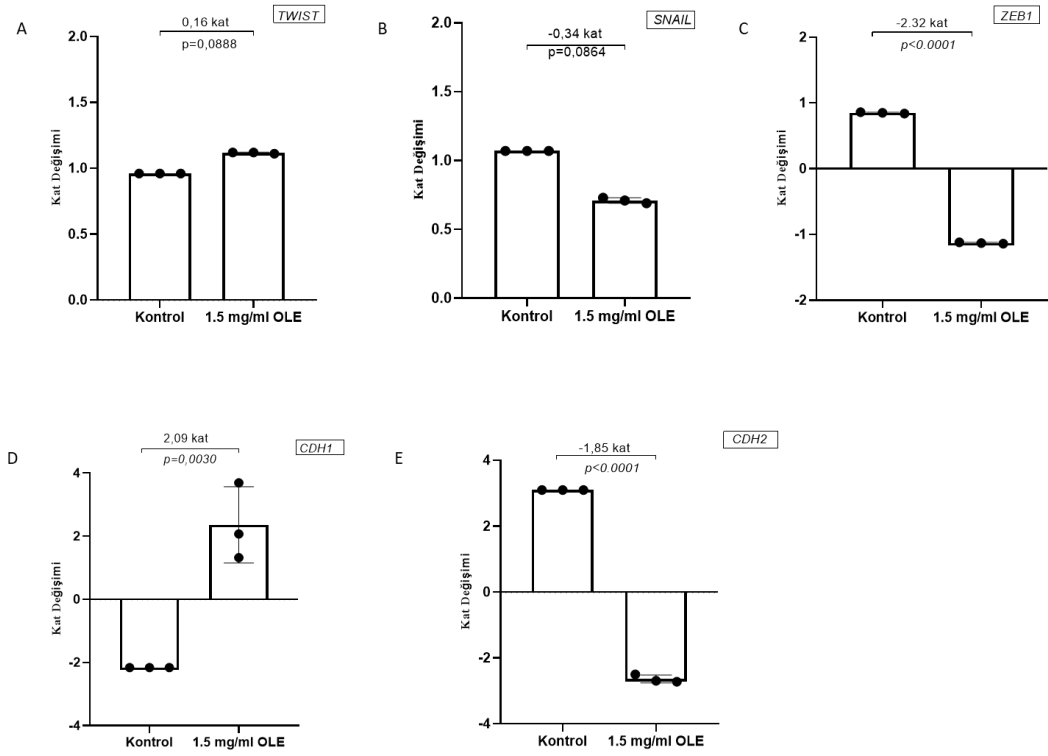
Şekil 82. AGS hücrelerinin tek başına OLE kemoterapötik ajanlar ile birlikte ile muamlesinin sonucunda kontrol hücrelerine kıyasla migrasyon yeteneklerini önemli ölçüde baskıladığı tespit edildi. (*p<0,05,** p <0,0001, İki yönlü ANOVA). **Kontrol:** Muamele edilmemiş AGS hücresi.

4.4. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte Kombinasyonunun Epideryal-Mezenkimal Geçiş Belirteçleri Üzerindeki Etkisi

OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanları ile kombinasyonunun EMT mekanizması üzerindeki etkisi, *TWIST*, *SNAIL*, *ZEB1*, *CDH1* ve *CDH2* genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri analiz edilerek belirlendi (Tablo 30). Elde edilen bulgular sonucunda 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilen hücrelerin muamelesiz (kontrol) AGS hücrelerine kıyasla *ZEB1* (2.12 kat; p=0.0002) ve *CDH2* (1.85 kat; p<0.0001) genlerinin ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalma, *CDH1* (2.09 kat; p=0.0030) geninin ekspresyon seviyesinde anlamlı olarak artış tespit edildi. *TWIST* ve *SNAIL* genlerinin ekspresyon seviyesinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde düşüş gözlemlendi (p=0,0888 ve p=0,0864; Şekil 83).

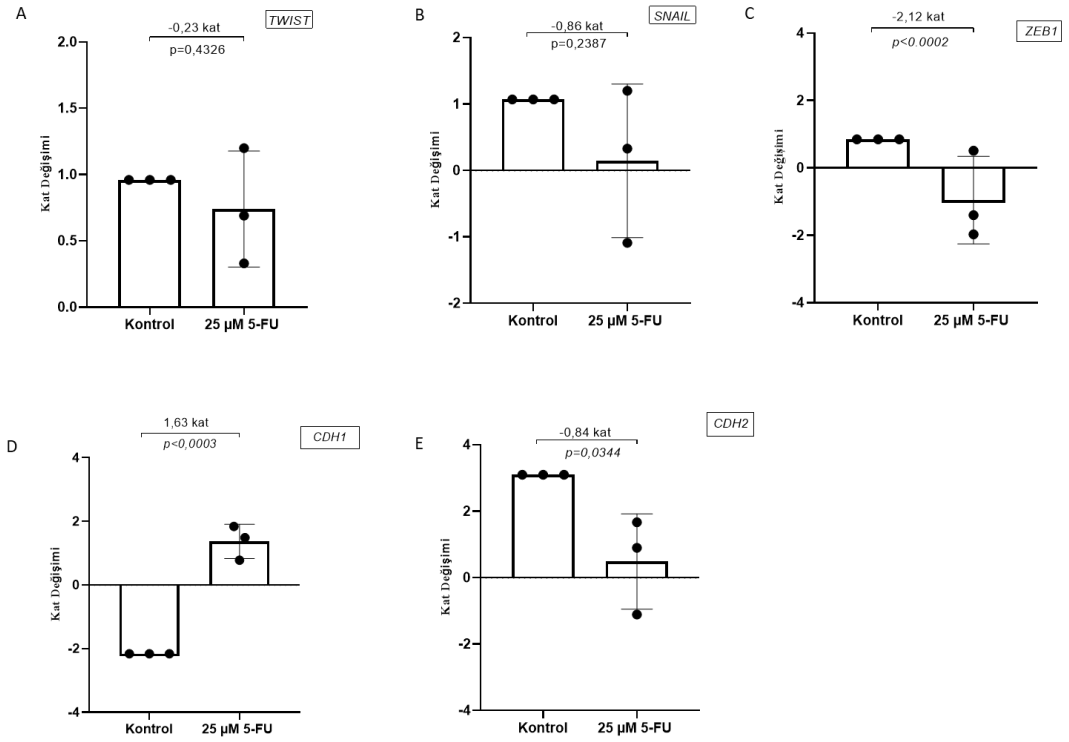
Tablo 30. AGS hücrelerinde EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri

	<i>TWIST</i>	<i>SNAIL</i>	<i>ZEB1</i>	<i>CDH1</i>	<i>CDH2</i>
1.5 mg/ml OLE					
2 ^Δ -ΔCT	0,000506	0,001167	0,000028	0,000644	0,000045
Kat Değişimi	0,16	-0,34	-2,32	2,09	-1,85
p value	p=0,0888	p=0,0864	p<0,0001	p=0,0030	p<0,0001
25 μM 5-FU					
2 ^Δ -ΔCT	0,000476	0,000579	0,000022	0,000488	0,000124
Kat Değişimi	-0,23	-0,86	-2,12	1,63	-0,84
p value	p=0,4326	p=0,2387	p=0,0002	p=0,0003	p=0,0344
1.5 mg/ml OLE + 25 μM 5-FU					
2 ^Δ -ΔCT	0,000576	0,000339	0,000018	0,000398	0,000047
Kat Değişimi	0,96	-1,87	-2,58	1,7	-1,34
p value	p=0,0782	p=0,0147	p=0,0004	p<0,0001	p=0,0103
20 μM Cis					
2 ^Δ -ΔCT	0,001245	-0,22	0,000039	0,00057	0,000103
Kat Değişimi	2,78	0,000737	-0,63	0,88	-1,17
p value	p=0,0284	p=0,5383	p=0,2660	p=0,1052	p=0,0060
1.5 mg/ml OLE 20 μM Cis					
2 ^Δ -ΔCT	0,000955	0,001264	0,000073	0,000088	0,000344
Kat Değişimi	-0,22	-2,51	-0,1	1,43	-0,95
p value	p=0,8493	p<0,0001	p=0,065	p<0,0001	p=0,01
25 μM 5-FU + 20 μM Cis					
2 ^Δ -ΔCT	0,000579	0,000213	0,000016	0,000347	0,000063
Kat Değişimi	0,85	-0,73	-1,38	1,42	-1,13
p value	p=0,1012	p=0,0004	p=0,2153	p<0,0001	p=0,0112
1.5 mg/ml OLE + 25 μM 5-FU + 20 μM Cis					
2 ^Δ -ΔCT	0,000173	0,000759	0,000045	0,001752	0,000007
Kat Değişimi	-0,29	-0,4	0,21	2,25	-0,97
p value	p=0,0027	p=0,4120	p=0,7108	p<0,005	p<0,0001



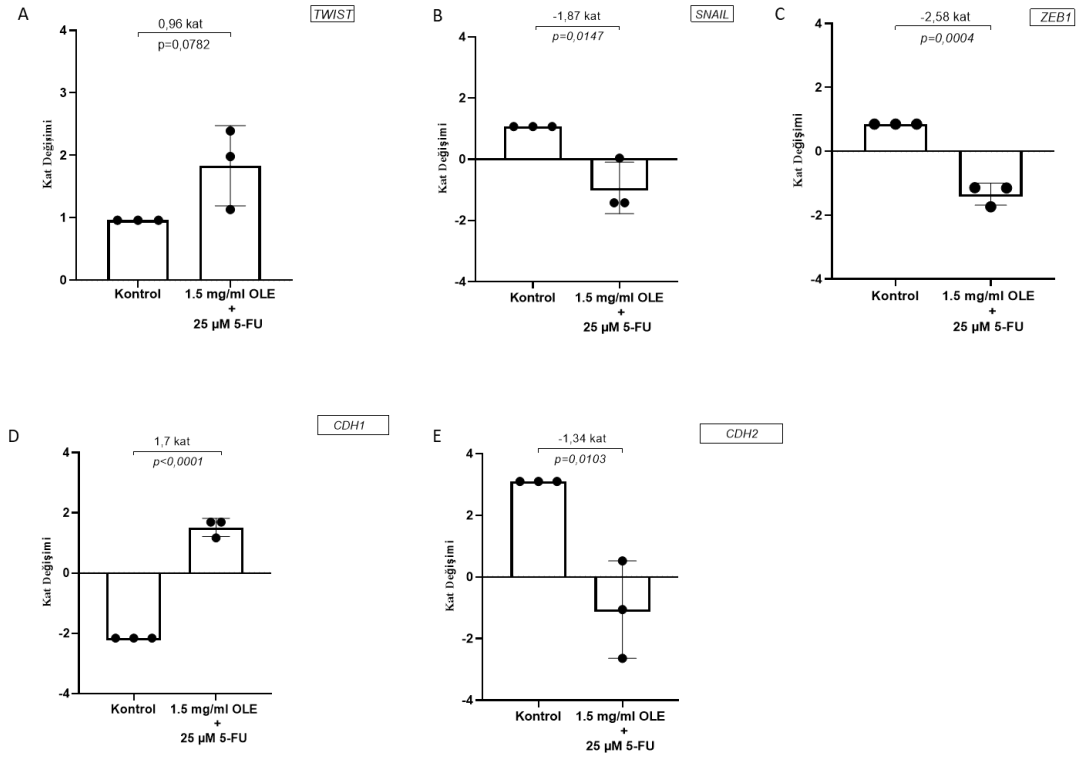
Şekil 83. OLE'nin AGS hücrelerinde EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi. **A:** *TWIST*, **B:** *SNAIL*, **C:** *ZEB1*, **D:** *CDH1*, **E:** *CDH2*. **Kontrol:** Muamelesiz AGS hücresi. (* p<0.001, Bağımsız t-test).

AGS hücrelerinin 25 µM 5-FU ile muamelesinin, muamelesiz hücelere kıyasla 1.5 mg/ml OLE dozu ile benzer şekilde *ZEB1* (-2,12 kat değişimi; p=0,0002) ve *CDH2* (-0,84 kat değişimi; p=0,0344) genlerinin ekspresyon seviyelerini anlamlı bir şekilde azalttığı, *CDH1* (1,63 kat değişimi; p=0,0003) geninin ekspresyon seviyesini anlamlı bir şekilde artırdığı belirlendi. 25 µM 5-FU ile muamelesi sonucunda muamelesiz hücre grubuna kıyasla *TWIST* ve *SNAIL* genlerinin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde azalış tespit edildi (Şekil 84).



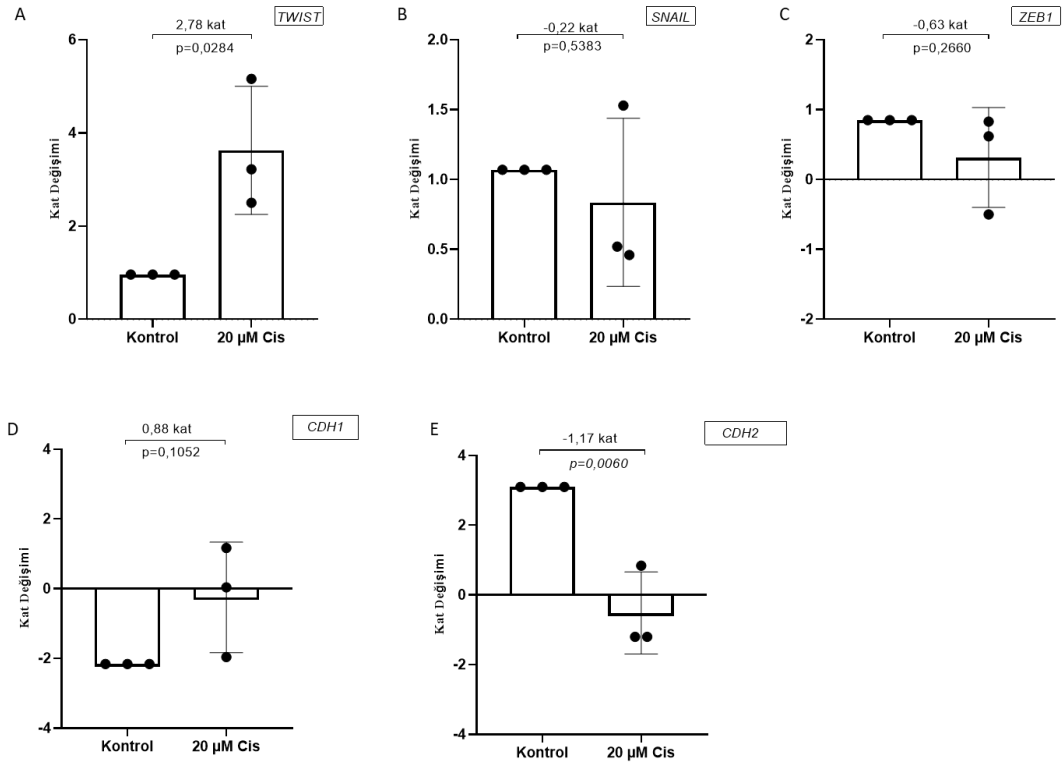
Şekil 84. 25 µM 5-FU'nun AGS hücrelerinde EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi. **A:** *TWIST*, **B:** *SNAIL*, **C:** *ZEB1*, **D:** *CDH1*, **E:** *CDH2*. **Kontrol:** Muamelesiz AGS hücresi. (* $p < 0.001$, Bağımsız t-test).

1.5 mg/ml OLE'nin + 25 µM 5-FU kombinasyonu sonucunda muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla *SNAIL* (-1,87 kat değişimi; $p=0,0147$), *ZEB1* (-2,58 kat değişimi; $p=0,0004$) ve *CDH2* (-1,34 kat değişimi; $p=0,0103$) genlerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı ölçüde azalttığı, *CDH1* (1,7 kat değişimi $p < 0,0001$) geninin ekspresyon seviyesini anlamlı ölçüde artırdığı tespit edildi. Ancak 1.5 mg/ml OLE'nin + 25 µM 5-FU kombinasyonun muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla *TWIST* geninin ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde etkilemediği görüldü (Şekil 85).



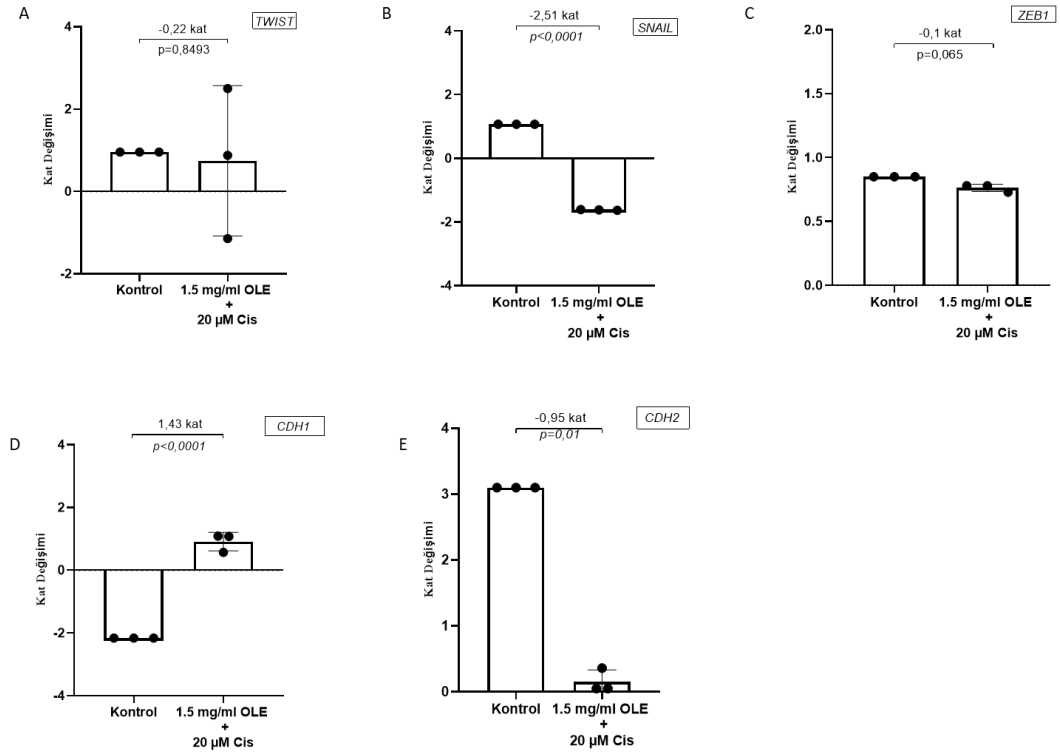
Şekil 85. 1,5 mg/ml OLE+25 µM 5-FU kombinasyonunun AGS hücrelerinde EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi. **A:** *TWIST*, **B:** *SNAIL*, **C:** *ZEB1*, **D:** *CDH1*, **E:** *CDH2*. **Kontrol:** Muamelesiz AGS hücresi. (* p<0.001, Bağımsız t-test).

20 µM Cis ile muamelesi sonucunda yalnızca *CDH2* (-1,17 kat değişimi; p=0,0060) geninin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. Cis AGS hücrelerinde muamelesiz hücrelere kıyasla *CDH1* geninin ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artırmadığı belirlendi. Ancak AGS hücrelerinin Cis ile muamelesi *TWIST*, *SNAIL* ve *ZEB1* genlerinin ekspresyon seviyesini önemli ölçüde farklılığa neden olmadı (Şekil 86).



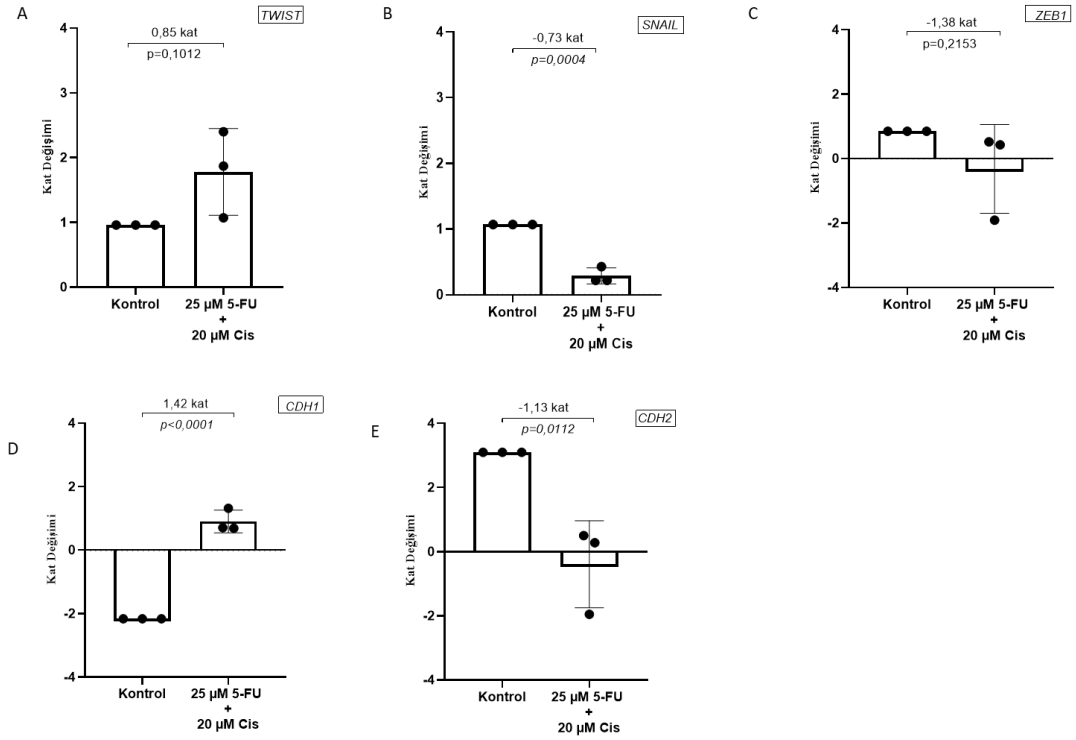
Şekil 86. 20 µM Cis'in AGS hücrelerinde EMT ile ilişkili *gen*lerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi. **A:** *TWIST*, **B:** *SNAIL*, **C:** *ZEB1*, **D:** *CDH1*, **E:** *CDH2*. **Kontrol:** Muamelesiz AGS hücresi. (* $p < 0,001$, Bağımsız t-test).

1.5 mg/ml OLE'nin + 20 µM Cis kombinasyonu sonucunda muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla *SNAIL* (-1,87 kat değişimi; $p = 0,0147$), *ZEB1* (-2,58 kat değişimi; $p = 0,0004$) ve *CDH2* (-1,34 kat değişimi; $p = 0,0103$) *gen*lerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı ölçüde azaldığı, *CDH1* (1,7 kat değişimi $p < 0,0001$) *gen*inin ekspresyon seviyesini anlamlı ölçüde artırdığı tespit edildi. Ancak 1.5 mg/ml OLE'nin + 20 µM Cis kombinasyonun muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla *TWIST* *gen*inin ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde etkilemediği görüldü (Şekil 87).



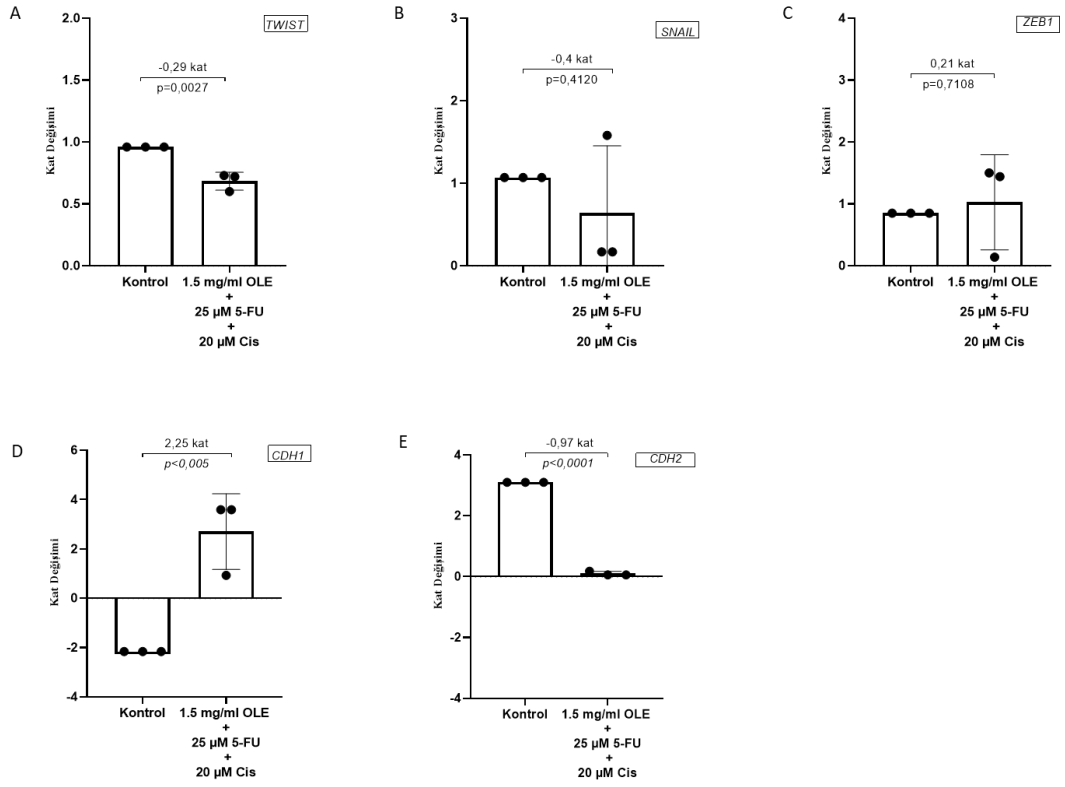
Şekil 87. 1.5 mg/ml OLE+20 µM Cis kombinasyonunun AGS hücrelerinde EMT ile ilişkili *genlerin* ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi. **A:** *TWIST*, **B:** *SNAIL*, **C:** *ZEB1*, **D:** *CDH1*, **E:** *CDH2*. **Kontrol:** Muamelesiz AGS hücresi. (* p<0.001, Bağımsız t-test).

25 µM 5-FU + 20 µM Cis kombinasyonu sonucunda muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla *SNAIL* (-0,74 kat değişimi; p=0,0004), *ZEB1* (-1,38 kat değişimi; p=0,153) ve *CDH2* (-1,13 kat değişimi; p=0,0112) genlerinin ekspresyon seviyelerini azalttığı, *CDH1* (1,42 kat değişimi p<0,0001) geninin ekspresyon seviyesini anlamlı ölçüde artırdığı tespit edildi. Ancak 25 µM 5-FU + 20 µM Cis kombinasyonun muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla *TWIST* geninin ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı ölçüde etkilemediği görüldü (Şekil 88).



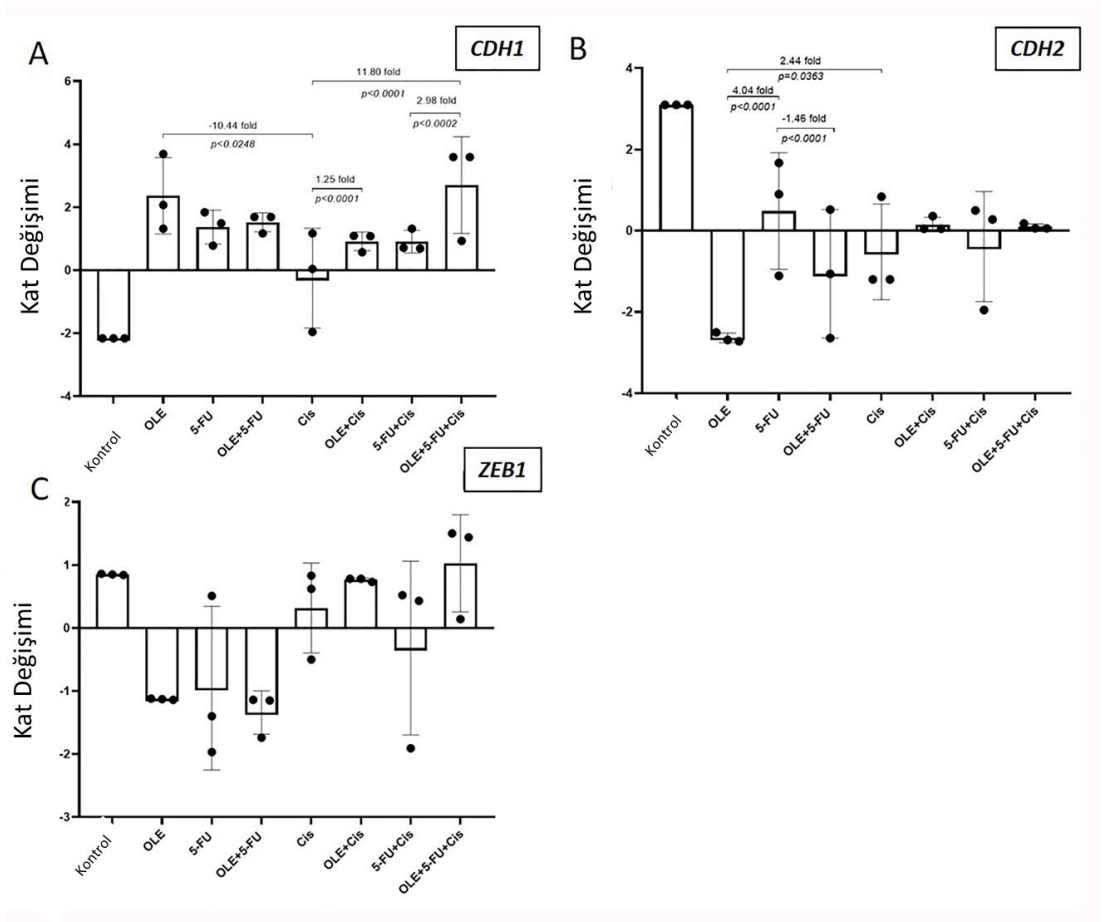
Şekil 88. 25 µM 5-FU+20 µM Cis kombinasyonunun AGS hücrelerinde EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi. **A:** *TWIST*, **B:** *SNAIL*, **C:** *ZEB1*, **D:** *CDH1*, **E:** *CDH2*. **Kontrol:** Muamelesiz AGS hücresi. (* p<0.001, Bağımsız t-test).

1,5mg/ml OLE+ 25 µM 5-FU+20 µM Cis kombinasyonu sonucunda muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla *TWIST* (-0,29 kat değişimi; p=0,0027) *SNAIL* (-0,4 kat değişimi; p=0,004120), genlerinin ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde azalttı, *CDH2* (-0,97 kat değişimi; p=0,0112) geninin ekspresyon seviyesini anlamlı olarak azalttığı saptandı. OLE+kemoterapötik ajanların üçlü kombinasyon muamelesiz AGS hücrelerine göre *CDH1* (2,25 kat değişimi p<0,005) geninin ekspresyon seviyesini anlamlı ölçüde artırdığı tespit edildi. Ancak *ZEB1* (0,21 kat değişimi; p=0,7116) geninin ekspresyon değişimini anlamlı olmayan şekilde artırdığı görüldü (Şekil 89).



Şekil 89. 1,5 mg/ml OLE + 25 µM 5-FU+20 µM Cis kombinasyonunun AGS hücrelerinde EMT ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkisi. **A:** *TWIST*, **B:** *SNAIL*, **C:** *ZEB1*, **D:** *CDH1*, **E:** *CDH2*. **Kontrol:** Muamelesiz AGS hücresi. (* p<0.001, Bağımsız t-test)

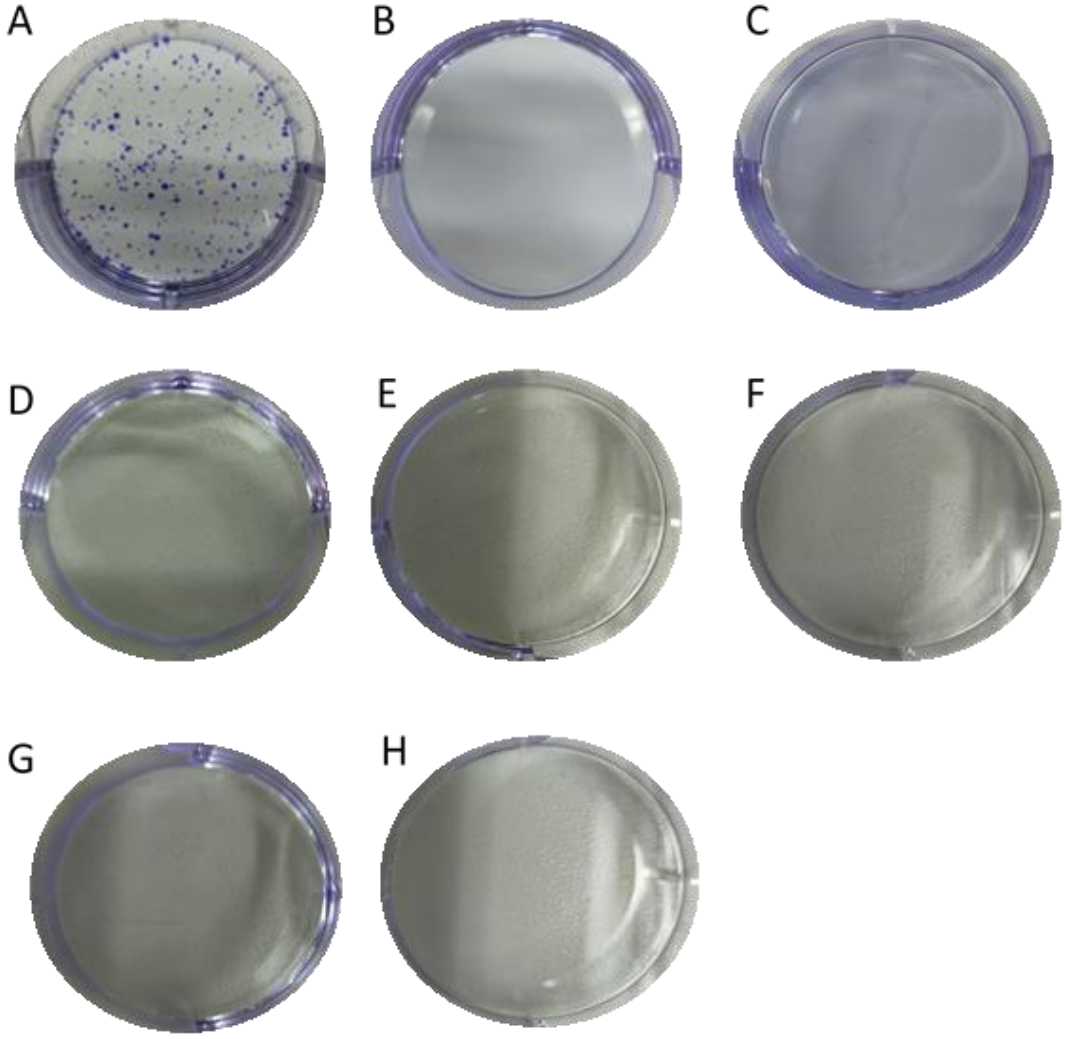
Elde edilen tüm bulgular doğrultusunda OLE'nin kombinasyonunun tek başına kemoterapi ilaçlarına göre *CDH1* ve *CDH2* genlerinin ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirdiği saptandı (Şekil 90).



Şekil 90. AGS hücrelerinde OLE ve kemoterapi ajanlarının EMT biyobelirteçlerine genel bir etkisi. A: CDH1, B: CDH2, C:ZEB1

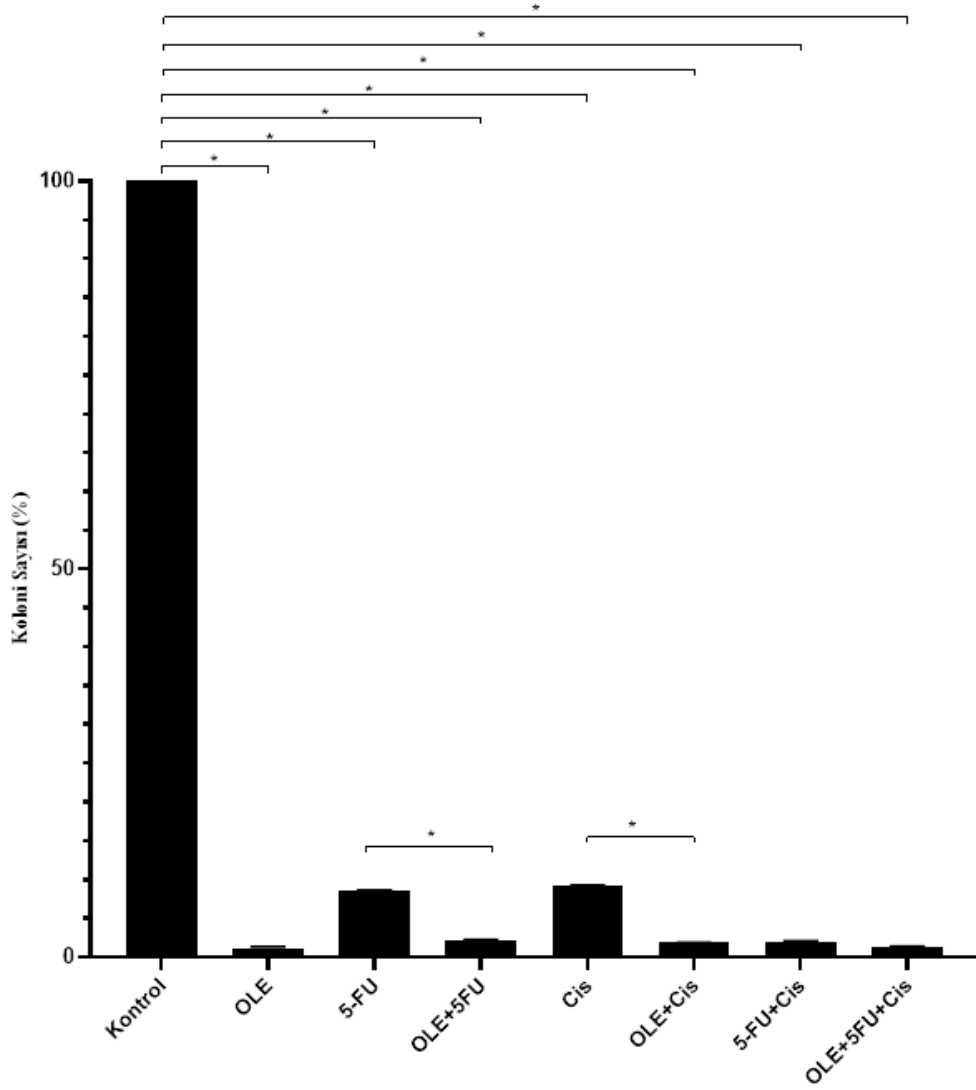
4.5. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerinin Koloni Oluşturma Yeteneği Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

AGS hücrelerinde OLE, 5-FU, Cis, OLE + 5-FU, OLE + Cis, 5-FU + Cis, OLE + 5-FU + Cis kombinasyonlarının koloni oluşturma yeteneği üzerine etkisi değerlendirildiğinde, muamele edilmemiş AGS hücrelerine göre OLE, 5-FU, Cis, OLE + 5-FU, OLE + Cis, 5-FU + Cis, OLE + 5-FU + Cis ile muamele edilen hücrelerde koloni sayısının azaldığı gözlemlendi (Şekil 91).



Şekil 91. OLE ve kemoterapötik ajanların tek başına ve kombinasyonları halinde koloni oluşumu üzerine etkileri. **A:** Kontrol, **B:** OLE, **C:** 5-FU, **D:** Cis, **E:** OLE + 5-FU, **F:** OLE + Cis, **G:** 5-FU + Cis, **H:** OLE + 5-FU + Cis.

AGS hücrelerinde, muamele edilmemiş AGS grubunun ortalama koloni sayısı 486 iken, OLE, 5-FU, Cis, OLE + 5-FU, OLE + Cis, 5-FU + Cis, OLE + 5-FU + Cis gruplarının ortalama koloni sayısı sırasıyla; 5, 41, 45, 11, 9, 10, 6 olarak belirlendi (Şekil 92). Kontrol ve muamele hücrelerindeki koloni sayıları koloni boyutlarına bakılmaksızın sayıldı. Şekil 91'deki görüntülerde görüldüğü gibi muamele edilmemiş AGS hücrelerinin oluşturduğu koloni boyutlarının, muamele edilmiş hücrelerden daha büyük olduğu tespit edildi. Kontrol ve OLE, 5-FU, OLE + 5-FU, Cis, OLE + Cis, 5-FU + Cis, OLE + 5-FU + Cis kombinasyonlarının deney platelerindeki ortalama kaplama verimlilikleri ise sırasıyla; 48.6, 0.5, 4.1, 1.1, 4.5, 0.9, 1, 0.6 olarak belirlendi. Bunun yanında muamelesiz AGS hücrelerine göre koloni oluşum oranları belirtilen sıra ile; 1, 8.4, 2.2, 9.2, 1.8, 2, 1.2 olarak hesaplandı (Tablo 31).



Şekil 92. OLE ve kemoterapötik ajanların tek başına ve kombinasyonlarının AGS hücrelerinde koloni oluşturma yeteneklerine etkisi (* $p < 0.0001$, Bağımsız t-test). **A:** Muamele edilmemiş AGS hücresi, **B:** 1.5 mg/ml OLE, **C:** 25 μ M 5-FU, **D:** 1.5 mg/ml OLE + 25 μ M 5-FU **E:** 20 μ M Cis, **F:** 1.5 mg/ml OLE + 20 μ M Cis, **G:** 25 μ M 5-FU + 20 μ M Cis, **H:** 1.5 mg/ml OLE + 25 μ M 5-FU + 20 μ M Cis.

Tablo 31. OLE ve kemoterapötik ajanların tek başına ve kombinasyonlarının AGS hücrelerinde, muamele edilmemiş AGS hücrelerine kıyasla koloni yeteneklerine etkisi (* p<0.001, Bağımsız t-test).

Dozlar	Ortalama Koloni Sayısı	Kaplama Verimliliği (%)	Koloni Oluşum Oranları (%)
Muamele edilmemiş AGS hücresi	486	48.6	100
1.5 mg/ml OLE	5	0.5	1
25 µM 5-FU	41	4.1	8.4
1.5 mg/ml OLE+25 µM 5-FU	11	1.1	2.2
20 µM Cis	45	4.5	9.2
1.5 mg/ml OLE+20 µM Cis	9	0.9	1.8
25 µM 5-FU+ 20 µM Cis	10	1	2
1.5 mg/ml OLE+ 25 µM 5-FU+ 20 µM Cis	6	0.6	1.2

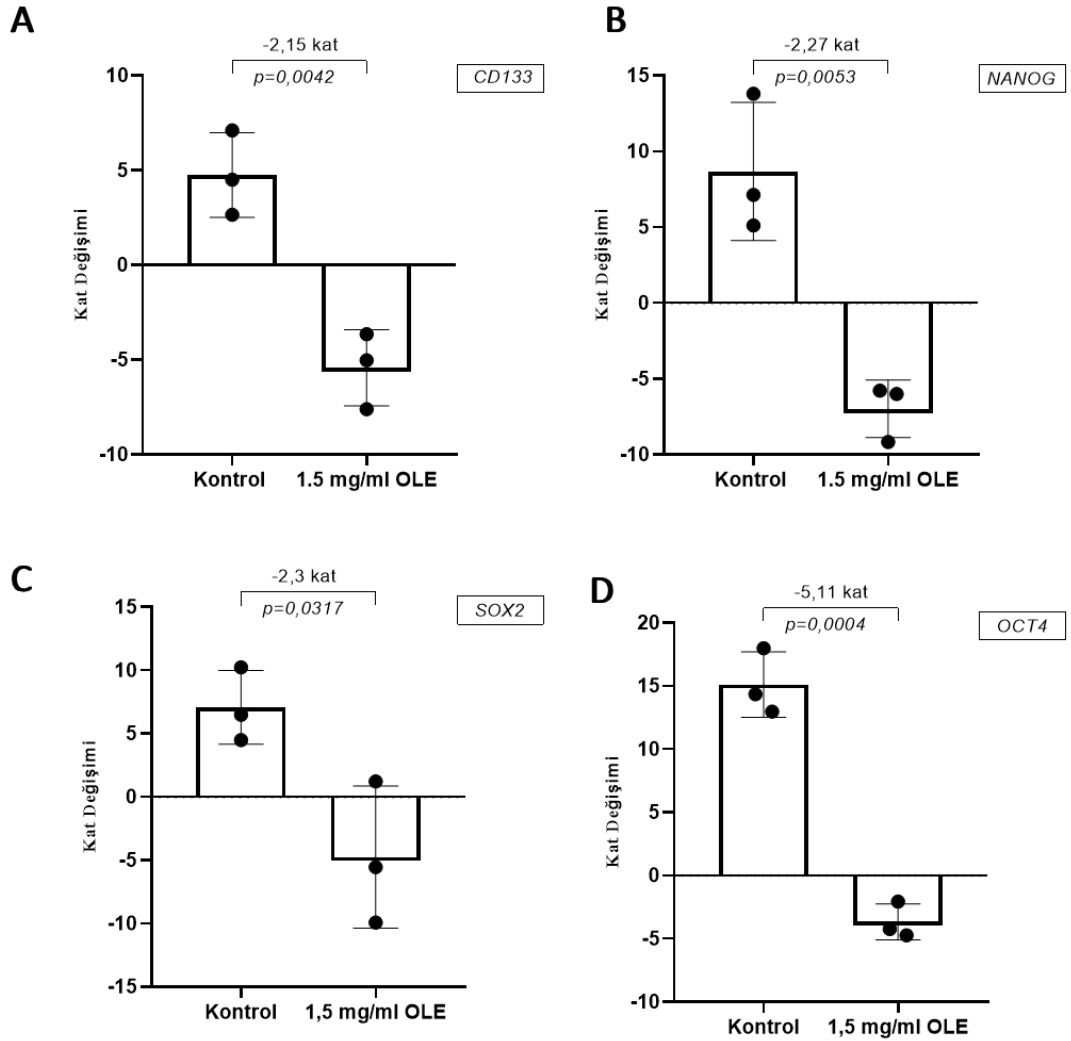
4.6. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerinde Kanser Kök Hücre Biyobelirteçlerinin Ekspresyon Seviyelerine Etkisinin Belirlenmesi

AGS hücrelerinde OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte kombinasyon durumunda CSC biyobelirteçleri olan *OCT4*, *NANOG*, *SOX2* ve *CD133* genlerinin mRNA ekspresyon seviyesine etkisi istatistiksel analizler doğrultusunda elde edilen veriler ile değerlendirildi (Tablo 32).

Tablo 32. AGS hücrelerinde CSC ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri

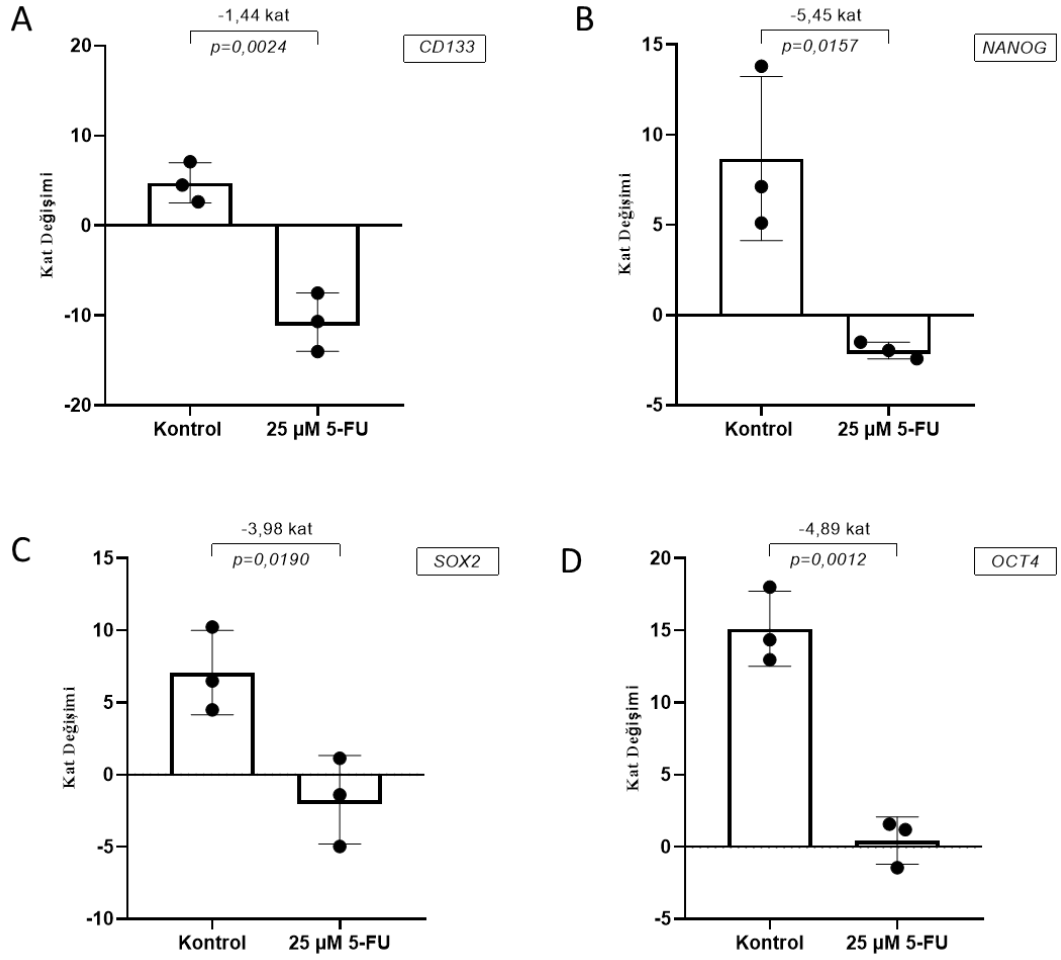
	<i>CD133</i>	<i>NANOG</i>	<i>SOX2</i>	<i>OCT4</i>
1.5 mg/ml OLE				
2 ^Δ -ΔCT	0,000002	0,00003	0,000982	0,000127
Kat Değişimi	-2,15	-2,27	-2,3	-5,11
p value	<i>p</i> =0,0042	<i>p</i> =0,0053	<i>p</i> =0,0317	<i>p</i> =0,0004
25 μM 5-FU				
2 ^Δ -ΔCT	0,000001	0,000141	0,003894	0,000843
Kat Değişimi	-1,44	-5,45	-3,98	-4,89
p value	<i>p</i> =0,0024	<i>p</i> =0,0157	<i>p</i> =0,0190	<i>p</i> =0,0012
1.5 mg/ml OLE + 25 μM 5-FU				
2 ^Δ -ΔCT	0,000005	0,000035	0,000483	0,000217
Kat Değişimi	-4,41	-6,36	-4,25	-8,3
p value	<i>p</i> =0,0061	<i>p</i> =0,0460	<i>p</i> =0,0191	<i>p</i> <0,0021
20 μM Cis				
2 ^Δ -ΔCT	0,000002	0,000049	0,00249	0,000402
Kat Değişimi	-3,71	-4,5	-5,25	-1,6
p value	<i>p</i> =0,0349	<i>p</i> =0,0266	<i>p</i> =0,0314	<i>p</i> =0,0009
1.5 mg/ml OLE 20 μM Cis				
2 ^Δ -ΔCT	0,000001	0,000041	0,000481	0,000135
Kat Değişimi	-4,71	-4,61	-4,92	-8,7
p value	<i>p</i> =0,0003	<i>p</i> =0,0081	<i>p</i> =0,0002	<i>p</i> =0,0009
25 μM 5-FU + 20 μM Cis				
2 ^Δ -ΔCT	0,000005	0,000109	0,003028	0,00094
Kat Değişimi	-0,21	-2,61	-3,92	-7,6
p value	<i>p</i> =0,341	<i>p</i> =0,0081	<i>p</i> =0,0287	<i>p</i> =0,0008
1.5 mg/ml OLE + 25 μM 5-FU + 20 μM Cis				
2 ^Δ -ΔCT	0,000003	0,000236	0,000995	0,000221
Kat Değişimi	-3,71	-4,2	-4,32	-8,6
p value	<i>p</i> =0,0003	<i>p</i> =0,0015	<i>p</i> =0,0187	<i>p</i> =0,0004

Bulgularımız doğrultusunda 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilen AGS hücrelerinin muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde *CD133* geninin (-2,15 kat değişimi; *p*=0,0042), *NANOG* geninin (-2,27 kat değişimi; *p*=0,0053), *SOX2* geninin (-2,3 kat değişimi; *p*=0,0317) ve *OCT4* geninin (-5,11 kat değişimi; *p*=0,0004) mRNA ekspresyon seviyesini azalttığı görüldü (Şekil 93). Elde edilen veriler doğrultusunda OLE'nin CSC biyobelirteçlerinin gen ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değiştirdiği saptandı.



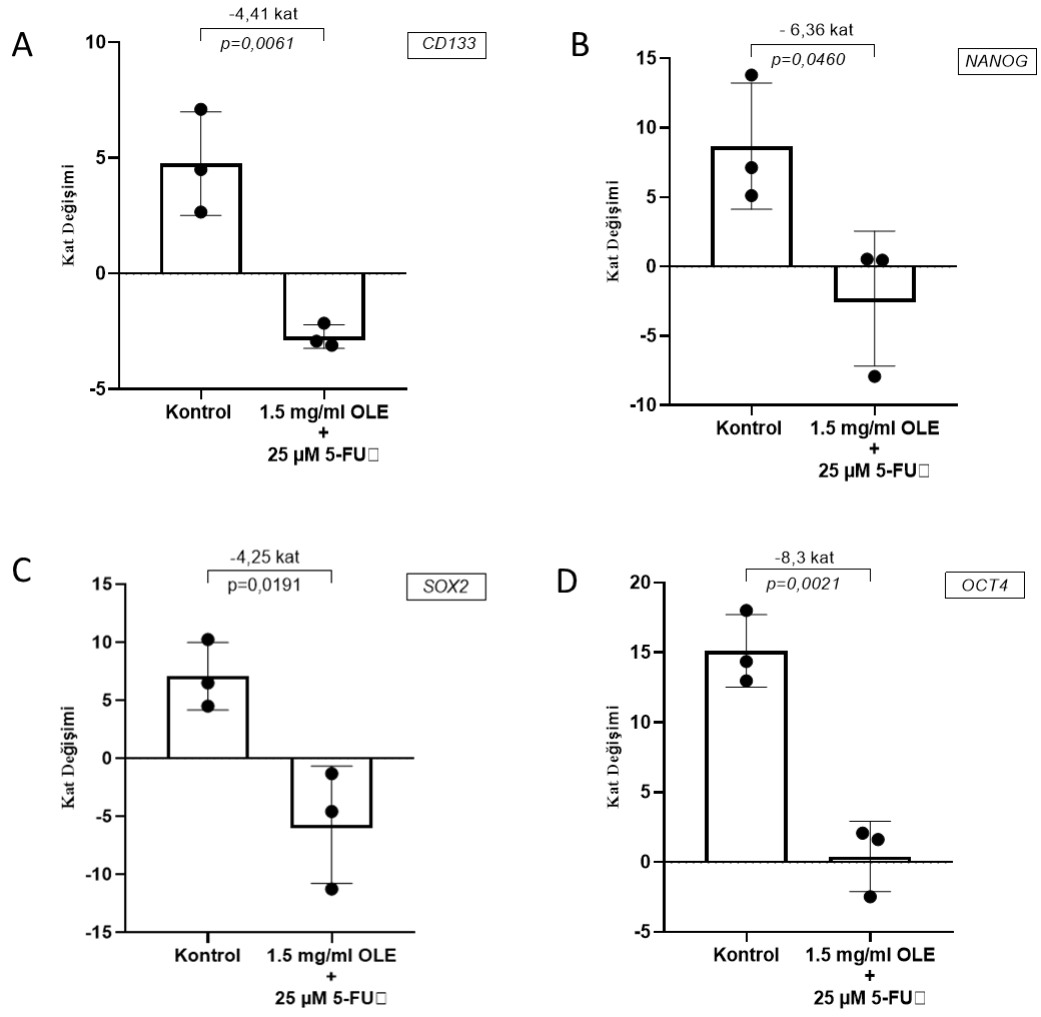
Şekil 93. 1.5 mg/ml OLE'nin AGS hücrelerindeki CSC biyobelirteçleri gen ekspresyon seviyelerine etkisi. **A:** *CD133*. **B:** *NANOG* **C:** *SOX2* **D:** *OCT4*

Tek başına 25 μ M 5-FU ile muamelesi sonucunda muamelesiz hücelere kıyasla CD133 geninin -1,44 kat değişimi, NANOG geninin -5,45 kat değişimi, SOX2 geninin -3,98 kat değişimi ve OCT4 geninin -4,89 kat değişimi ile mRNA ekspresyon seviyesini azalttığı görüldü (sırasıyla, $p=0,0024$; $p=0,0157$; $p=0,0190$; $p=0,0012$; Şekil 94).



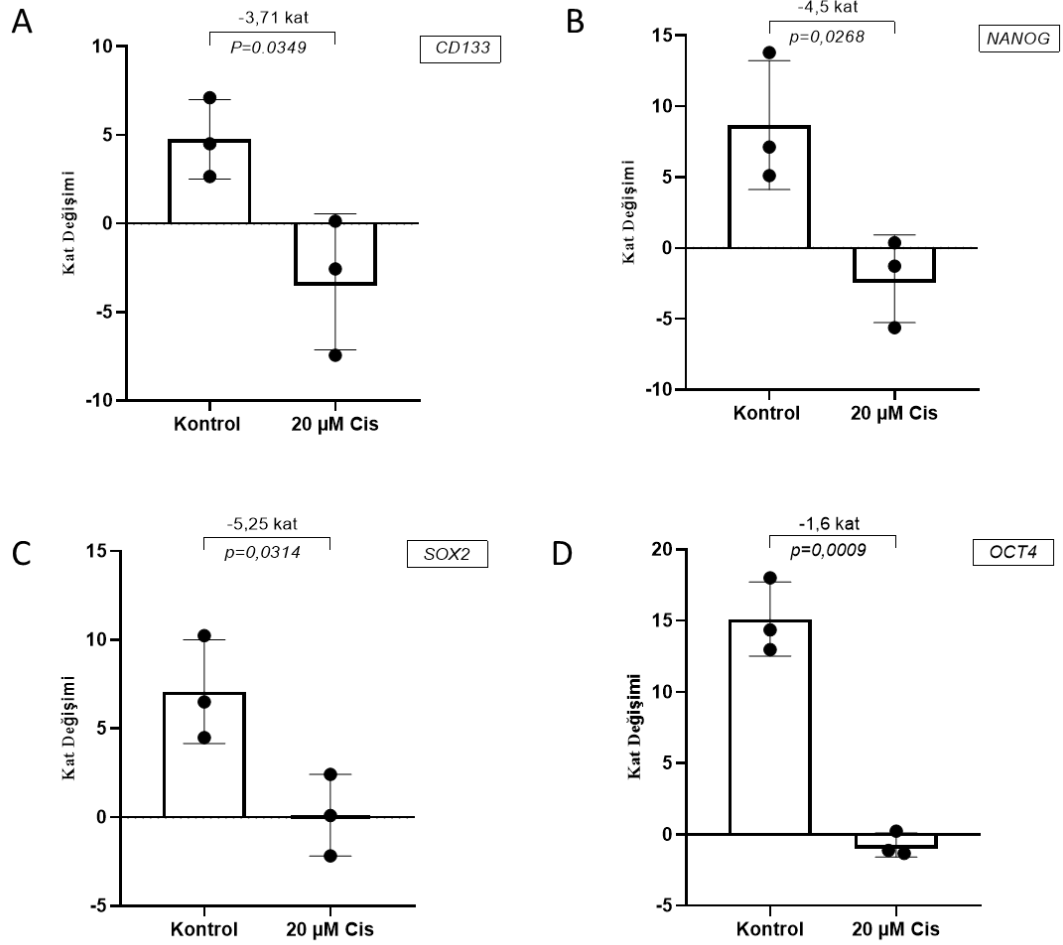
Şekil 94. 25 µM 5-FU tedavisi sonucunda AGS hücrelerindeki CSC gen ekspresyon seviyelerine etkisi. A: *CD133*. B: *NANOG* C: *SOX2* D: *OCT4*

AGS hücrelerinin 1.5 mg/ml OLE+25 µM 5-FU kombin tedavisi sonucunda muamelesiz hücelere kıyasla CSC biyobeliteçleri olan CD133, NANOG, SOX2 ve OCT4 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla -4,41, -6,36, -4,25 ve -8,3 kat değişimine neden olduğu belirlendi. 1.5 mg/ml OLE+25 µM 5-FU kombin tedavisi sonucunda muamelesiz hücelere kıyasla CSC biyobeliteçleri olan CD133, NANOG, SOX2 ve OCT4 genlerinin ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edildi (sırasıyla, $p=0,0061$; $p=0,0460$; $p=0,0191$; $p<0,0021$; Şekil 95).



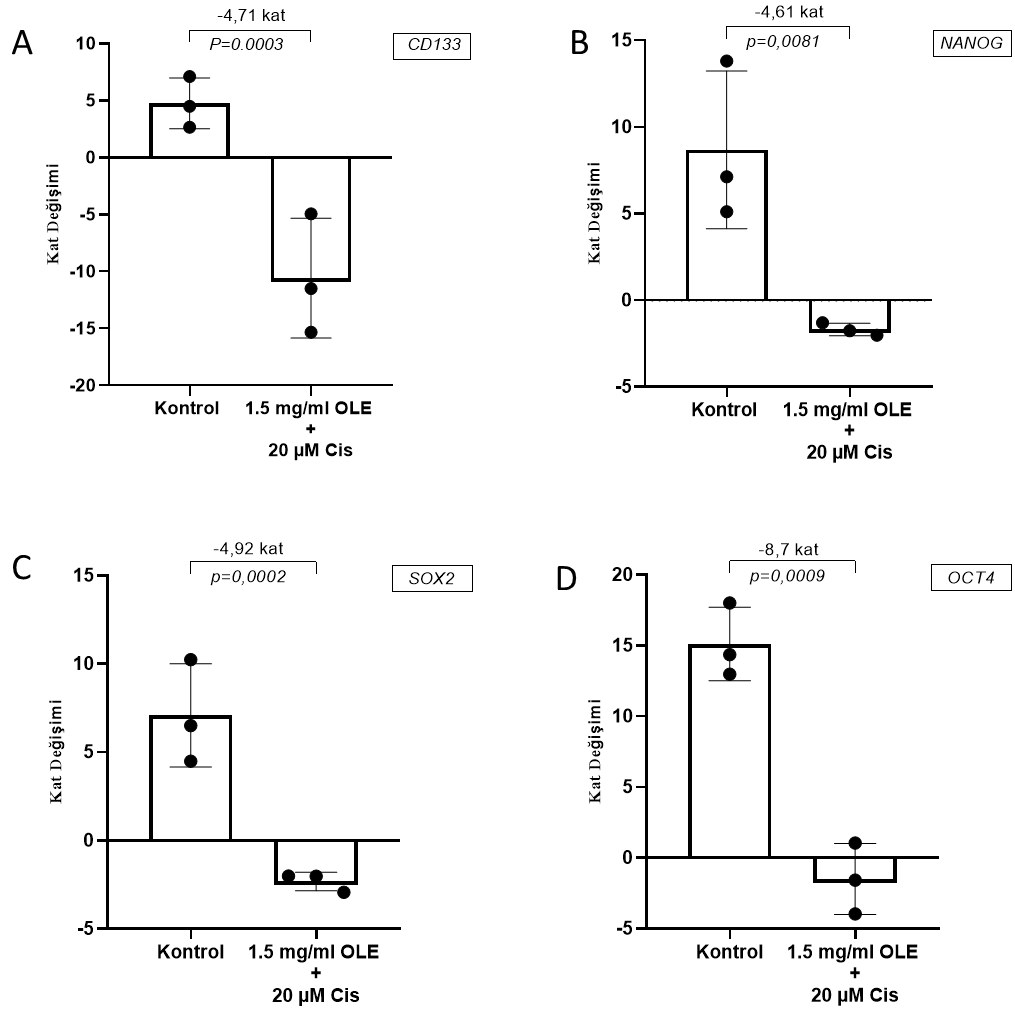
Şekil 95. 1.5 mg/ml OLE+ 25 µM 5-FU kombinasyonunun AGS hücrelerindeki CSC biyobelirteçlerinin gen ekspresyon seviyelerine etkisi. **A:** *CD133*. **B:** *NANOG* **C:** *SOX2* **D:** *OCT4*

Bulgularımız doğrultusunda 20 µM Cis tedavisi sonucunda muamelesiz hücelere kıyasla CSC biyobelirteçleri olan CD133, NANOG, SOX2 ve OCT4 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla -3,71, -4,5, -5,25 ve -1,6 kat değişimine neden olduğu belirlendi. 20 µM Cis tedavisi sonucunda muamelesiz hücelere kıyasla CSC biyobelirteçleri olan CD133, NANOG, SOX2 ve OCT4 genlerinin ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edildi (sırasıyla, $p=0,0349$; $p=0,0266$; $p=0,0314$; $p=0,0009$; Şekil 96).



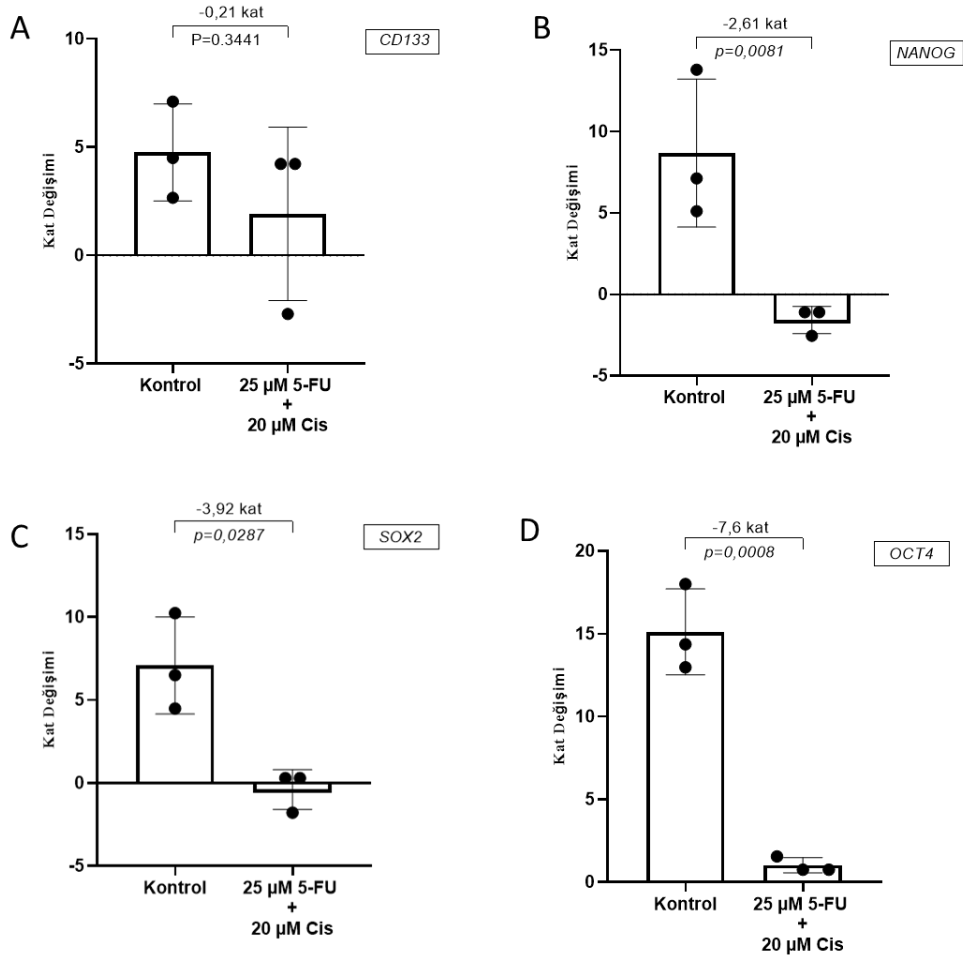
Şekil 96. 20 µM Cis'in AGS hücrelerindeki CSC gen ekspresyon seviyelerine etkisi. A: *CD133*. B: *NANOG* C: *SOX2* D: *OCT4*

Elde edilen veriler doğrultusunda AGS hücrelerinde 1.5 mg/ml OLE'nin 20 µM Cis ile kombin tedavisi sonucunda muamelesiz hücelere kıyasla CSC biyobeliteçleri olan CD133, NANOG, SOX2 ve OCT4 genlerinin ekspresyon seviyesinde sırasıyla -4,71, -4,61, -4,92 ve -8,7 kat değişimine neden olduğu belirlendi. 20 µM Cis tedavisi sonucunda muamelesiz hücelere kıyasla CSC biyobeliteçleri olan CD133, NANOG, SOX2 ve OCT4 genlerinin ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edildi (sırasıyla, $p=0,0003$; $p=0,0081$; $p=0,0002$; $p=0,0009$; Şekil 97).



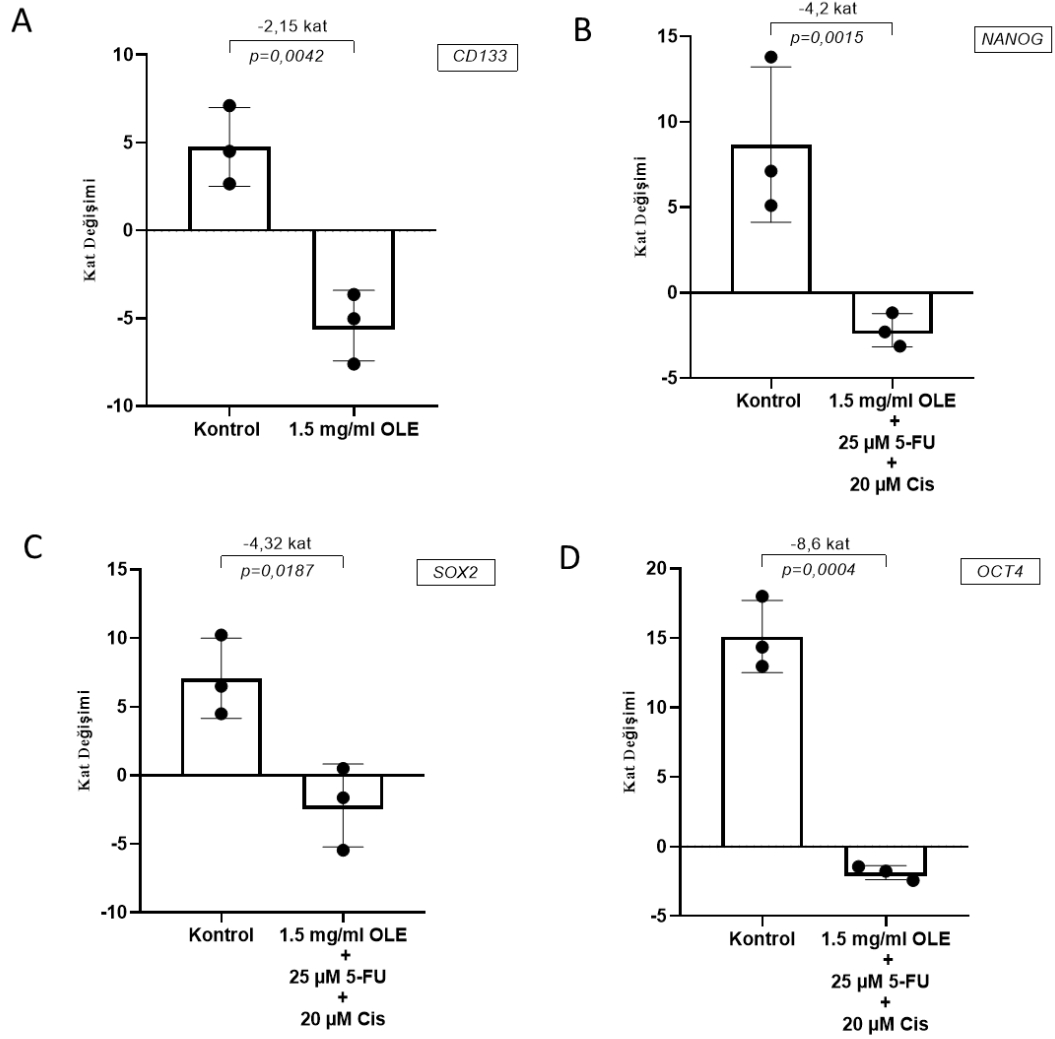
Şekil 97. OLE+Cis kombinasyonunun AGS hücrelerindeki CSC biyobelirteci gen ekspresyon seviyelerine etkisi. **A:** *CD133*. **B:** *NANOG* **C:** *SOX2* **D:** *OCT4*

AGS hücrelerinin 5-FU+Cis ikili kombin tedavisi sonucunda muamelesiz hücelere kıyasla NANOG (-2,61 kat değişimi; $p=0,0081$), SOX2 (-3,92 kat değişimi; $p=0,0287$) ve OCT4 (-7,6 kat değişimi; $p=0,0008$) genlerinin ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı azalttığı tespit edildi. Ancak bu ikili kombin tedavi sonucunda CD133 geninin ekspresyon seviyesi muamelesiz hücreye kıyasla anlamlı bir şekilde etkilemediği görüldü (-0,21 kat değişimi; $p=0,341$; Şekil 98).



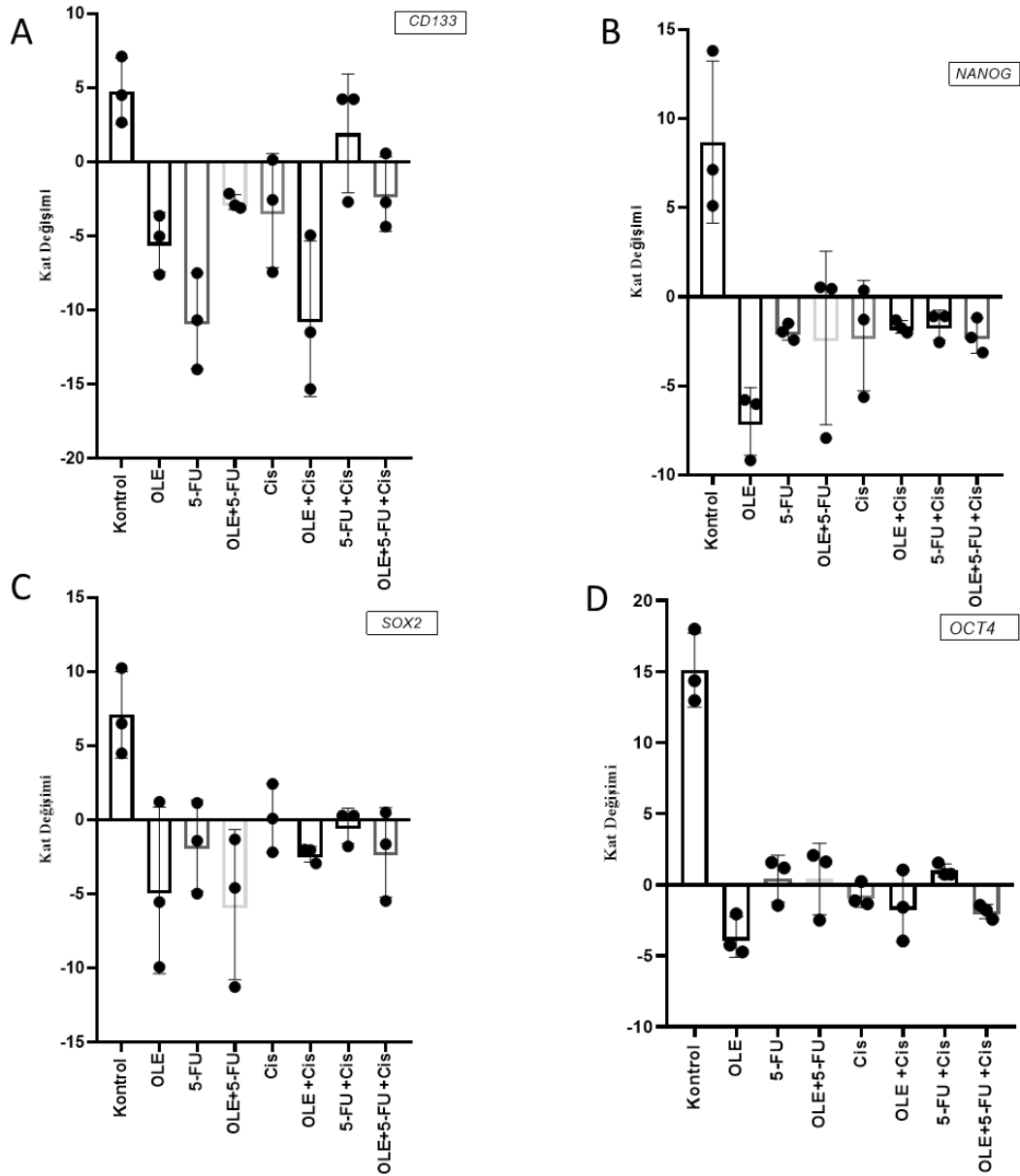
Şekil 98. 5-FU+Cis kombinasyonunun AGS hücrelerindeki CSC biyobelirteçlerinin gen ekspresyon seviyelerine üzerine etkisi. **A:** *CD133*. **B:** *NANOG* **C:** *SOX2* **D:** *OCT4*

Bulgularımız doğrultusunda 1.5 mg/ml OLE'nin 5-FU+Cis ile üçlü kombinasyon tedavisi sonucunda CSC biyobelirteçlerinin gen ekspresyon seviyelerini etkilediği analiz edildi (Şekil 99). 1.5 mg/ml OLE'nin 5-FU+Cis ile üçlü kombinasyon tedavisi sonucunda muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla CD133, NANOG, SOX2 ve OCT4 genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerini sırasıyla -3,71, -4,2, -4,32 ve -8,6 kat değişimi ile değiştirdiği görüldü. Bu üçlü kombinasyon tedavisinin CD133, NANOG, SOX2 ve OCT4 genlerinin ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi (sırasıyla, $p=0,0003$; $p=0,0015$; $p=0,0187$; $p=0,0004$).



Şekil 99. OLE+5-FU+Cis kombinasyonunun AGS hücrelerindeki CSC biyobelirteci gen ekspresyon seviyelerine etkisi. **A:** *CD133*. **B:** *NANOG* **C:** *SOX2* **D:** *OCT4*

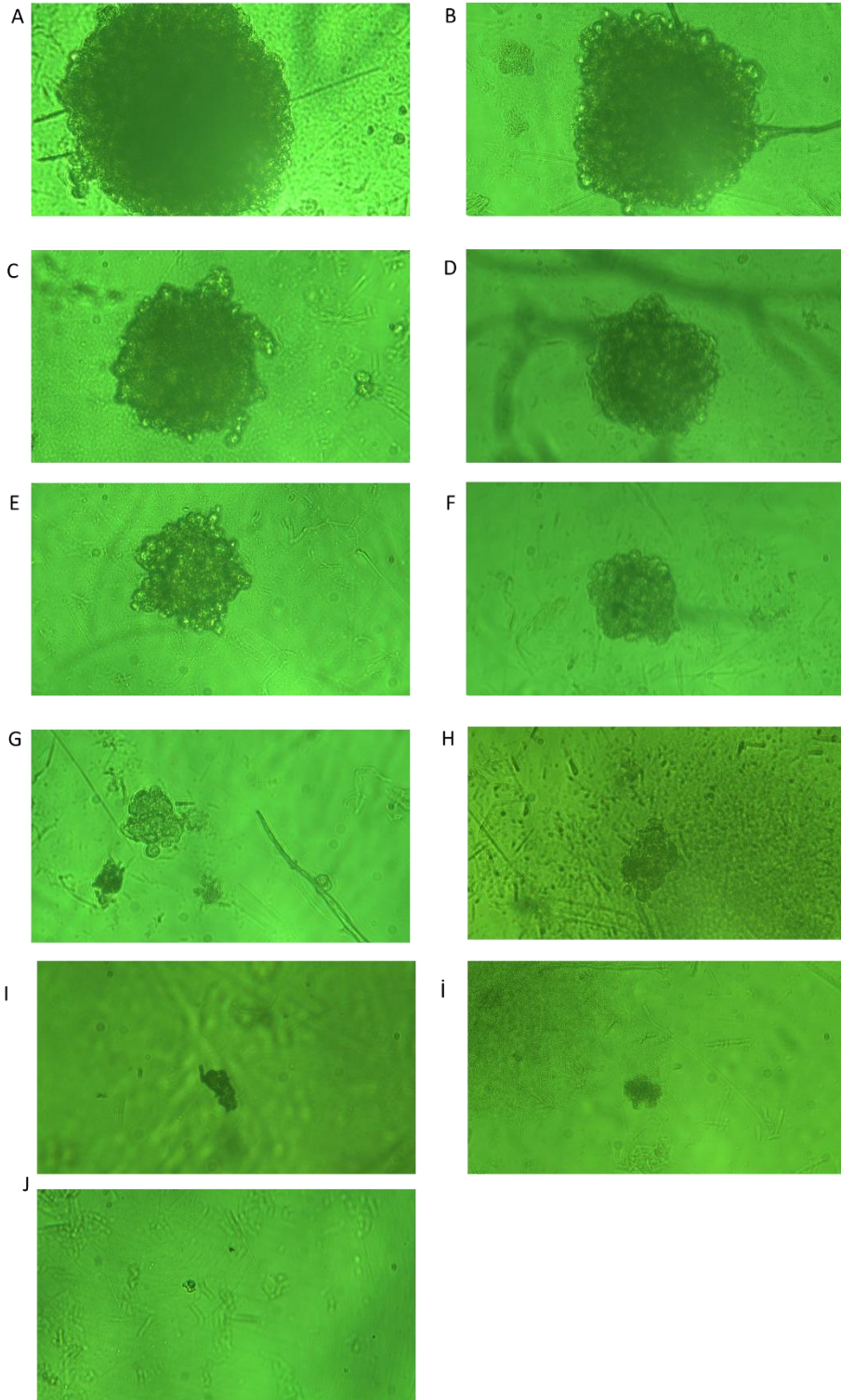
Elde edilen tüm veriler doğrultusunda OLE'nin CSC belirteçlerinin gen ekspresyonlarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltıcı yönde etkisi olduğu, kombin gruplarının kemoterapi ilaçlarının tek başına tedavisi ile kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde etkilemediği görüldü (Şekil 100).



Şekil 100. OLE ve kemoterapötik ajanlar ile muamele edilen AGS hücrelerinin CSC biyobelirteci'nin mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi. **A:** CD133. **B:** NANOG. **C:** SOX2. **D:** OCT4

4.7. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerinin 3 Boyutlu Tümör Modeline Etkisinin Belirlenmesi

3B tümör modeli oluşturmak için en uygun hücre sayısının belirlenmesi amacıyla optimizasyon çalışması gerçekleştirildi. Optimizasyon çalışması sonucunda AGS hücreleri için en uygun hücre sayısının 80 ve 160 hücre olduğu belirlendi (Şekil 101). Bundan sonraki analiz aşamalarına 80 hücre sayısı ile devam edilmeye karar verildi.



Şekil 101. Farklı hücre sayılarında kültüre edilmiş 3B optimizasyon çalışmasında AGS hücrelerinin tümör kitlelerinin boyutları. **A:** 40.000 hücre, **B:** 20.000 hücre, **C:** 10.000 hücre, **D:** 5.000 hücre, **E:** 2.500 hücre, **F:** 1.250 hücre, **G:** 625 hücre, **H:** 312 hücre, **I:** 156 hücre, **İ:** 80 hücre, **J:** 40 hücre.

AGS hücrelerinde OLE, 5-FU, Cis, OLE + 5-FU, OLE + Cis, 5-FU + Cis ve OLE + 5-FU + Cis kombinasyonlarının 3B tümör modeli üzerindeki tümör boyutuna

etkisi analiz edildiğinde muamele edilmemiş AGS hücrelerine göre OLE, 5-FU, OLE + 5-FU, OLE + Cis, 5-FU + Cis ve OLE + 5-FU + Cis'in tümör hacmini küçülttüğü tespit edildi. Ancak Cis'in muamele edilmemiş AGS hücrelerine göre tümör hacminin küçültme yönünde bir etkisi olmadığı görüldü (Tablo 33).

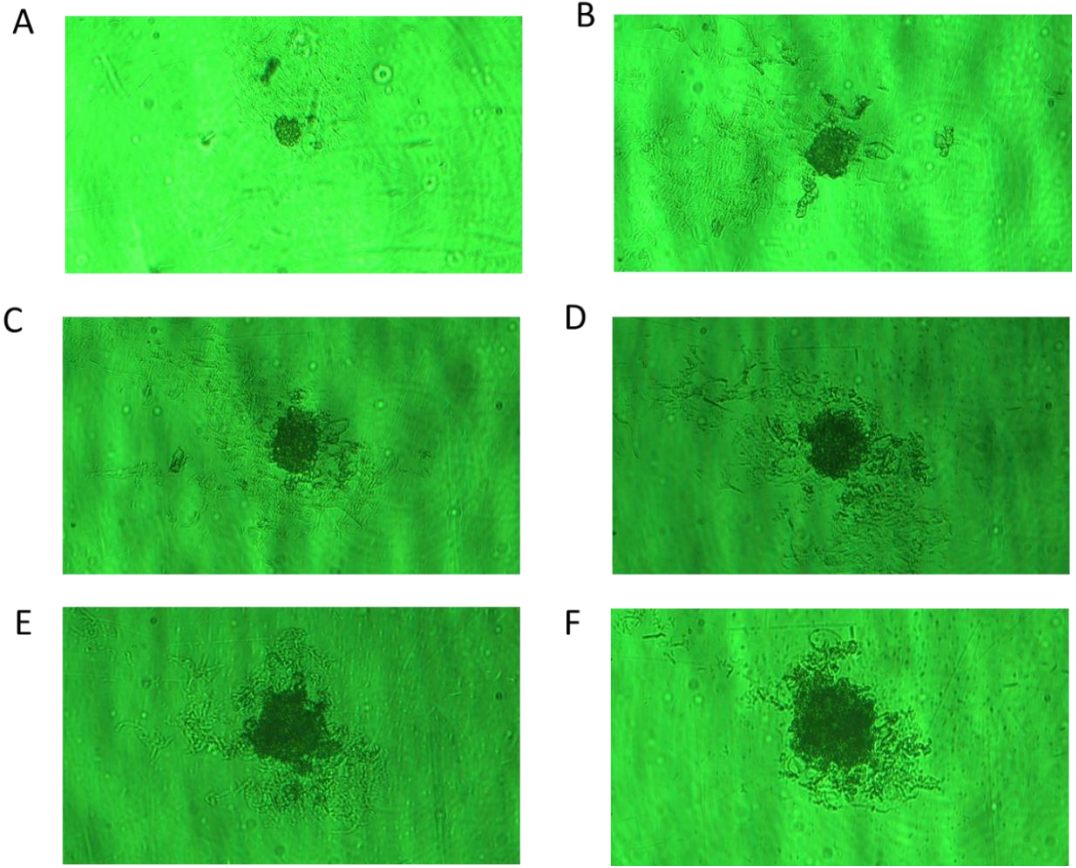
Tablo 33. OLE ve kemoterapötik ajanların tek başına ve kombinasyonlarının 3B yapıdaki AGS hücrelerinin tümör hacmine etkileri

Kontrol						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
r1	0,28	0,66	0,68	0,68	0,78	1,04
r2	0,27	0,51	0,42	0,72	1,06	0,91
r3	0,3	0,64	0,76	0,59	0,82	1,13
r4	0,19	0,63	0,66	0,69	0,8	0,98
r ORTALAMA	0,26	0,61	0,63	0,67	0,865	1,015
HACİM (μm^2)	0,0735849	0,9502938	1,0468634	1,2591944	2,7096719	4,3779068
1.5 mg/ml OLE						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
r1	0,28	0,29	0,21	0,19	0,24	0,37
r2	0,27	0,21	0,18	0,25	0,21	0,27
r3	0,3	0,28	0,28	0,25	0,23	0,28
r4	0,19	0,25	0,23	0,17	0,19	0,29
r ORTALAMA	0,26	0,2575	0,225	0,215	0,2175	0,3025
HACİM (μm^2)	0,0735849	0,0714826	0,0476888	0,0416087	0,0430771	0,1158896
25 μM 5-FU						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
r1	0,28	0,63	0,53	0,56	0,7	0,62
r2	0,27	0,38	0,74	0,5	0,39	0,4
r3	0,3	0,42	0,66	0,59	0,44	0,31
r4	0,19	0,39	0,54	0,65	0,6	0,46
r ORTALAMA	0,26	0,455	0,6175	0,575	0,5325	0,4475
HACİM (μm^2)	0,0735849	0,3943688	0,9857783	0,7959246	0,6321603	0,3751868
1.5 mg/ml OLE+25 μM 5-FU						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
r1	0,28	0,3	0,28	0,45	0,51	0,41
r2	0,27	0,42	0,67	0,49	0,46	0,42
r3	0,3	0,27	0,37	0,55	0,51	0,43
r4	0,19	0,45	0,57	0,48	0,58	0,45
r ORTALAMA	0,26	0,36	0,4725	0,4925	0,515	0,4275
HACİM (μm^2)	0,0735849	0,1953331	0,4416455	0,5001348	0,5718605	0,3270971

Tablo 33. OLE ve kemoterapötik ajanların tek başına ve kombinasyonlarının 3B yapıdaki AGS hücrelerinin tümör hacmine etkileri (Devamı)

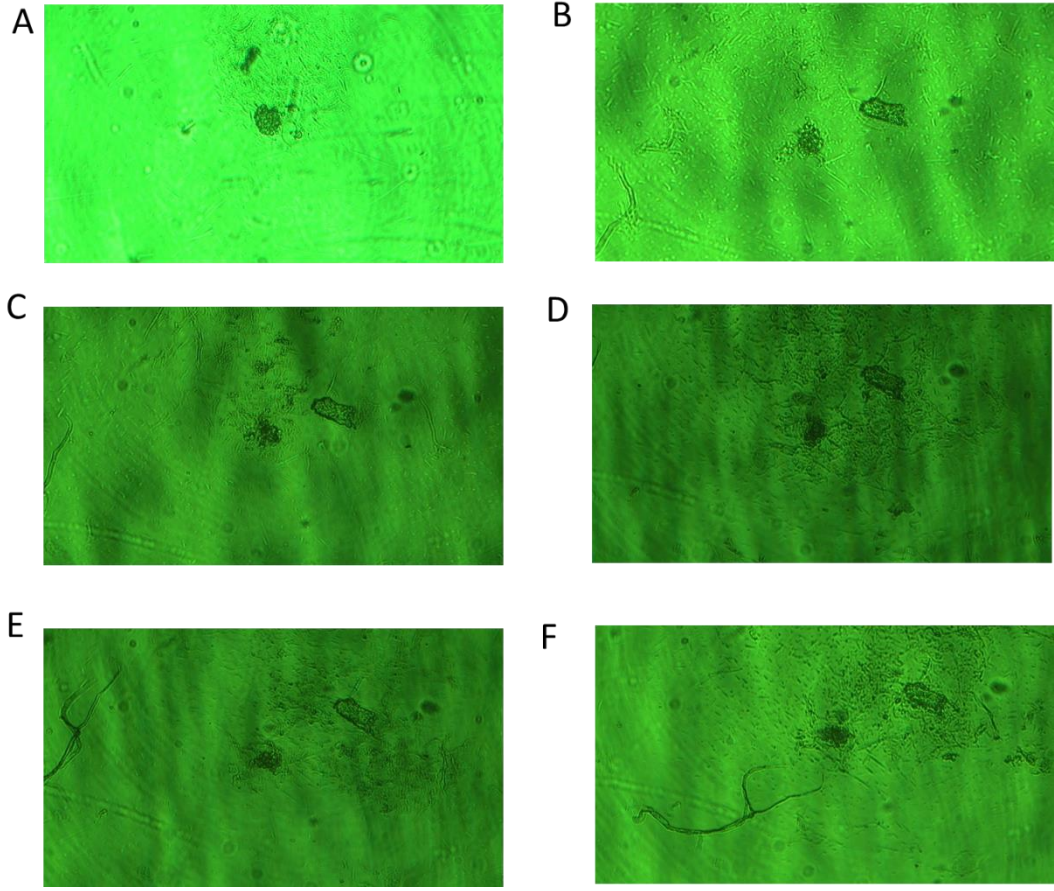
20 µM Cis						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
r1	0,28	0,56	0,7	0,94	1,1	1,2
r2	0,27	0,53	0,86	0,95	0,9	1,42
r3	0,3	0,51	0,87	0,88	0,85	1,1
r4	0,19	0,4	1,1	0,8	0,92	1,21
r ORTALAMA	0,26	0,5	0,8825	0,8925	0,9425	1,2325
HACİM (µm ²)	0,0735849	0,5233333	2,8774814	2,9764121	3,5051972	7,8384315
1.5 mg/ml OLE + 20 µM Cis						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
r1	0,28	0,25	0,34	0,55	0,59	0,32
r2	0,27	0,34	0,24	0,49	0,25	0,51
r3	0,3	0,26	0,41	0,5	0,63	0,55
r4	0,19	0,27	0,35	0,54	0,4	0,35
r ORTALAMA	0,26	0,28	0,335	0,52	0,4675	0,4325
HACİM (µm ²)	0,0735849	0,0919057	0,1573993	0,5886788	0,4277729	0,338709
25 µM 5-FU +20 µM Cis						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
r1	0,28	0,4	0,65	0,51	0,46	0,44
r2	0,27	0,64	0,44	0,41	0,53	0,53
r3	0,3	0,47	0,45	0,38	0,42	0,59
r4	0,19	0,49	0,5	0,48	0,48	0,41
r ORTALAMA	0,26	0,5	0,51	0,445	0,4725	0,4925
HACİM (µm ²)	0,0735849	0,5233333	0,5553655	0,3689338	0,4416455	0,5001348
1.5 mg/ml OLE+25 µM 5-FU +20 µM Cis						
	0h	24h	48h	72h	96h	120h
r1	0,28	0,62	0,59	0,48	0,42	0,56
r2	0,27	0,39	0,49	0,47	0,44	0,42
r3	0,3	0,56	0,47	0,51	0,45	0,46
r4	0,19	0,46	0,54	0,53	0,39	0,41
r ORTALAMA	0,26	0,5075	0,5225	0,4975	0,425	0,4625
HACİM (µm ²)	0,0735849	0,5472383	0,5972103	0,5155225	0,3213921	0,4141938

3B hücre kültür modelindeki muamele edilmemiş AGS hücrelerinin 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerdeki tümör hacimleri sırasıyla 0,0735849 µm², 0,9502938 µm², 1,0468634 µm², 1,2591944 µm², 2,7096719 µm² ve 4,3779068 µm² olduğu belirlendi (Şekil 102).



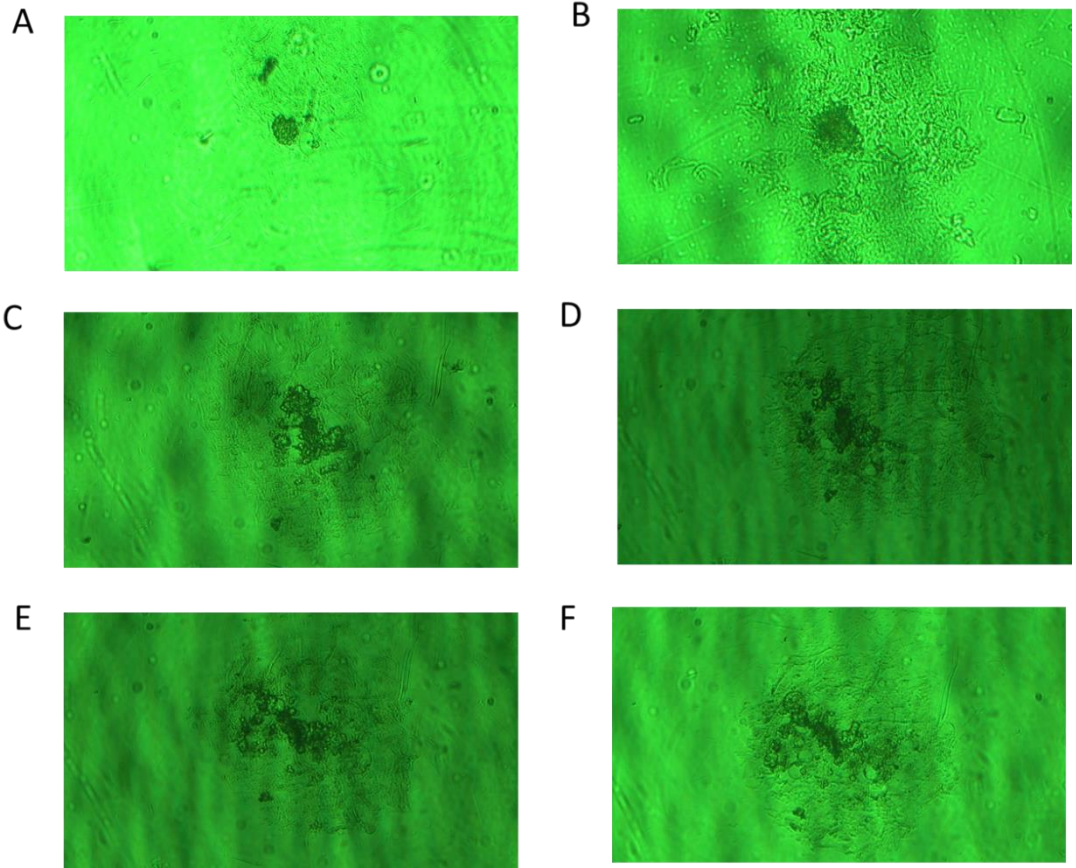
Şekil 102. 80 hücre ekilerek başlanan muamele edilmemiş AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.

1.5 mg/ml OLE ile muamele edilen AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde tümör hacimleri 0. saatte $0,0735849 \mu\text{m}^2$, 24. saatte $0,0714826 \mu\text{m}^2$, 48. saatte $0,0476888 \mu\text{m}^2$ 72. saatte, $0,0416087 \mu\text{m}^2$ 96. saatte $0,0430771 \mu\text{m}^2$ ve 120. saate ise $0,1158896 \mu\text{m}^2$ olarak hesaplandı (Şekil 103). 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilen AGS hücrelerinin tümör hacmini 120. saatin sonunda muamele edilmemiş AGS hücrelerine göre 39.72 kat küçülttüğü tespit edildi ($p < 0.0001$).



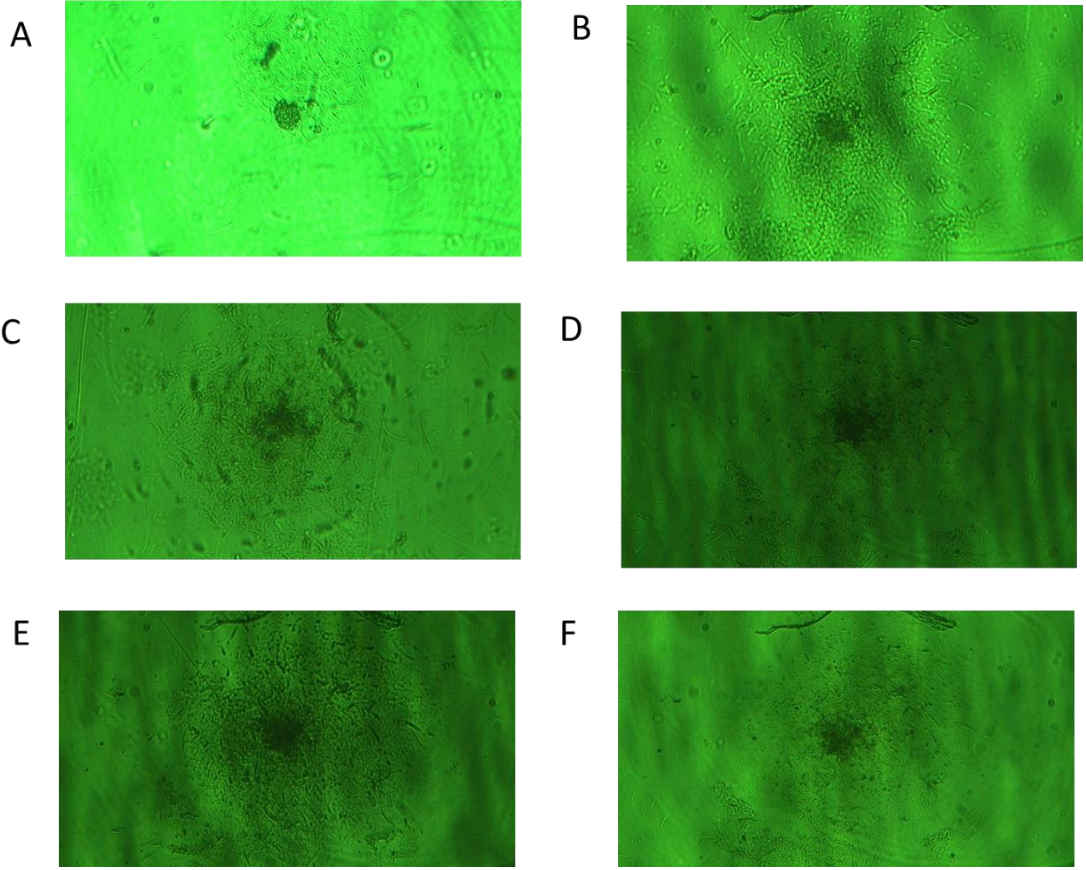
Şekil 103. 80 hücre ekilen 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilmiş AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.

3B hücre kültür modelinde 25 μM 5-FU ile muamele edilen AGS hücrelerinin 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerdeki tümör hacimleri sırasıyla 0,0735849 μm^2 , 0,3943688 μm^2 , 0,9857783 μm^2 , 0,7959246 μm^2 , 0,6321603 μm^2 ve 0,3751868 μm^2 olarak belirlendi. 120. saatin sonunda muamele edilmemiş AGS hücrelerine göre 25 μM 5-FU ile muamele edilen AGS hücrelerinin tümör hacmini 11.81 kat azalttığı tespit edildi ($p < 0.0001$; Şekil 104).



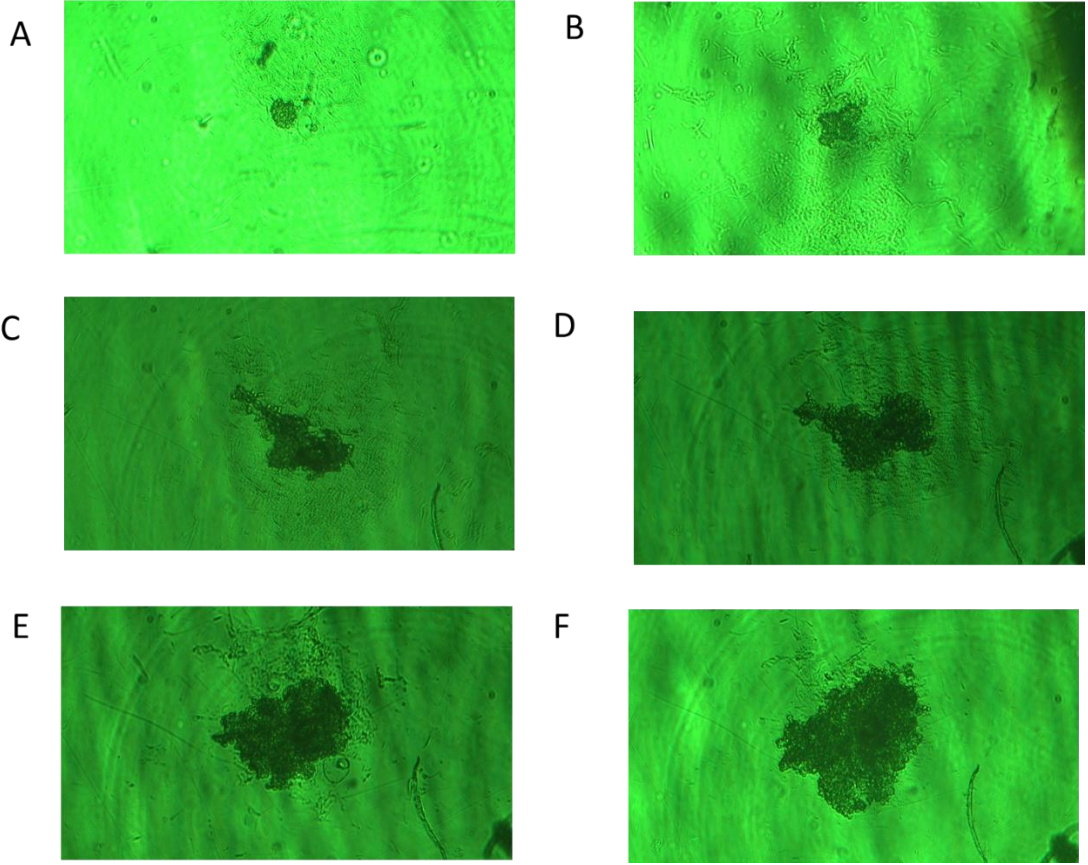
Şekil 104. 80 hücre ekilen 25 µM 5-FU ile muamele edilmiş AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.

1.5 mg/ml+25 µM 5-FU kombinasyonunun 3B hücre kültür modelinde tümör hacmine etkisi 0. saatte $0,0735849 \mu\text{m}^2$, 24. saatte $0,1953331 \mu\text{m}^2$, 48. saatte $0,4416455 \mu\text{m}^2$, 72. saatte $0,5001348 \mu\text{m}^2$, 96. saatte $0,5718605 \mu\text{m}^2$ ve 120. saatte $0,3270971 \mu\text{m}^2$ olarak hesaplandı. 120. saatin sonunda 1.5mg/ml+25 µM 5-FU kombinasyonunun muamele edilmemiş AGS hücrelerine göre tümör hacmini 13.65 kat küçülttüğü saptandı ($p<0.0001$; Şekil 105).



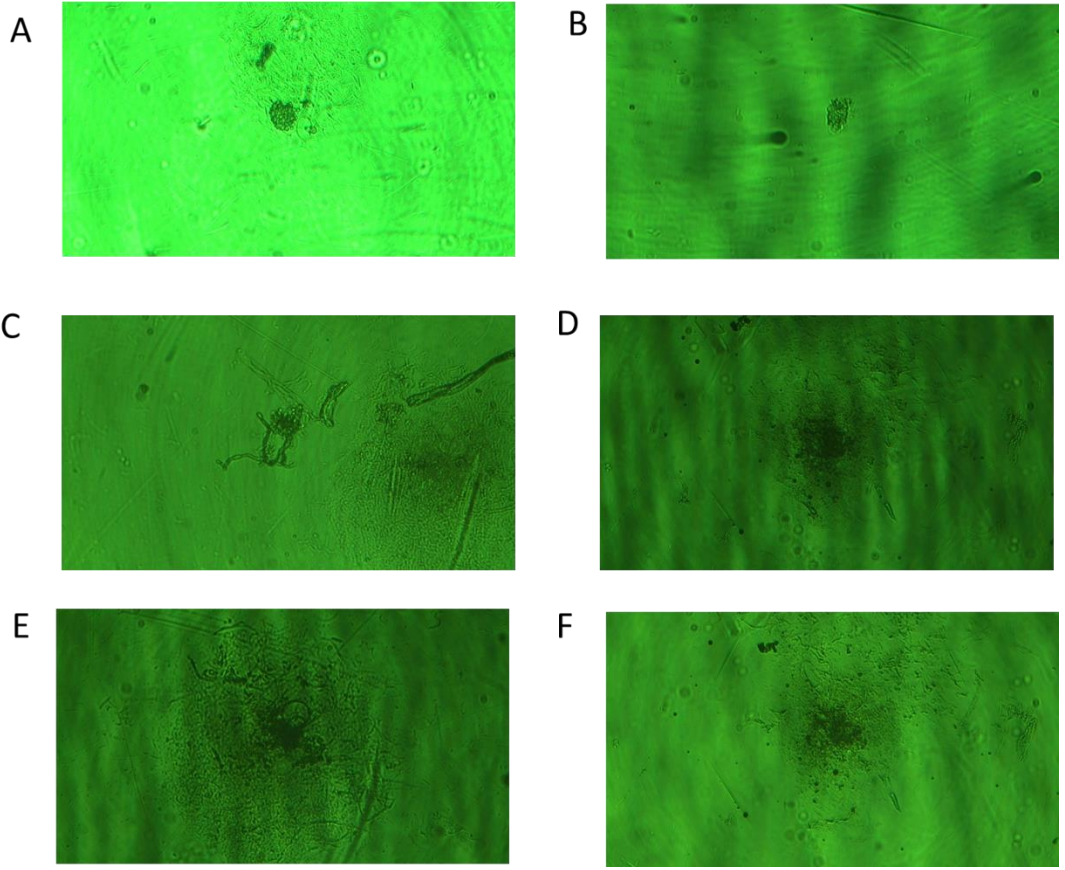
Şekil 105. 80 hücre ekilen 1.5 mg/ml OLE+25 µM 5-FU kombinasyonu ile muamele edilmiş AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.

3B hücre kültür modelinde 20 µM Cis ile muamele edilen AGS hücrelerinin 0, 24, 48, 72, 96 ve 120. saatlerdeki tümör hacimleri sırasıyla 0,073584853 µm², 0,523333333 µm², 2,877481412 µm², 2,976412084 µm², 3,505197242 µm² ve 7,83843152 µm² olarak hesaplandı. 120. saatin sonunda 20 µM Cis ile muamele edilen AGS hücrelerinin tümör hacmini muamele edilmemiş AGS hücrelerine göre 1.79 kat artırdığı belirlendi (p<0.0001; Şekil 106).



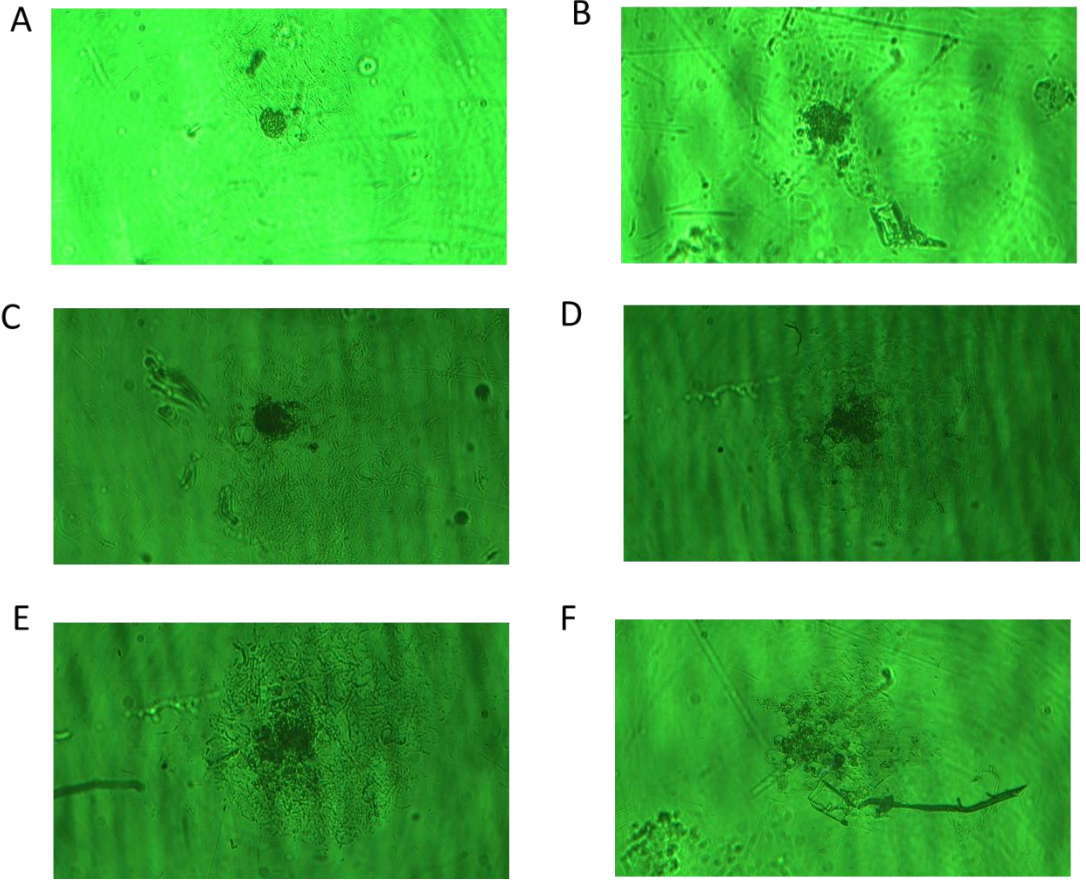
Şekil 106. 80 hücre ekilen 20 µM Cis ile muamele edilmiş AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.

1.5 mg/ml+20 µM Cis kombinasyonunun 3B hücre kültür modelinde tümör hacmine etkisi 0. saatte $0,0735849 \mu\text{m}^2$, 24. saatte $0,091905707 \mu\text{m}^2$, 48. saatte $0,157399303 \mu\text{m}^2$, 72. saatte $0,588678827 \mu\text{m}^2$, 96. saatte $0,427772863 \mu\text{m}^2$ ve 120. saatte $0,338708987 \mu\text{m}^2$ olarak hesaplandı. 120. saatin sonunda 1.5mg/ml+20 µM Cis kombinasyonunun muamele edilmemiş AGS hücrelerine göre tümör hacmini 13.24 kat azalttığı tespit edildi ($p<0.0001$; Şekil 107).

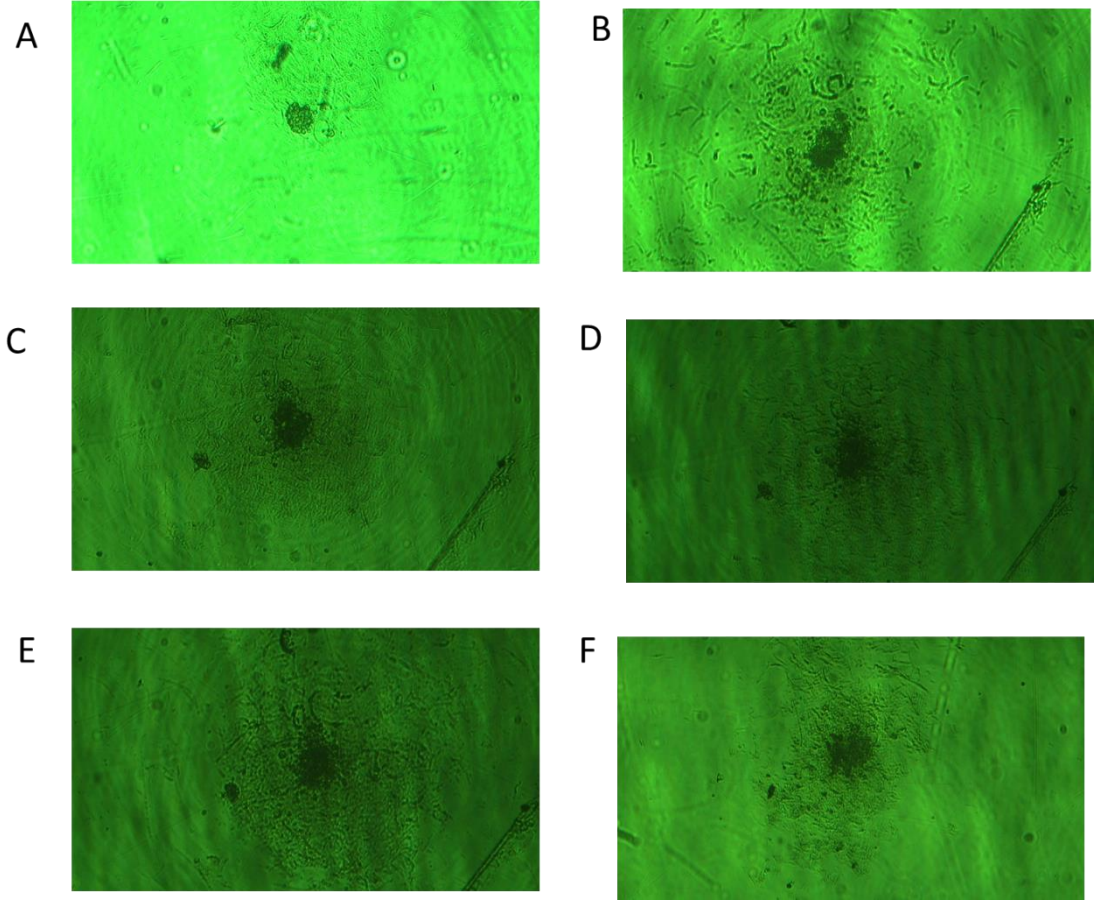


Şekil 107. 80 hücre ekilen 1.5 mg/ml OLE+20 μ M Cis kombinasyonu ile muamele edilmiş AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.

25 μ M 5-FU+20 μ M Cis kombinasyonunun 3B hücre kültür modelinde tümör hacmine etkisi 0. saatte 0,0735849 μm^2 , 24. saatte 0,523333333 μm^2 , 48. saatte 0,55536552 μm^2 , 72. saatte 0,368933777 μm^2 , 96. saatte 0,441645514 μm^2 ve 120. saatte 0,500134817 μm^2 olarak hesaplandı. 120. saatin sonunda 25 μ M 5-FU+20 μ M Cis kombinasyonunun muamele edilmemiş AGS hücrelerine göre tümör hacmini 8.74 kat azalttığı tespit edildi ($p<0.0001$; Şekil 108). 1.5 mg/ml OLE+25 μ M 5-FU+20 μ M Cis üçlü kombinasyonunun 3B hücre kültür modelinde tümör hacmine etkisi 0. saatte 0,0735849 μm^2 , 24. saatte 0,54723835 μm^2 , 48. saatte 0,597210272 μm^2 , 72. saatte 0,515522518 μm^2 , 96. saatte 0,321392083 μm^2 ve 120. saatte 0,414193802 μm^2 olarak hesaplandı. 1.5 mg/ml OLE+25 μ M 5-FU+20 μ M Cis üçlü kombinasyonunun 120 saatin sonunda muamele edilmemiş AGS hücrelerine göre tümör hacmini 10.65 kat küçülttüğü saptandı ($p<0.0001$; Şekil 109).

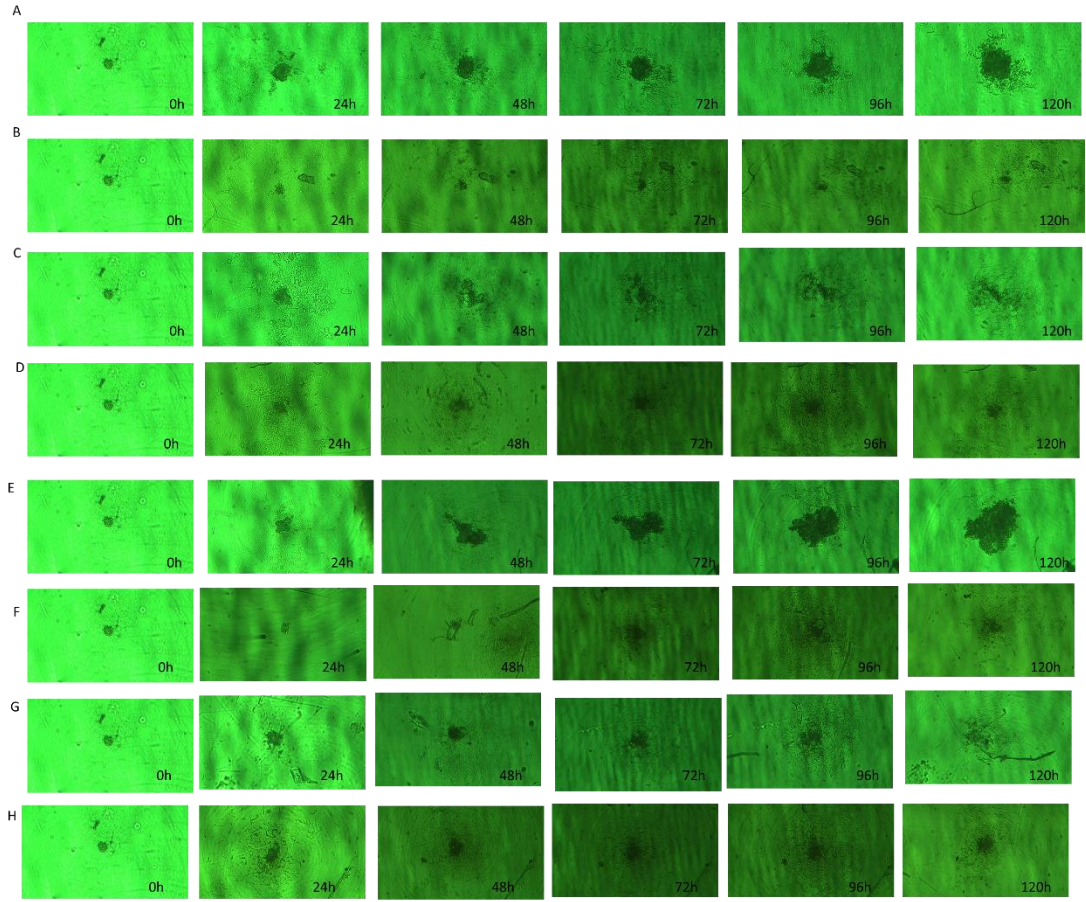


Şekil 108. 80 hücre ekilen 25 μ M 5-FU +20 μ M Cis ikili kombinasyonu ile muamele edilmiş AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.



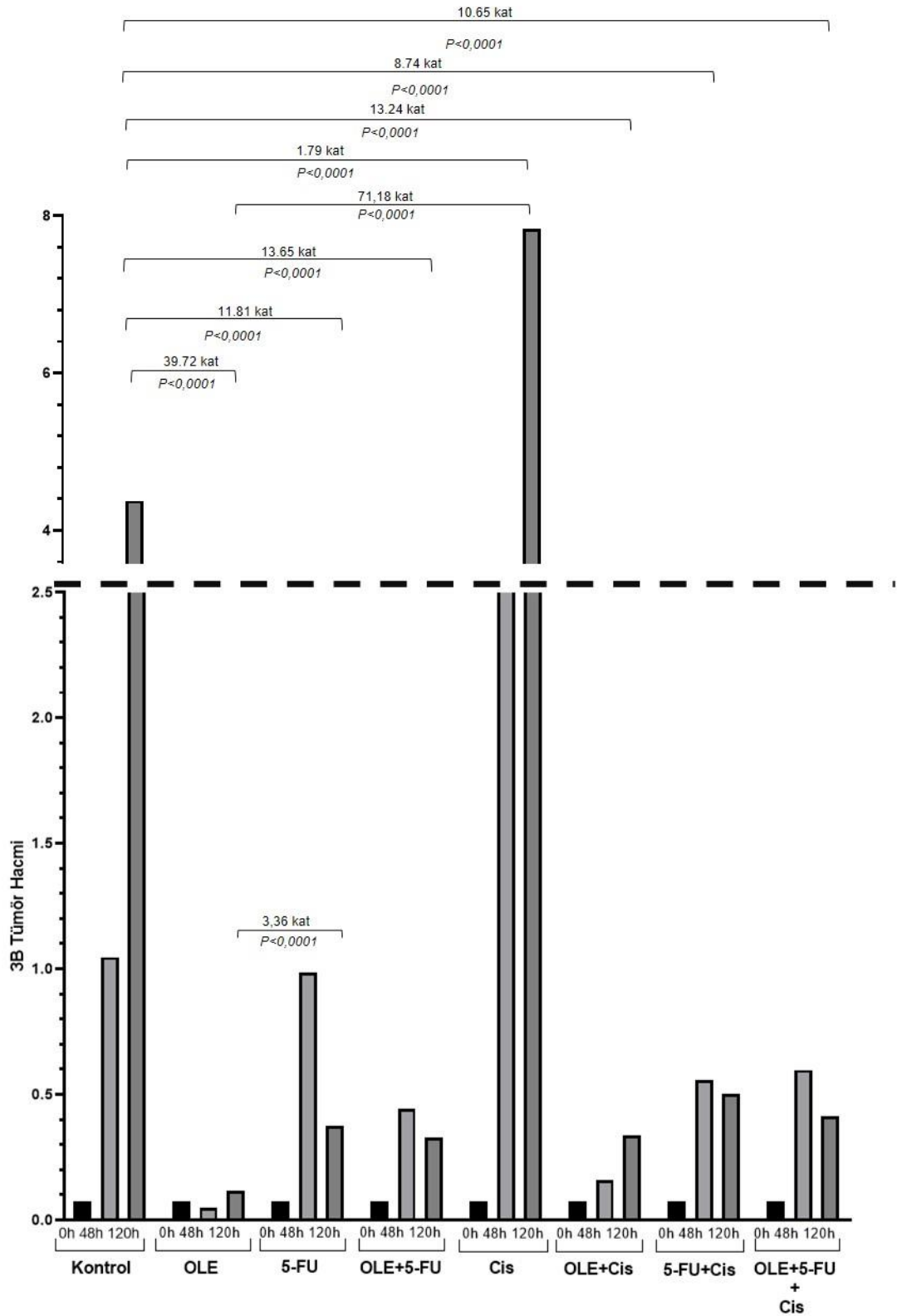
Şekil 109. 80 hücre ekilen 1.5 mg/ml OLE+25 µM 5-FU+20 µM Cis üçlü kombinasyonu ile muamele edilmiş AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.

Elde edilen bulgular doğrultusunda 3B hücre kültür modelinde OLE, 5-FU, OLE+5-FU, OLE+CİS, 5-FU+Cis, OLE+5-FU+Cis kombinasyonları ile muamele edildiğinde AGS hücrelerinin tümör boyutunu önemli ölçüde küçülttüğü, Cis ile muamelesinin ise tümör boyutunu artırdığı tespit edildi (Şekil 110).



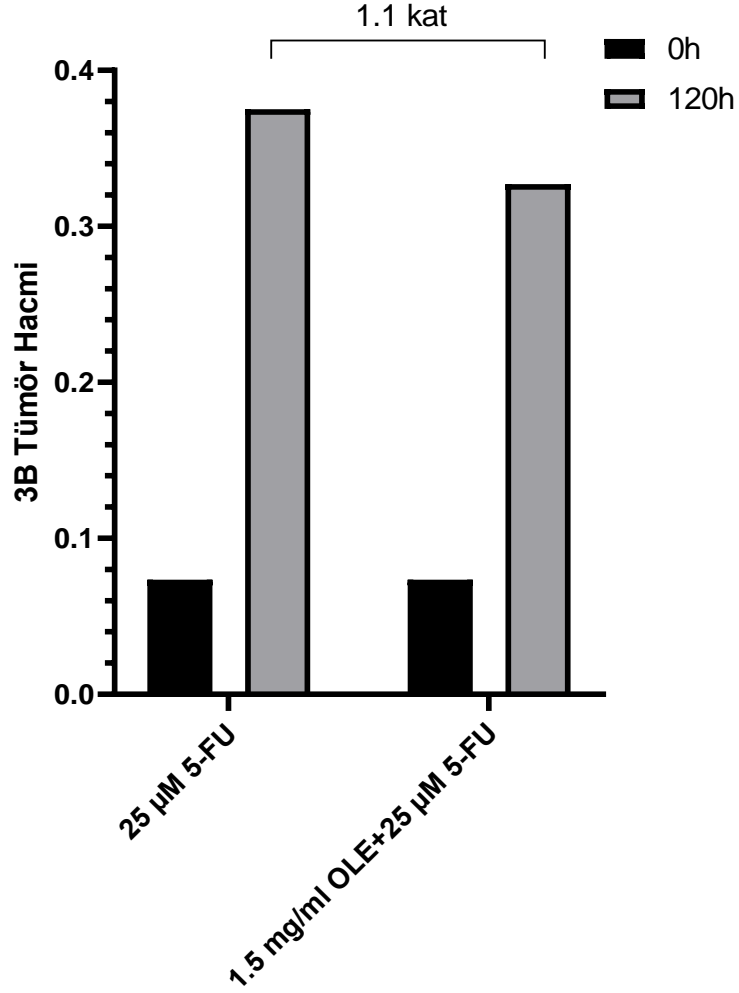
Şekil 110. AGS hücrelerinde farklı dozlar ile muamele edilmiş 80 hücre sayılı 3B kültür çalışmasında farklı saatlerdeki tümör boyutunun toplu gösterimi. **A:** Muamele edilmemiş AGS hücresi, **B:** 1.5 mg/ml OLE, **C:** 25 µM 5-FU, **D:** 1.5 mg/ml OLE + 25 µM 5-FU **E:** 20 µM Cis, **F:** 1.5 mg/ml OLE + 20 µM Cis, **G:** 25 µM 5-FU + 20 µM Cis, **H:** 1.5 mg/ml OLE + 25 µM 5-FU + 20 µM Cis.

3B hücre kültür modelinde 1.5 mg/ml OLE ile tedavi edilmiş AGS hücreleri 24. saatten itibaren muamele edilmemiş AGS hücrelerine göre tümör hacminde istatistiksel olarak anlamlı azalış saptandı ($p < 0,0001$; Şekil 111). Ayrıca tek başına OLE ile tedavi edilen hücre gruplarında tek başına 5-FU ve Cis ile tedavi edilen hücrelere kıyasla tümör hacminde önemli ölçüde küçülme gözlemlendi ($p < 0,0001$; Şekil 111).



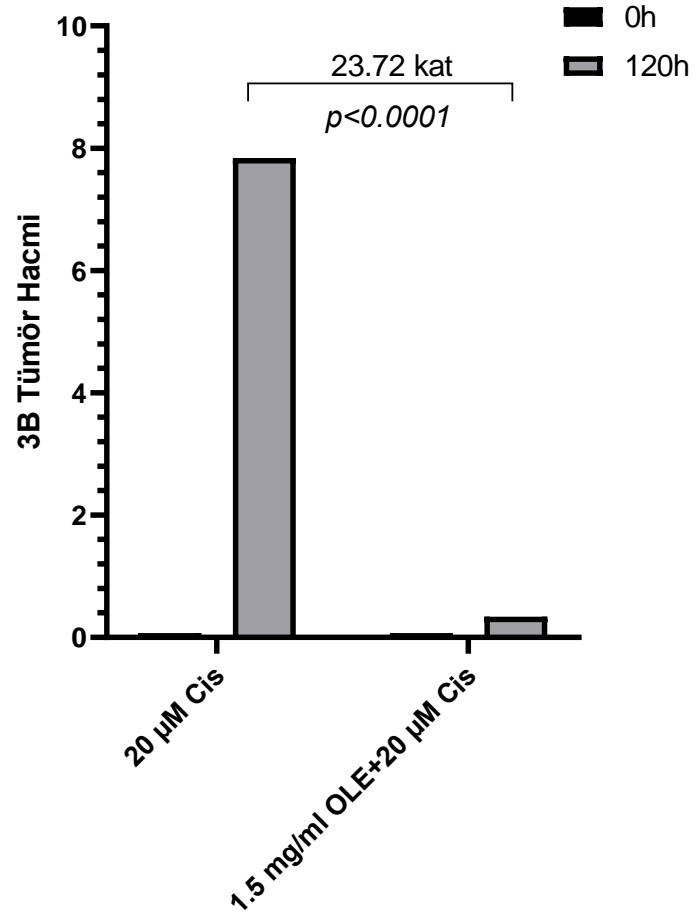
Şekil 111 . OLE ve kemoterapötik ajanları ile kombinasyonunun muamele edilmiş 3B AGS hücrelerine kıyasla tümör boyutuna etkisi (* p < 0.001, Two-way ANOVA). **Kontrol**: Muamele edilmemiş AGS hücresi. **OLE**: 1.5mg/ml OLE, **5-FU**: 25 µM 5-FU, **Cis**: 20 µM Cis.

1.5 mg/ml OLE +25 μ M 5-FU kombinasyonu ile muamele edilen AGS hücrelerinin 120. Saatin sonunda tek başına 25 μ M 5-FU muamele edilen hücelere kıyasla tümör hacminde 1,1 kat oranında azalış gözlemlendi (Şekil 112).



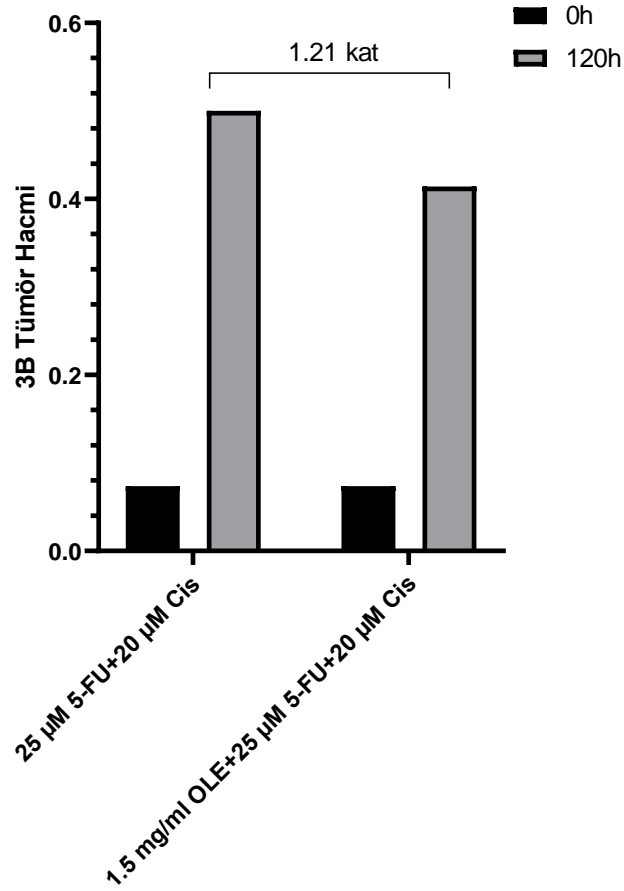
Şekil 112. 1.5 mg/ml OLE +25 μ M 5-FU kombinasyonu ile muamele edilen AGS hücrelerinin tek başına 25 μ M 5-FU ile muamele edilen AGS hücelerine göre tümör boyutundaki değişim (* p <0.001, Two-way ANOVA).

1.5 mg/ml OLE +20 μ M Cis kombinasyonu ile muamele edilen AGS hücrelerinin 120. Saatin sonunda tek başına 20 μ M Cis muamele edilen hücelere kıyasla tümör hacminde 23,72 kat oranında istatistiksel olarak anlamlı azalış saptandı (p <0.001; Şekil 113)



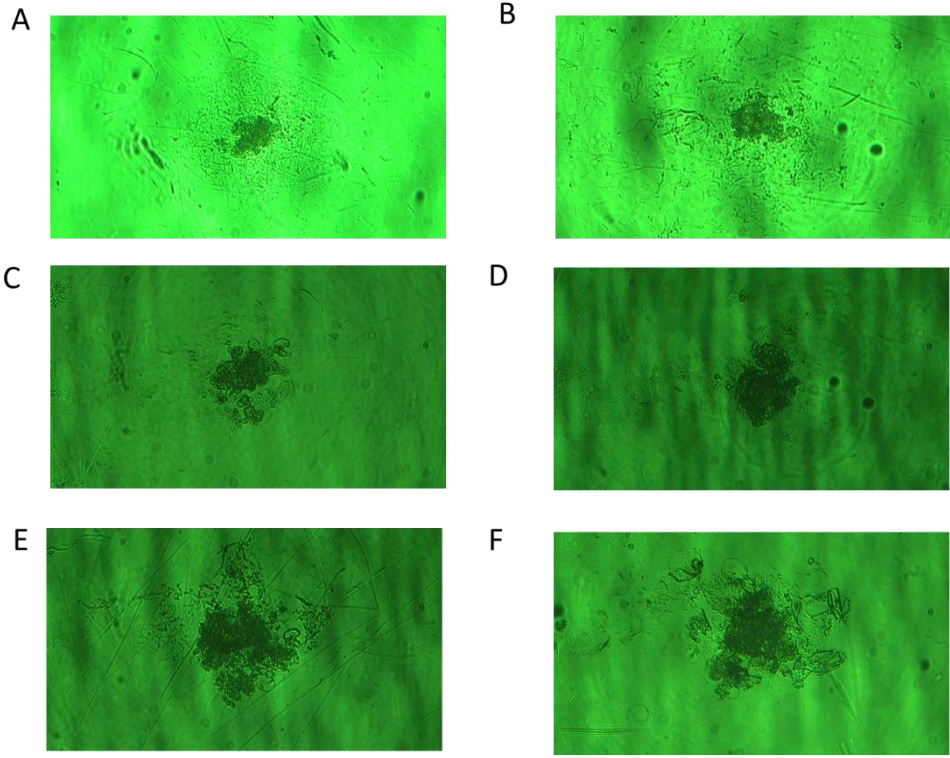
Şekil 113. 1.5 mg/ml OLE +20 µM Cis kombinasyonu ile muamele edilen AGS hücrelerinin tek başına 20 µM Cis ile muamele edilen AGS hücrelerine göre tümör boyutundaki değişiklik (* p <0.001, Two-way ANOVA).

1.5 mg/ml OLE+25 µM 5-FU+20 µM Cis üçlü kombinasyonu ile muamele edilen AGS hücrelerinin 120. saatin sonunda 25 µM 5-FU+20 µM Cis ikili kombinasyonu ile muamele edilen hücrelere kıyasla tümör hacminde 1,21 kat oranında azalış saptandı (Şekil 114).

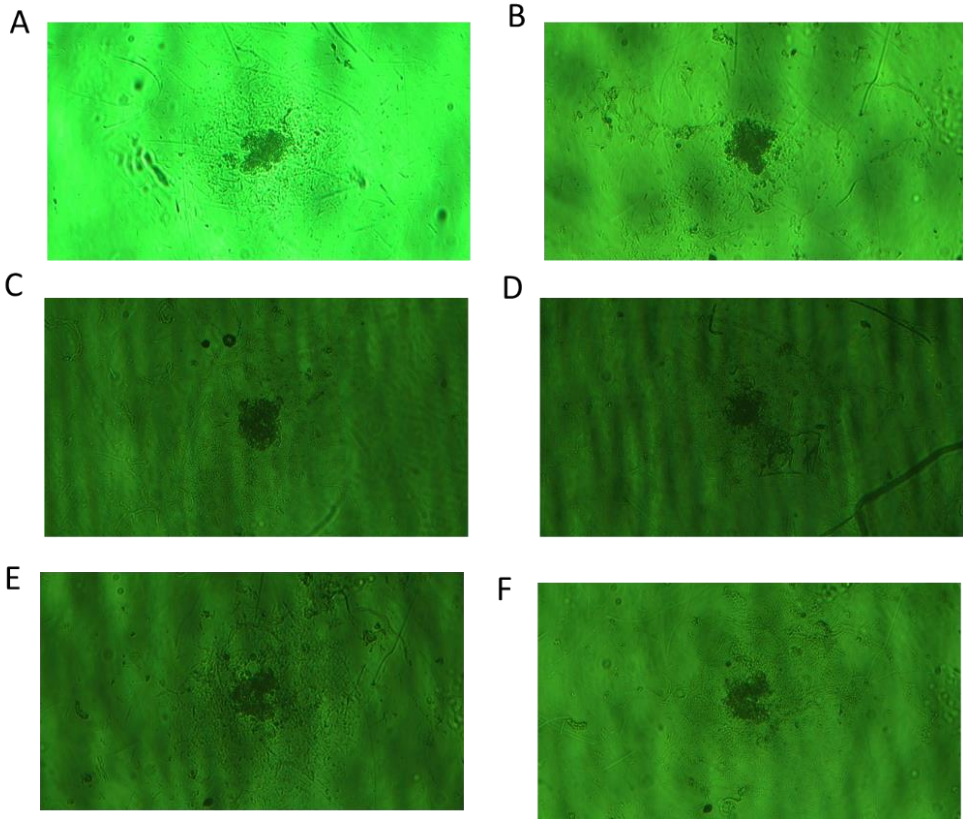


Şekil 114. 1.5 mg/ml OLE + 25 µM 5-FU + 20 µM Cis üçlü kombinasyonu ile muamele edilen AGS hücrelerinin 25 µM 5-FU + 20 µM Cis ikili kombinasyonu ile muamele edilen AGS hücrelerine göre tümör boyutundaki değişiklik (* p <0.001, Two-way ANOVA).

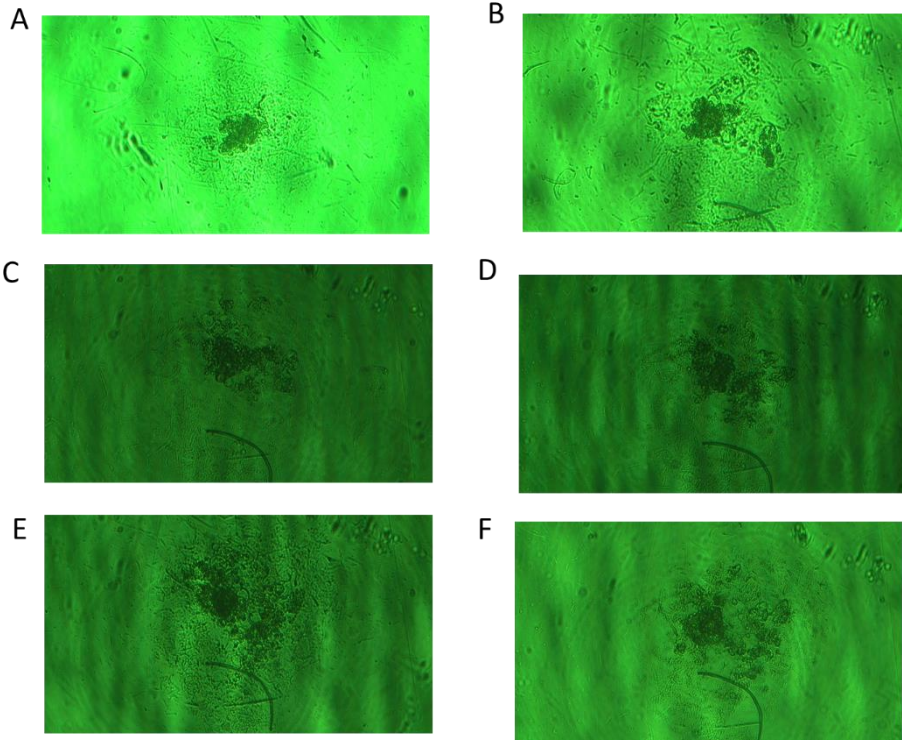
AGS hücrelerinde 3B Hücre kültür modelinde istatistiksel analizler yalnızca 80 hücre sayısında gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte 160 hücre sayısında farklı saatlerde elde edilen verilere göre, muamele edilmemiş hücrelere kıyasla OLE, 5-FU, OLE+5-FU, Cis+OLE, 5-FU+Cis, OLE+5-FU+Cis doz gruplarında 80 hücre sayısında gerçekleştirilen analiz ile benzer şekilde tümör boyutunda küçülme saptandı. Ancak Cis ile muamelesinin tümör boyutunu küçültücü yönünde bir etkisi olmadığı görüldü (Şekil 115-122).



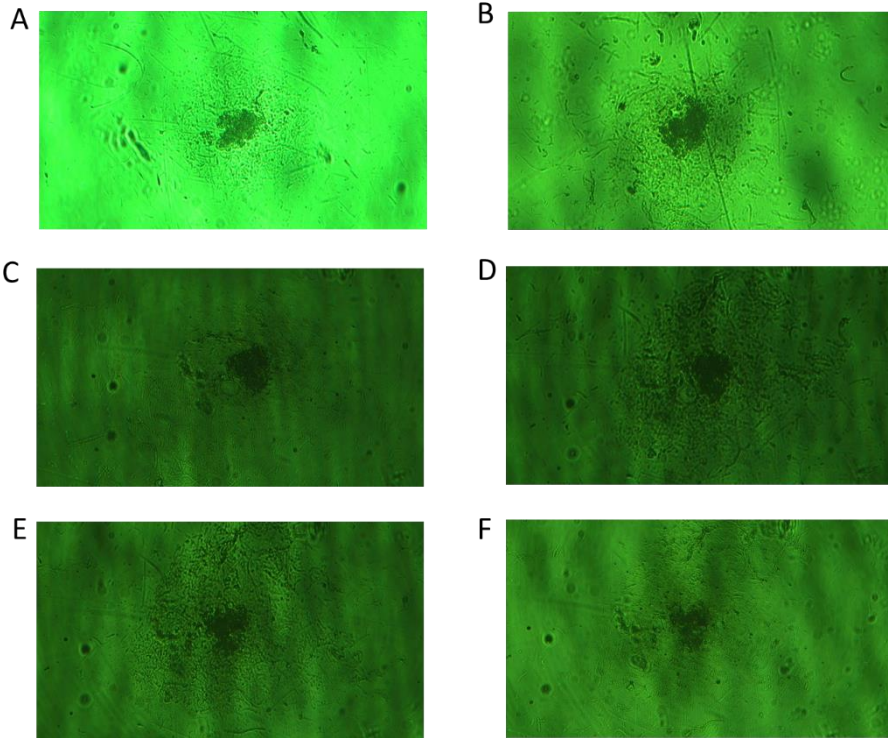
Şekil 115. 160 sayıda hücre ekilen muamele edilmemiş AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.



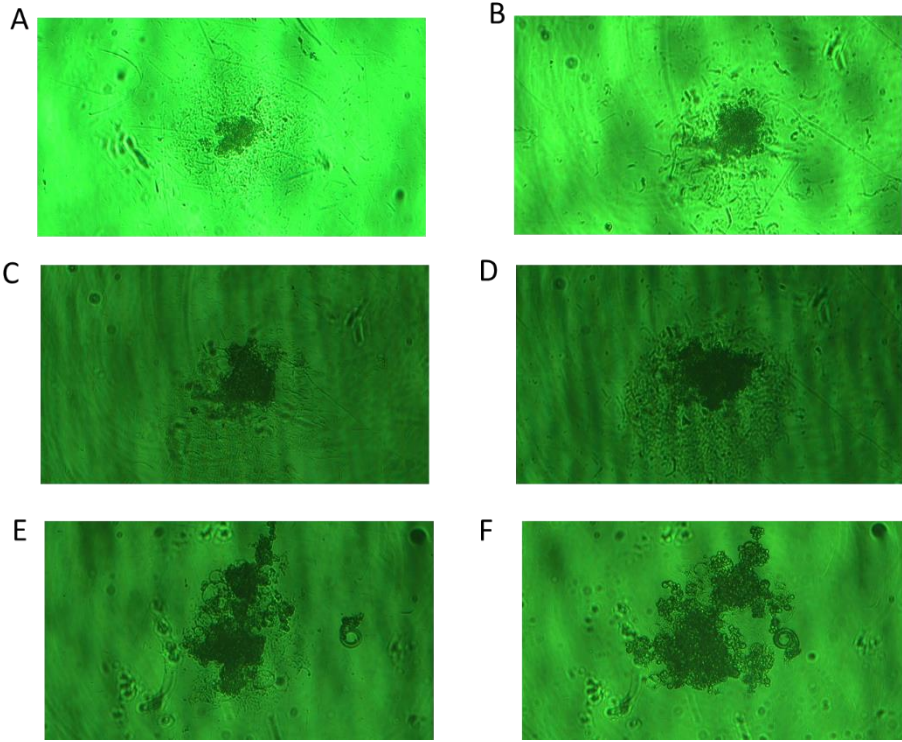
Şekil 116. 160 sayıda hücre ekilen 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilen AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.



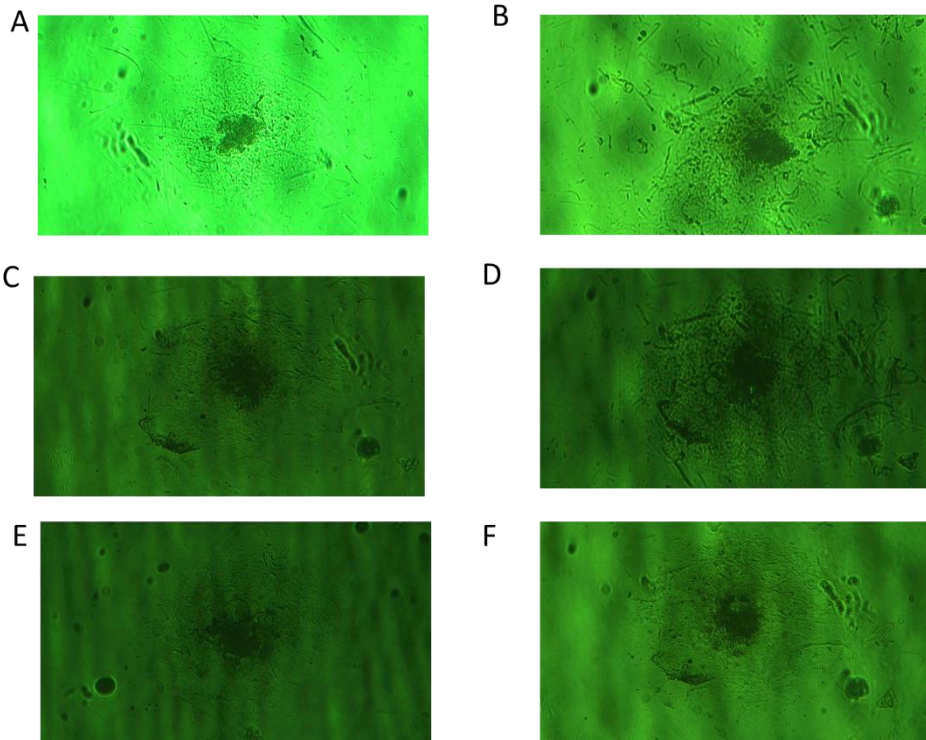
Şekil 117. 160 sayıda hücre ekilen 25 µM 5-FU ile muamele edilen AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.



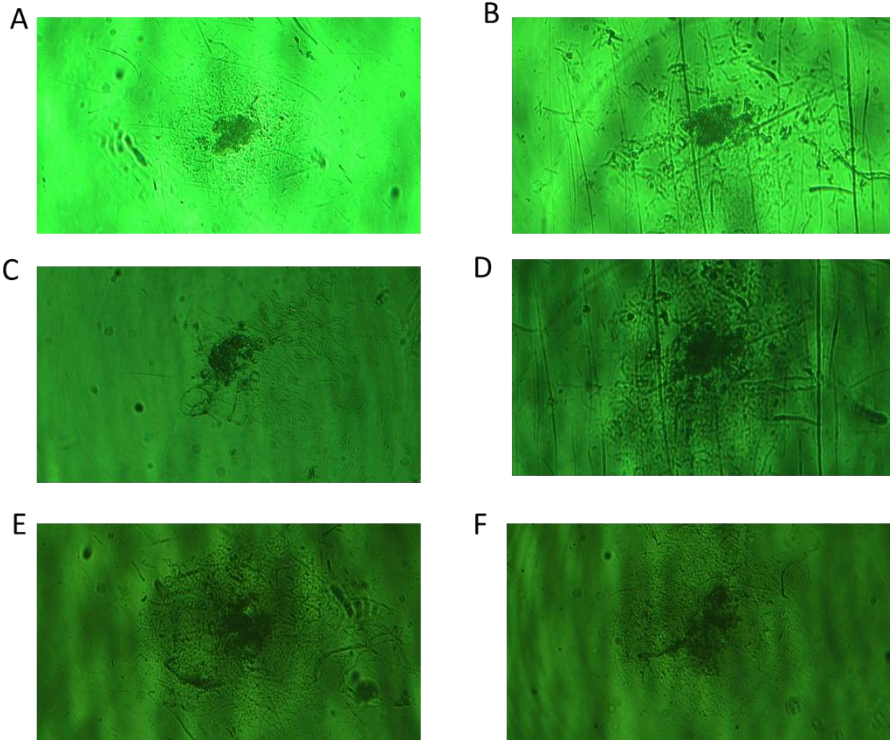
Şekil 118. 160 sayıda hücre ekilen 1.5 mg/ml OLE+25 µM 5-FU kombinasyonu ile muamele edilen AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.



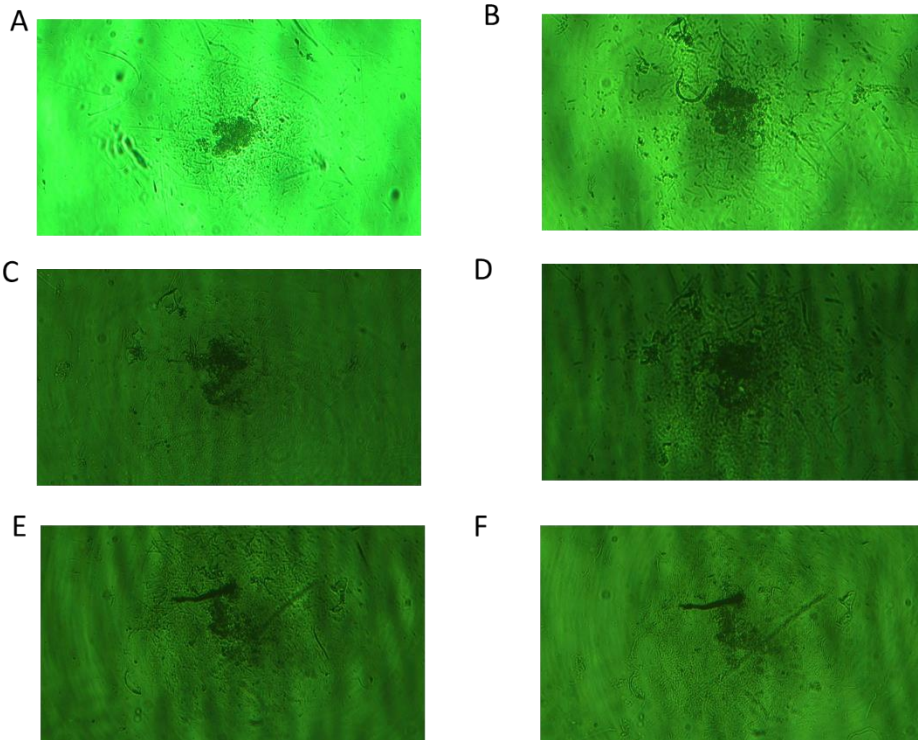
Şekil 119. 160 sayıda hücre ekilen 20 µM Cis ile muamele edilen AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.



Şekil 120. 160 sayıda hücre ekilen 1.5mg/ml OLE+ 20 µM Cis kombinasyonu ile muamele edilen AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.



Şekil 121. 160 sayıda hücre ekilen 25 µM 5-FU+ 20 µM Cis ikili kombinasyonu ile muamele edilen AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.



Şekil 122. 160 sayıda hücre ekilen 1.5 mg/ml OLE+25 µM 5-FU+ 20 µM Cis üçlü kombinasyonu ile muamele edilen AGS hücrelerinin 3B kültür modelinde farklı saatlerdeki tümör boyutlarının görüntülenmesi **A:** 0h, **B:** 24h, **C:** 48h, **D:** 72h, **E:** 96h, **F:** 120h.

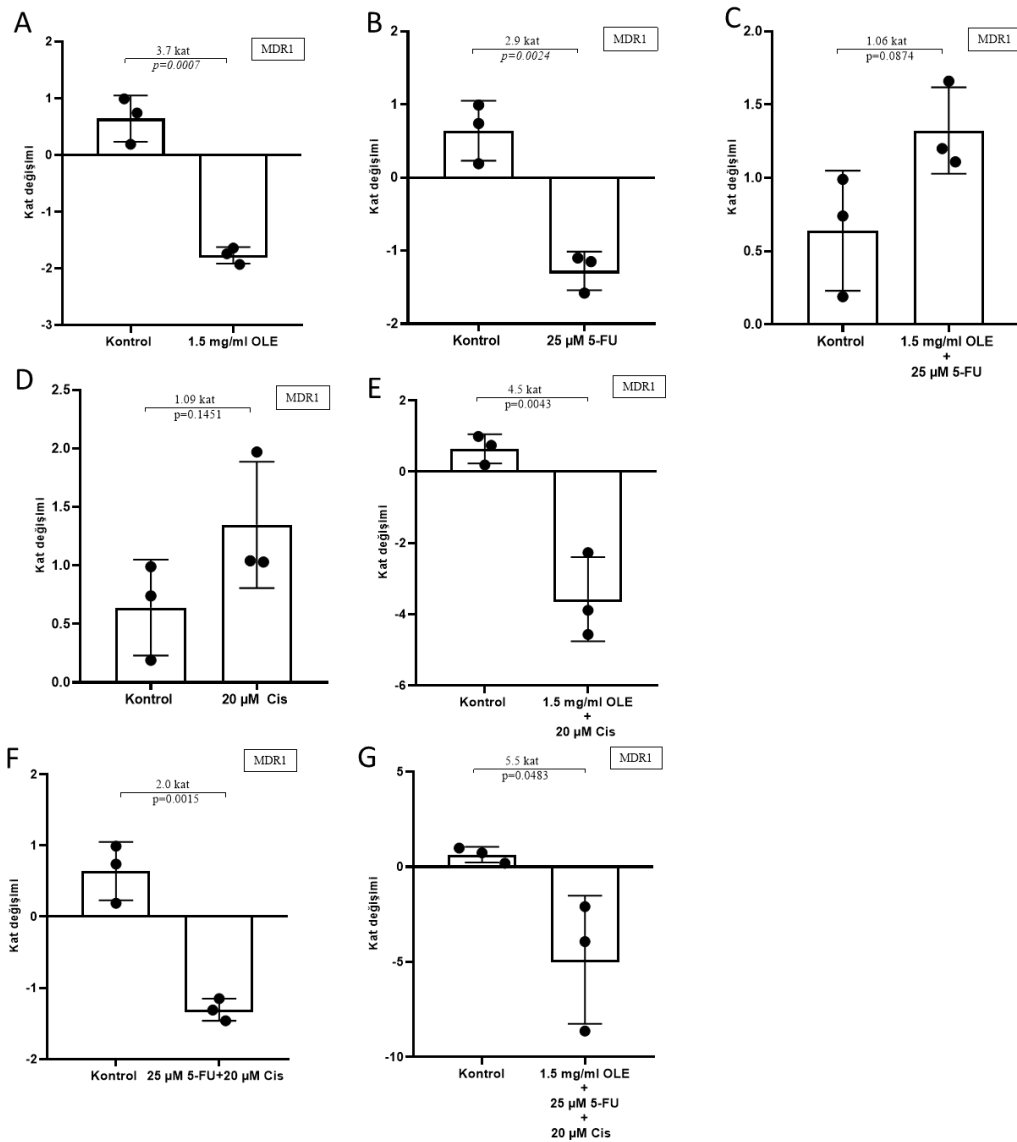
4.8. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerinde Çoklu İlaç Direnci Mekanizması ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Seviyeleri Üzerine Etkinliğinin Değerlendirilmesi

OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte AGS hücrelerinde MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri üzerine etkinliği MDR ile ilişkili *MRP1*, *MRP5* ve *LRP1* genlerinin mRNA ekspresyon seviyelerinin analiz edilmesi ile bulundu. Elde edilen bulgular doğrultusunda gerçekleştirilen istatistiksel analizler Tablo 34'de gösterildi (Tablo 34).

Tablo 34. AGS hücrelerinde MDR ile ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri

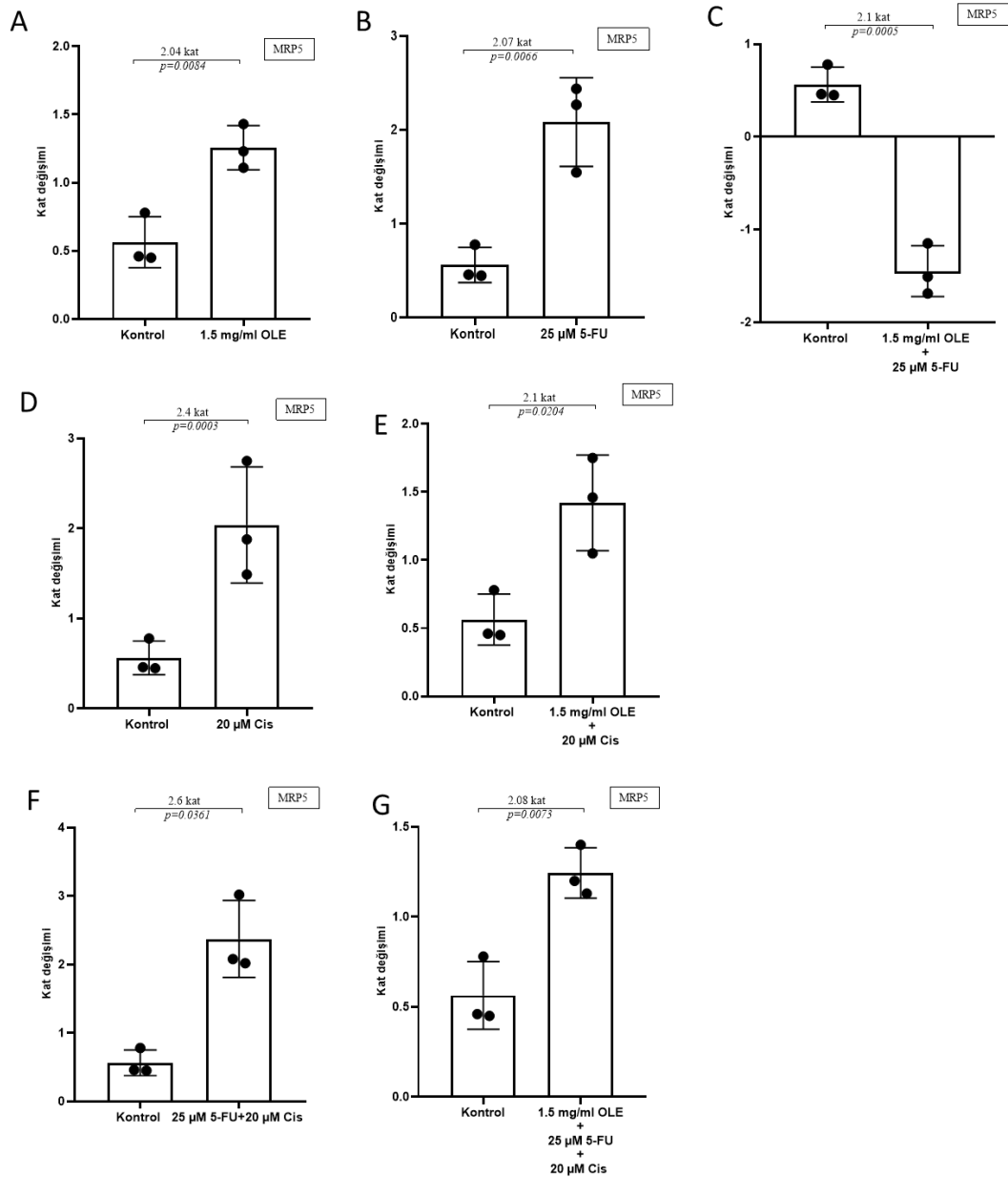
		<i>MDR1</i>	<i>MRP5</i>	<i>LRP1</i>
1.5 mg/ml OLE				
	2 ⁻ ΔCT	0,000002	0,000894	0,000167
	Kat Değişimi	-3,7	2,04	-3,2
	p value	<i>p</i> =0,0007	<i>p</i> =0,0084	<i>p</i> =0,0090
25 μM 5-FU				
	2 ⁻ ΔCT	0,000002	0,000869	0,002367
	Kat Değişimi	-2,9	2,07	4,5
	p value	<i>p</i> =0,0024	<i>p</i> =0,0066	<i>p</i> =0,0014
1.5 mg/ml OLE + 25 μM 5-FU				
	2 ⁻ ΔCT	0,000015	0,000367	0,001087
	Kat Değişimi	1,06	-2,1	-2,4
	p value	<i>p</i> =0,0874	<i>p</i> =0,0003	<i>p</i> =0,0121
20 μM Cis				
	2 ⁻ ΔCT	0,000004	0,001054	0,002586
	Kat Değişimi	1,09	2,4	1,7
	p value	<i>p</i> =0,1451	<i>p</i> =0,0003	<i>p</i> =0,1197
1.5 mg/ml OLE 20 μM Cis				
	2 ⁻ ΔCT	0,000001	0,000978	0,001151
	Kat Değişimi	-4,5	2,1	0,6
	p value	<i>p</i> =0,0043	<i>p</i> =0,0204	<i>p</i> =0,0958
25 μM 5-FU + 20 μM Cis				
	2 ⁻ ΔCT	0,000001	0,001155	0,003233
	Kat Değişimi	-2	2,6	4,5
	p value	<i>p</i> =0,0015	<i>p</i> =0,0361	<i>p</i> =0,0032
1.5 mg/ml OLE + 25 μM 5-FU + 20 μM Cis				
	2 ⁻ ΔCT	0,000001	0,000719	0,000493
	Kat Değişimi	-5,5	2,08	-1,4
	p value	<i>p</i> =0,0483	<i>p</i> =0,0073	<i>p</i> =0,2000

Bulgularımız doğrultusunda 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilen AGS hücrelerinin muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde *MDR1* geninin (-3,7 kat değişimi; $p=0,0002$) mRNA ekspresyon seviyesini azalttığı görüldü. Tek başına 5-FU, Cis+OLE, 5-FU+Cis ve OLE+5-FU+Cis kombinasyonu kombinasyonu ile muamelesinin muamelesiz hücrelere kıyasla *MDR1* geninin ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı saptandı. Ancak 5-FU+OLE kombinasyonunun muamelesiz hücrelere kıyasla *MDR1* geninin ekspresyon seviyesini azaltıcı yönde etkisi olmadığı belirlendi (Şekil 123).



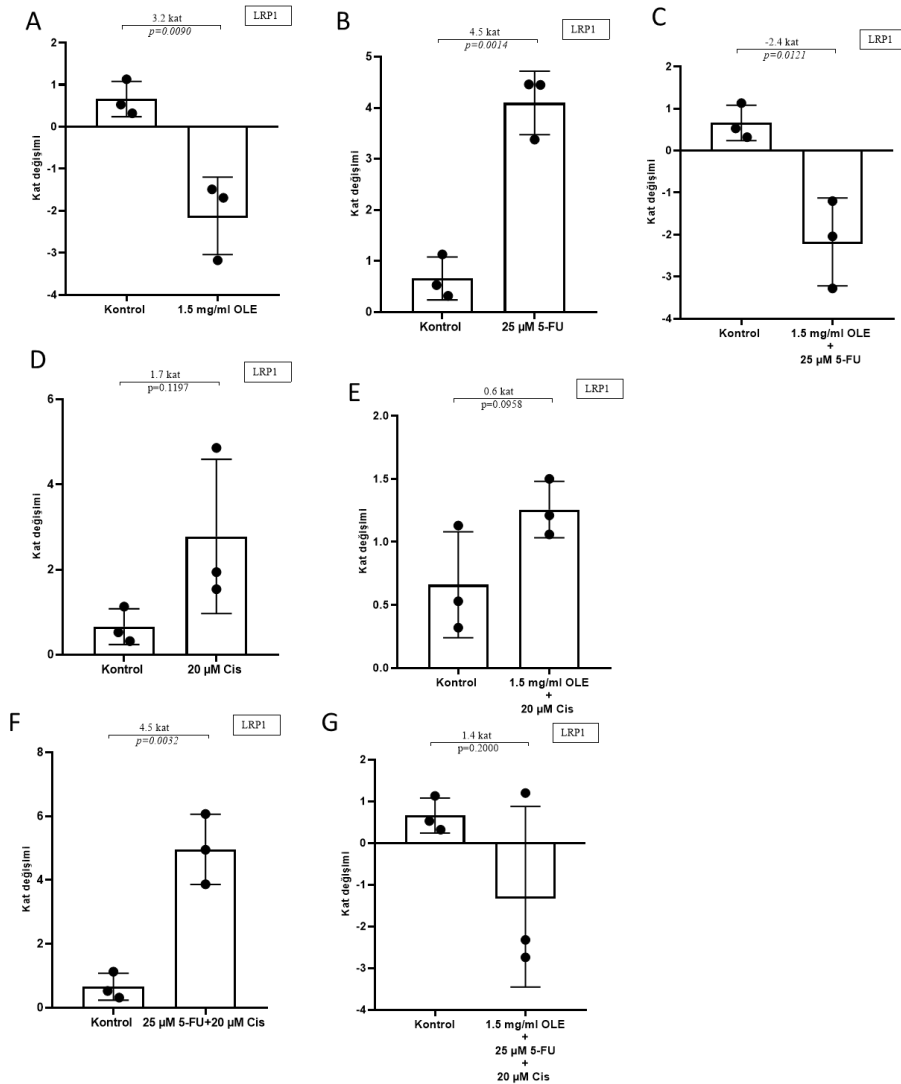
Şekil 123. OLE ve kemoterapötik ajanlar ile muamele edilen AGS hücrelerinin *MDR1* geninin mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi. **A:** 1.5 mg/ml OLE. **B:** 25 μ M 5-FU. **C:** 1.5 mg/ml OLE+25 μ M 5-FU. **D:** 20 μ M Cis. **E:** 1.5 mg/ml OLE+ 20 μ M Cis. **F:** 25 μ M 5-FU + 20 μ M Cis **G:**1.5 mg/ml OLE+25 μ M 5-FU + 20 μ M Cis

Bulgularımız doğrultusunda OLE, 5-FU, Cis, Cis+OLE, 5-FU+Cis ve OLE+5-FU+Cis muamelelerinin muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla *MRP5* geninin ekspresyonunu azaltıcı yönde bir etki oluşturmadığı görüldü (Şekil 124). Ancak OLE+5-FU kombinasyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde *MRP5* geninin ekspresyon seviyesini azalttığı saptandı (-2.1 kat değişimi; $p=0,0003$).



Şekil 124. OLE ve kemoterapötik ajanlar ile muamele edilen AGS hücrelerinin *MRP5* geninin mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi. **A:** 1.5 mg/ml OLE. **B:** 25 μ M 5-FU. **C:** 1.5 mg/ml OLE+25 μ M 5-FU. **D:** 20 μ M Cis. **E:** 1.5 mg/ml OLE+ 20 μ M Cis. **F:** 25 μ M 5-FU + 20 μ M Cis **G:**1.5 mg/ml OLE+25 μ M 5-FU + 20 μ M Cis

Bulgularımız doğrultusunda 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilen AGS hücrelerinin muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde *LRP1* (-3,2 kat değişimi; $p=0,0090$) geninin mRNA ekspresyon seviyesini azalttığı görüldü. Muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla 5-FU, Cis, Cis+OLE, 5-FU+Cis kombinasyonunun *LRP1* geninin ekspresyon seviyesini azaltıcı yönünde bir etkisi olmadığı görüldü (Şekil 125). OLE+5-FU kombinasyonunun muamelesiz hücrelere kıyasla *LRP1* geninin ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı, OLE+5-FU+Cis kombinasyonunun ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir şekilde azalttığı saptandı (sırasıyla, -2,4 kat değişimi; $p=0,0121$; 1,4 kat değişimi; $p=0,200$)



Şekil 125. OLE ve kemoterapötik ajanlar ile muamele edilen AGS hücrelerinin *LRP1* geninin mRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi. **A:** 1.5 mg/ml OLE. **B:** 25 μ M 5-FU. **C:** 1.5 mg/ml OLE+25 μ M 5-FU. **D:** 20 μ M Cis. **E:** 1.5 mg/ml OLE+ 20 μ M Cis. **F:** 25 μ M 5-FU + 20 μ M Cis **G:**1.5 mg/ml OLE+25 μ M 5-FU + 20 μ M Cis

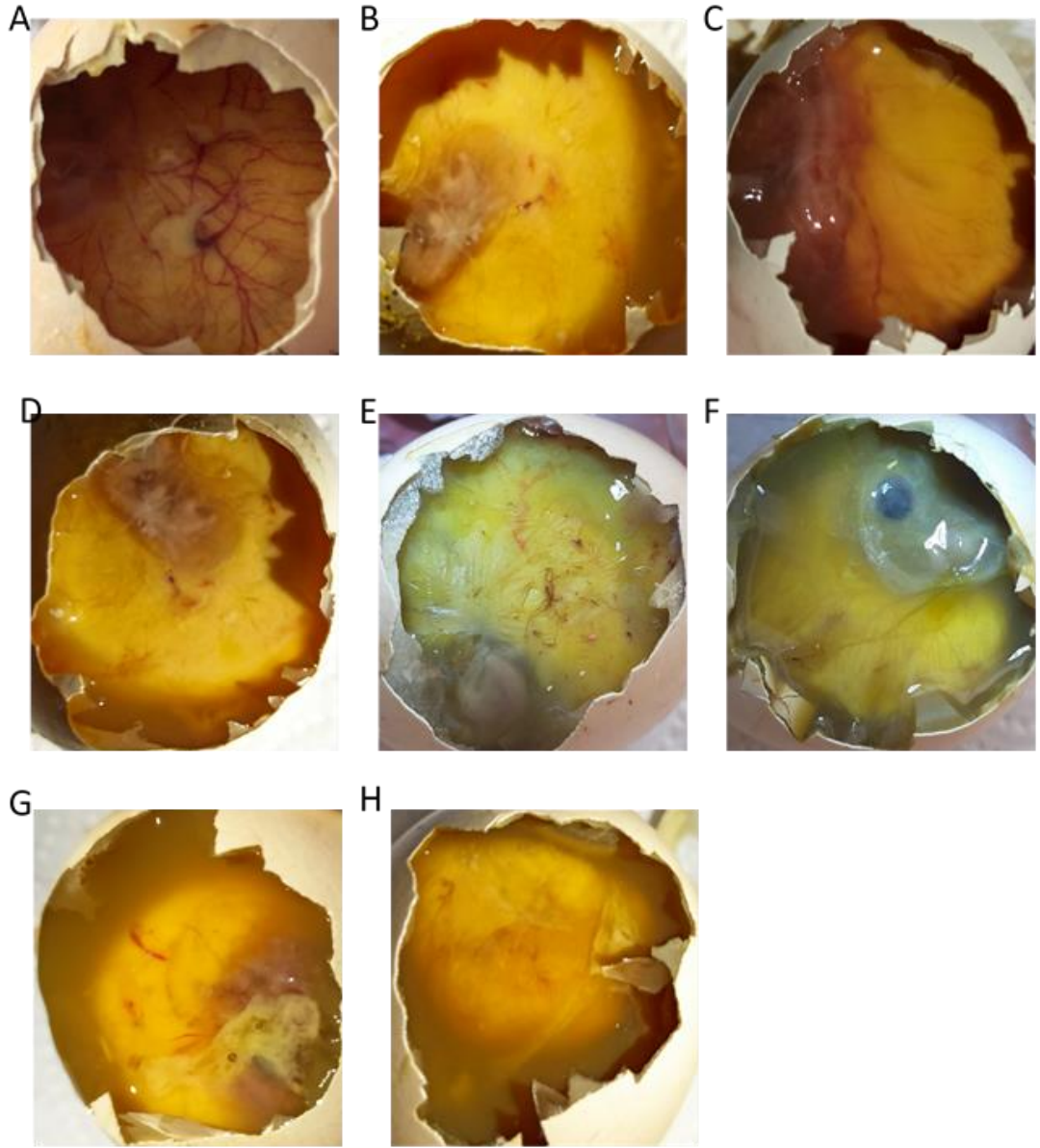
4.9. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerinin Damar Gelişimi Üzerine Etkileri

En az 10 tekrarlı olarak embriyolu tavuk yumurtalarının koryo-allantoik zarı üzerine, her bir yumurtaya $1 \times 10^6 / 20 \mu\text{l}$ hücre ve OLE, 5-FU, Cis, OLE + 5-FU, OLE + Cis, 5-FU + Cis, OLE + 5-FU + Cis kombinasyonlarının etken dozları ekildi. 10 gün büyümeye bırakılan tavuk yumurtalarından bu süre sonunda ölü olduğu belirlenen yumurtalar çalışma dışı bırakıldı. Etken doz muamelesine bağlı olarak tümör gelişen ve gelişmeyen yumurta sayıları Tablo 35'de belirtilmiştir (Tablo 35). En az 4 tekrarlı olacak şekilde deneyler gerçekleştirildi.

Tablo 35. OLE ve kemoterapötik ajanların tek başına ve kombinasyonlarının muamelesine bağlı olarak embriyolu yumurtalarda tümör gelişim oranı

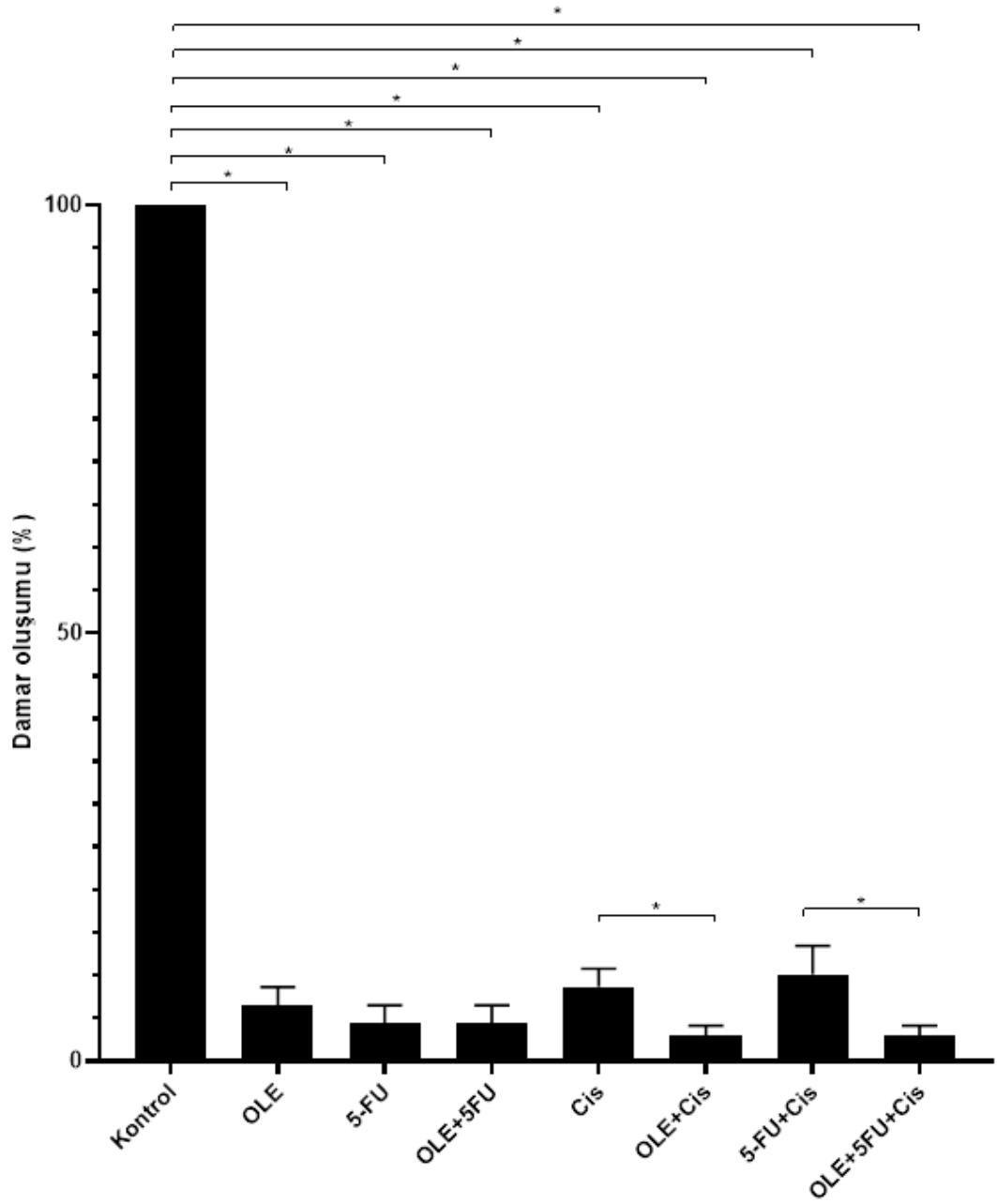
	AGS	AGS+OLE	AGS+5-FU	AGS+OLE+5-FU	AGS+Cis	AGS+OLE+Cis	AGS+5-FU+Cis	AGS+OLE+5-FU+Cis
Toplam yumurta sayısı	10	10	10	10	10	10	10	10
Tümör gelişen yumurta sayısı	8	6	6	5	4	5	5	4
Tümör gelişmeyen yumurta sayısı	0	3	3	1	2	2	2	4
Ölü yumurta sayısı	2	1	1	4	4	3	3	2

OLE, 5-FU, Cis, OLE + 5-FU, OLE + Cis, 5-FU + Cis, OLE + 5-FU + Cis kombinasyonlarının etken dozları ile muamelesinin embriyolu yumurtada tümör oluşumu ve damarlanma üzerine etkisi şekil 126'da gösterilmiştir.



Şekil 126. OLE ve kemoterapötik ajanların tek başına ve kombinasyonlarının tümör oluşumu ve damarlanma üzerine etkisi. (A) Kontrol, (B) OLE, (C) 5-FU, (D) Cis, (E) OLE + 5-FU, (F) OLE + Cis, (G) 5-FU + Cis, (H) OLE + 5-FU + Cis.

AGS hücrelerinde, muamele edilmemiş kontrol AGS grubunun ortalama damar sayısı 46 iken, OLE, 5-FU, OLE + 5-FU, Cis, OLE + Cis, 5-FU + Cis, OLE + 5-FU + Cis gruplarının ortalama damar sayısı sırasıyla; 3, 2, 2, 4, 1, 5, 1 olarak belirlendi (Şekil 127). Muamele edilmemiş AGS hücrelerinin oluşturduğu damar sayısının muamele edilmiş hücrelerden istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla olduğu tespit edildi (Şekil 127). Aynı zamanda tek başına Cis ve 5-FU+Cis ile muamele edilen hücrelere göre, OLE+Cis ve OLE+5-FU+Cis ile muamele edilen hücrelerin oluşturduğu damar sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha az olduğu belirlendi (Şekil 127).



Şekil 127. OLE ve kemoterapötik ajanların tek başına ve kombinasyonlarının AGS hücrelerinde damar oluşturma yeteneklerine etkisi (* p<0.001, Bağımsız t-test).

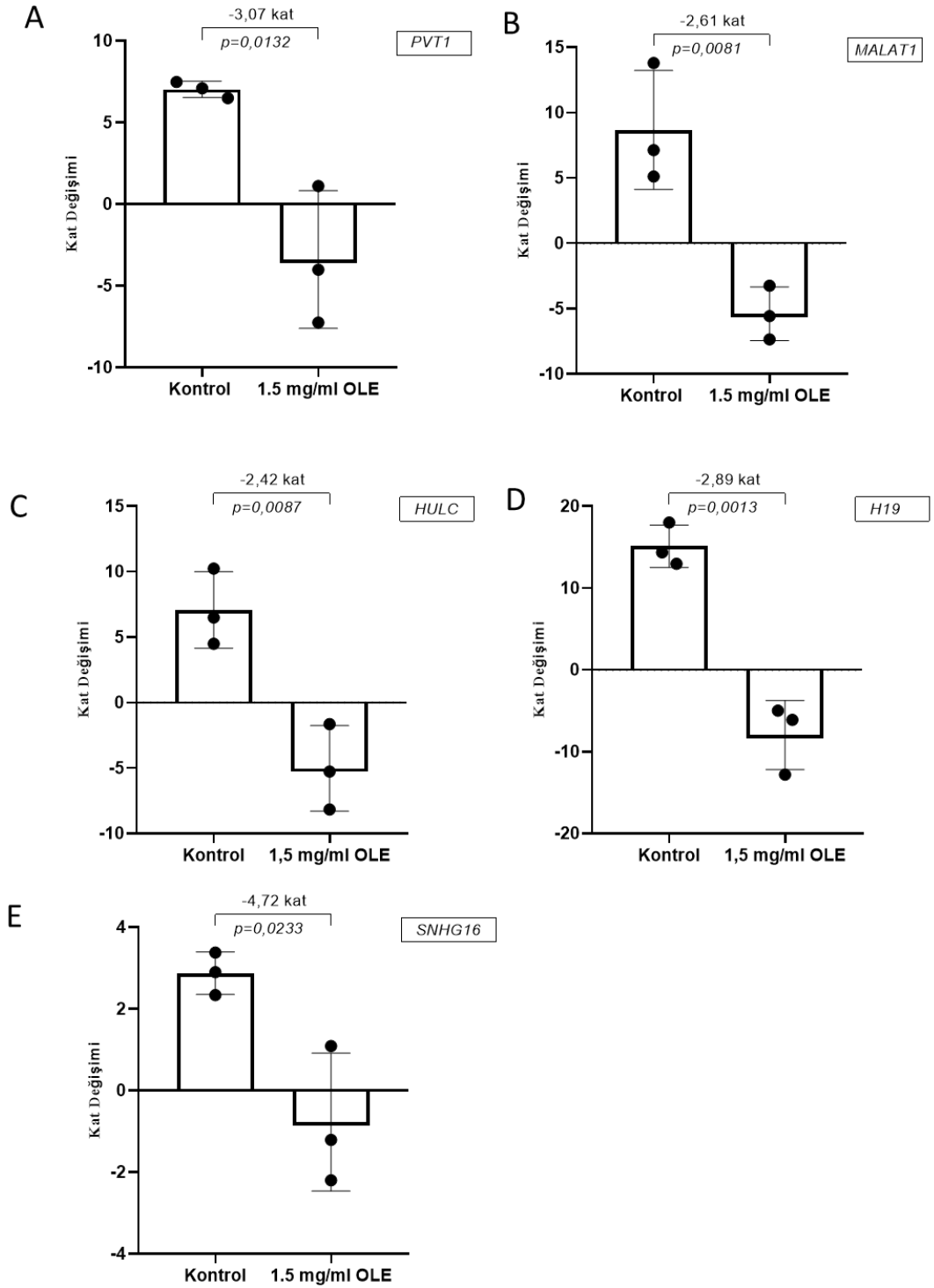
4.10. OLE'nin Tek Başına ve Kemoterapötik Ajanlar ile Birlikte AGS Hücrelerinin Epigenetik Mekanizma Olan LncRNA Ekspresyon Seviyeleri Üzerindeki Etkisi

AGS hücrelerinde OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte kombinasyon durumunda PVT1, MALAT1, HULC, H19 ve SNHG16 LncRNA ekspresyon seviyelerine etkisi istatistiksel analizler doğrultusunda elde edilen veriler ile değerlendirildi (Tablo 36).

Tablo 36. AGS hücrelerinde LncRNA ekspresyon seviyeleri

	<i>PVT1</i>	<i>MALAT1</i>	<i>HULC</i>	<i>H19</i>	<i>SNHG16</i>
1.5 mg/ml OLE					
2 ^Δ -ΔCT	0,000091	0,052814	0,000024	0,00619	0,033419
Kat Değişimi	-3,07	-2,61	-2,42	-2,89	-4,72
p value	<i>p</i> =0,0132	<i>p</i> =0,0081	<i>p</i> =0,0087	<i>p</i> =0,0013	<i>p</i> =0,0233
25 μM 5-FU					
2 ^Δ -ΔCT	0,000249	0,147435	0,000022	0,010187	0,022242
Kat Değişimi	-1,27	-7,33	-6,1	-11,69	-1,49
p value	<i>p</i> =0,0151	<i>p</i> =0,0187	<i>p</i> =0,0190	<i>p</i> =0,0010	<i>p</i> =0,0396
1.5 mg/ml OLE + 25 μM 5-FU					
2 ^Δ -ΔCT	0,000099	0,024862	0,000029	0,006992	0,032721
Kat Değişimi	-3,54	-7,03	-3,8	-12,49	-1,09
p value	<i>p</i> =0,0008	<i>p</i> =0,0081	<i>p</i> =0,0287	<i>p</i> <0,0009	<i>p</i> <0,018
20 μM Cis					
2 ^Δ -ΔCT	0,00018	0,073582	0,00002	0,006558	0,005946
Kat Değişimi	-3,71	-5,38	-4,7	-9,94	-1,24
p value	<i>p</i> =0,0003	<i>p</i> =0,0395	<i>p</i> =0,0064	<i>p</i> =0,0010	<i>p</i> =0,2030
1.5 mg/ml OLE 20 μM Cis					
2 ^Δ -ΔCT	0,000107	0,112696	0,000056	0,006264	0,024052
Kat Değişimi	-3,4	-11,98	-3,53	-5,21	-2,28
p value	<i>p</i> =0,0004	<i>p</i> =0,002	<i>p</i> =0,0226	<i>p</i> =0,0002	<i>p</i> =0,0005
25 μM 5-FU + 20 μM Cis					
2 ^Δ -ΔCT	0,000174	0,122126	0,000076	0,00784	0,011421
Kat Değişimi	-6,32	-6,17	-2,1	-8,63	-4,1
p value	<i>p</i> =0,0010	<i>p</i> =0,038	<i>p</i> =0,0533	<i>p</i> =0,0009	<i>p</i> =0,0350
1.5 mg/ml OLE + 25 μM 5-FU + 20 μM Cis					
2 ^Δ -ΔCT	0,000114	0,063128	0,000371	0,005452	0,022722
Kat Değişimi	-0,45	-7,07	-1,32	-8,6	-4,18
p value	<i>p</i> =0,0003	<i>p</i> =0,0298	<i>p</i> =0,1959	<i>p</i> =0,0022	<i>p</i> =0,0171

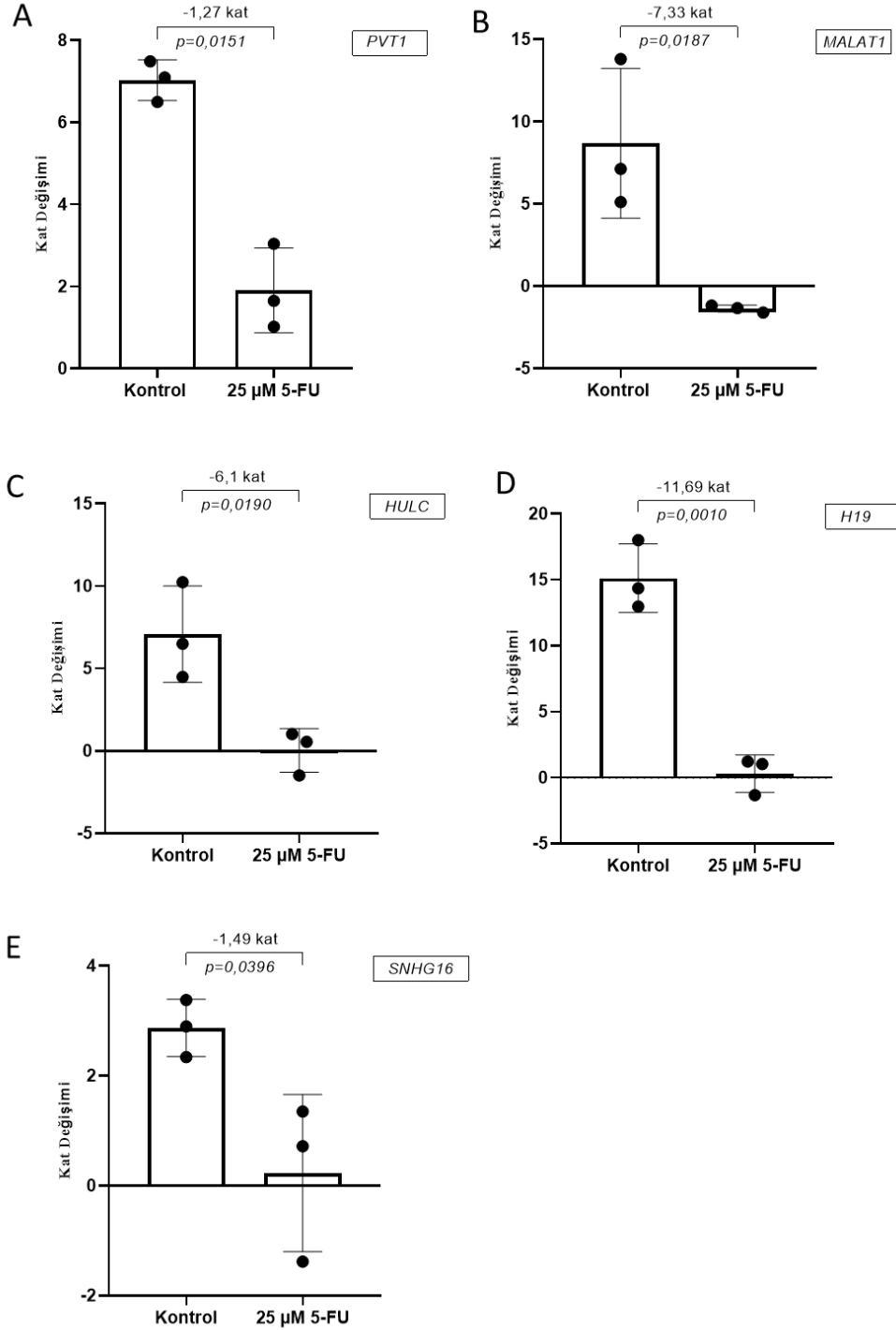
Bulgularımız doğrultusunda 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilen AGS hücrelerinin muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde LncRNA PVT1 -3,07 kat değişimi, MALAT1'i -2,61 kat değişimi, HULC'u -2,42 kat değişimi, H19'u -2,89 kat değişimi ve SNHG16 -4,72 kat değişimi göstererek ekspresyon seviyelerini azalttığı tespit edildi (sırasıyla, *p*=0,0132; *p*=0,0081; *p*=0,008; *p*=0,0013; *p*=0,0233; Şekil 128).



Şekil 128. 1.5 mg/ml OLE'nin AGS hücrelerinin LncRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi. **A:** PVT1, **B:** MALAT1, **C:**HULC, **D:** H19, **E:** SNHG16 (* $p<0,001$, Bağımsız t-test).

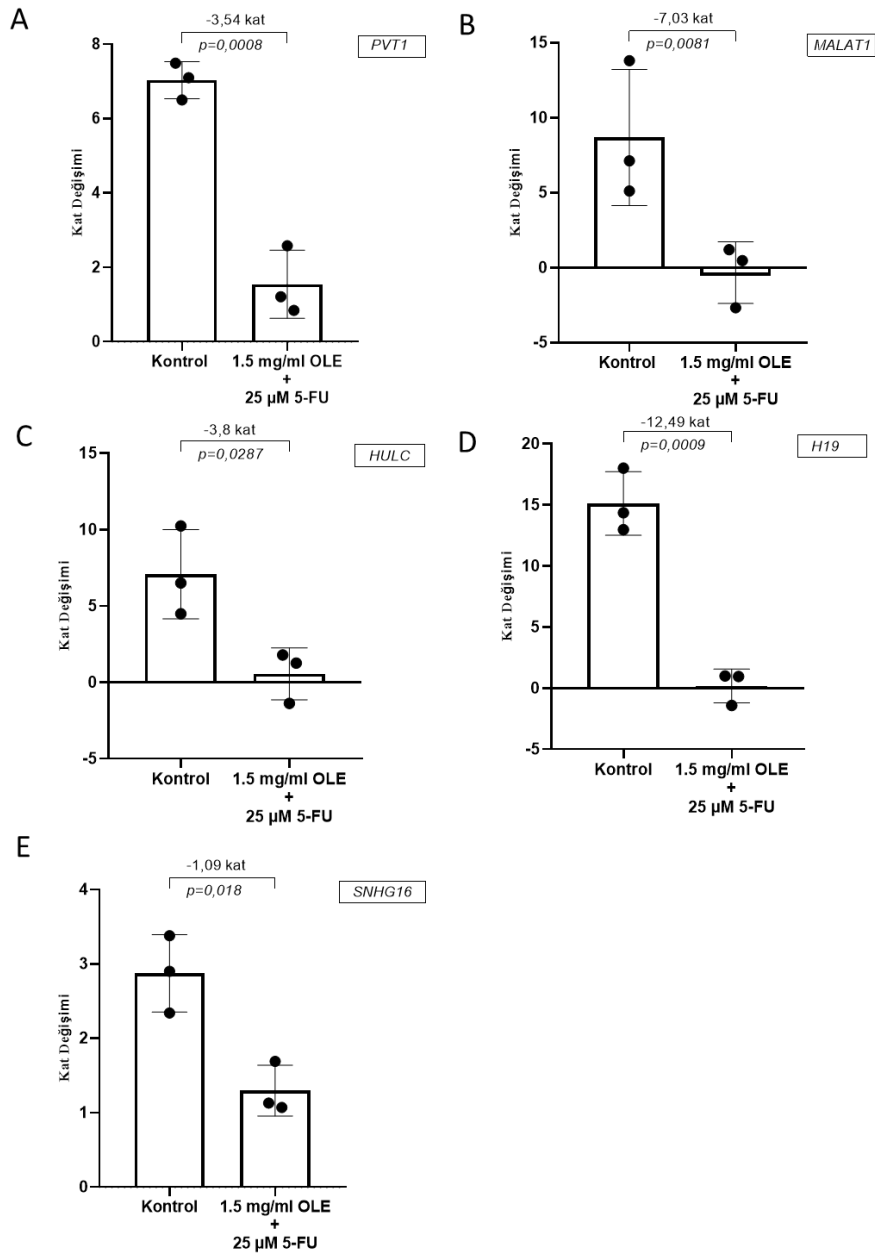
AGS hücrelerinin tek başına 25 μ M 5-FU ile muamelesi sonucunda muamelesiz hücelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde LncRNA PVT1 - 1,27 kat değişimi, MALAT1'i -7,33 kat değişimi, HULC'u -6,1 kat değişimi, H19'u -

11,69 kat değişimi ve SNHG16 -1,49 kat değişimi ile ekspresyon seviyelerini azalttığı tespit edildi (sırasıyla, $p=0,0151$; $p=0,0187$; $p=0,0190$; $p=0,0010$; $p=0,0396$; Şekil 129).



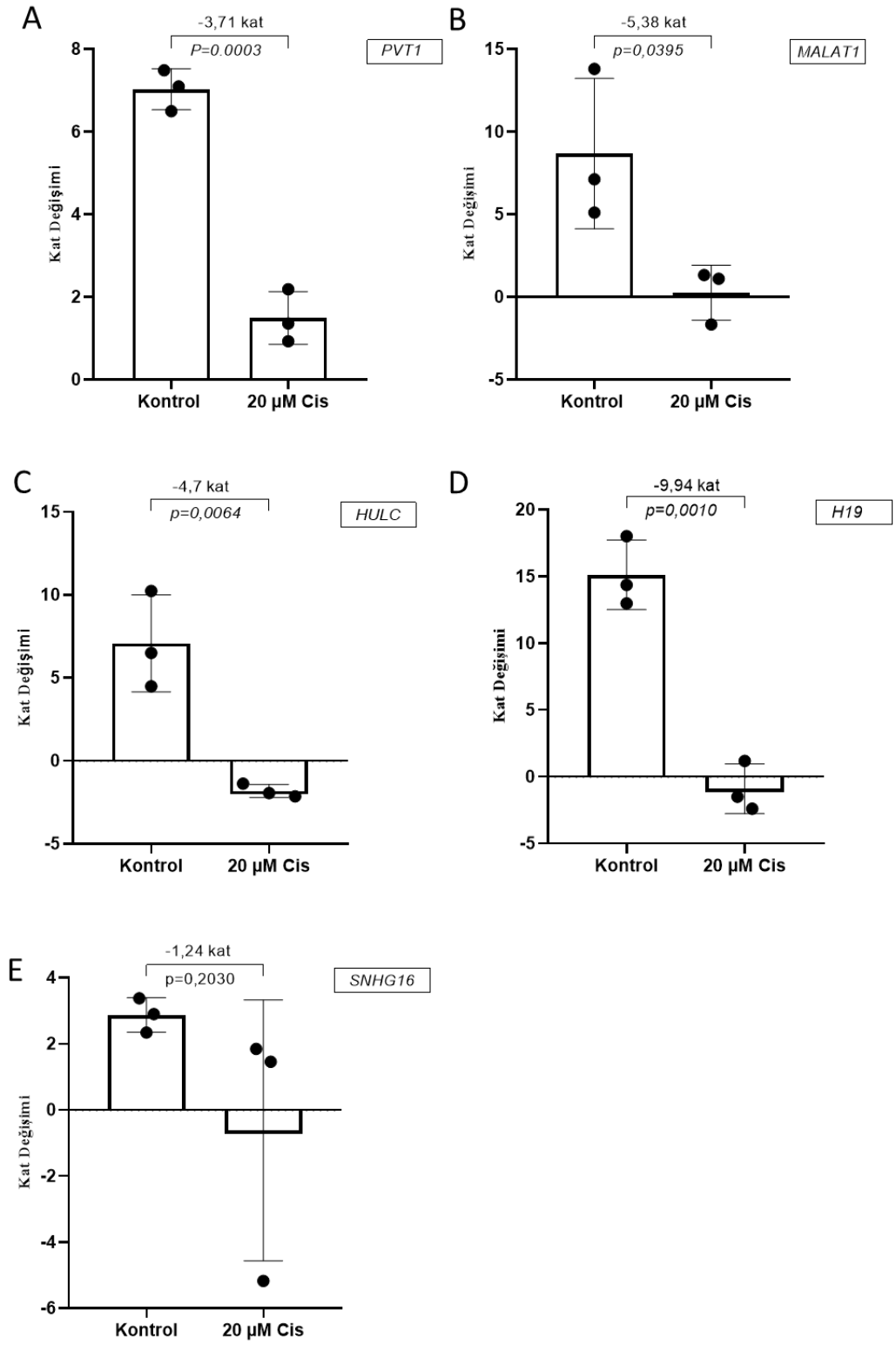
Şekil 129. 25 µM 5-FU muamelesinin AGS hücrelerinde lncRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi. **A:** PVT1, **B:** MALAT1, **C:** HULC, **D:** H19, **E:** SNHG16 (* $p<0,001$, Bağımsız t-test).

AGS hücrelerinin 25 μ M 5-FU'ya 1.5 mg/ml OLE'nin eşlik ettiği tedavi sonucunda muamelesiz hücelere kıyasla LncRNA PVT1 -3,54 kat değişimi, MALAT1 -7,03 kat değişimi, HULC -3,8 kat değişimi, H19 -12,49 kat değişimi ve SNHG16 -1,09 kat değişimi gösterdiği tespit edildi (sırasıyla, $p=0,0008$; $p=0,0081$; $p=0,0287$; $p<0,0009$; $p<0,018$; Şekil 130). Bu bulgular doğrultusunda OLE+5-FU kombin tedavisinde muamelesiz hücelere kıyasla LncRNA ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde seviyelerini azalttığı görüldü.

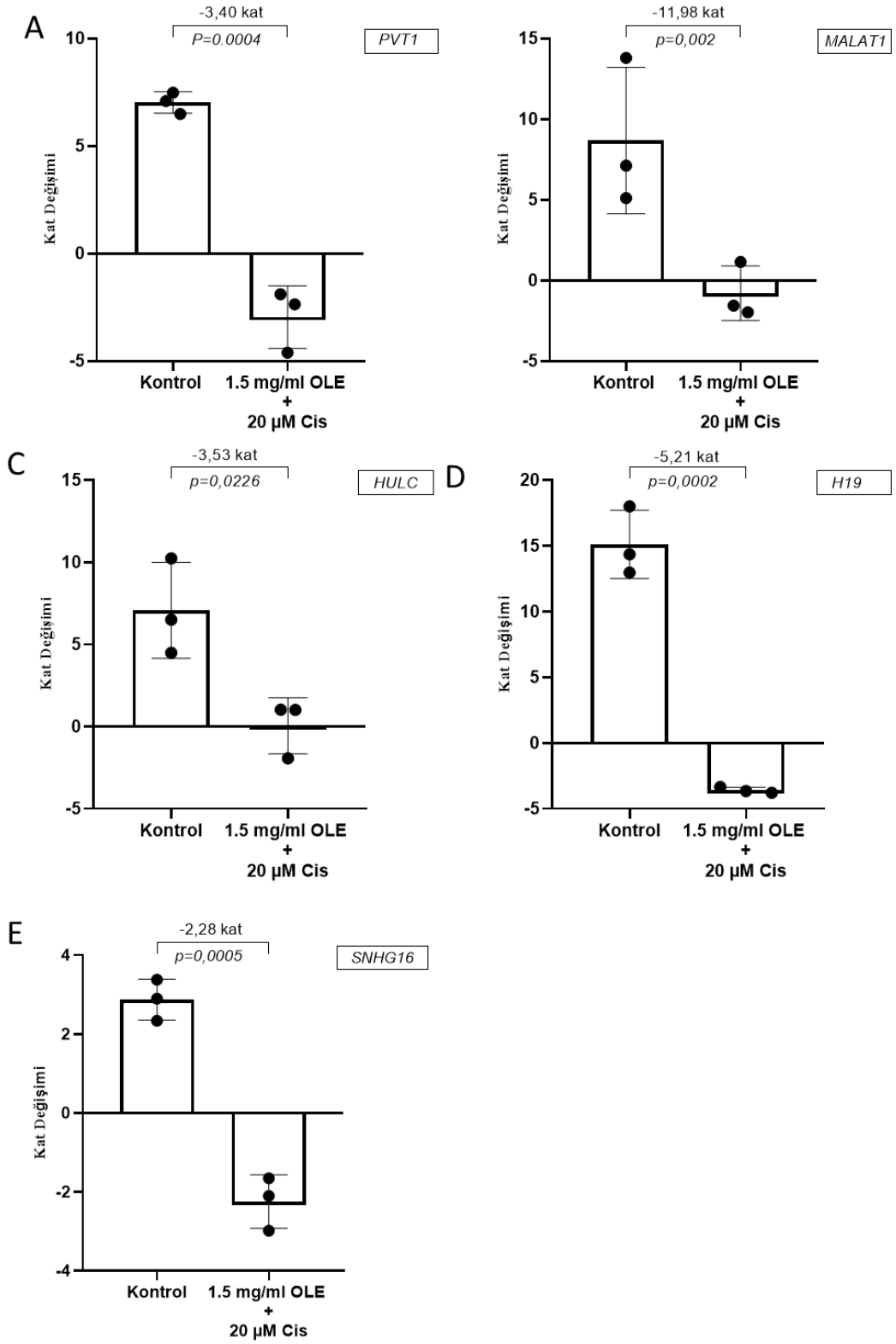


Şekil 130. 1.5 mg/ml OLE+ 25 μ M 5-FU kombinasyonunun AGS hücrelerinin LncRNA ekspresyon seviyeri üzerindeki etkisi. A: PVT1, B: MALAT1, C:HULC, D: H19, E: SNHG16 (* $p<0,001$, Bağımsız t-test).

Tek başına 20 µM Cis ile tedavisinin muamelesiz hücelere kıyasla LncRNA PVT1, MALAT1, HULC ve H19 ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı görüldü (sırasıyla; p=0,0003; p=0,0395; p=0,0064; p=0,0010). Ancak LncRNA SNHG16'nın ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde azalttığı tespit edildi (-1,24 kat değişimi; p=0,2030; Şekil 131). 1.5 mg/ml OLE'nin 20 µM Cis kombinasyon durumunda LncRNA ekspresyon seviyeleri, PVT1 -3,40 kat değişimi, MALAT1 -11,96 kat değişimi, HULC -3,53 kat değişimi, H19 -9,94 kat değişimi ve SNHG16 -2,28 kat değişimi gösterdi. Cis tedavisine OLE'nin eşlik etmesi durumunda AGS hücrelerinde LncRNA ekspresyon seviyeleri üzerinde anlamlı bir şekilde azaltıcı etkisi olduğu saptandı (sırasıyla, p=0,0004; p=0,002; p=0,0226; p=0,0002; p=0,0005; Şekil 132). Elde edilen bulgular doğrultusunda OLE'nin Cis ile kombinasyon tedavisinde tek başına Cis tedavisine göre kıyaslandığında Cis tedavisini destekleyerek LncRNA SNHG16'nın ekspresyon seviyesini azalttığı belirlendi.

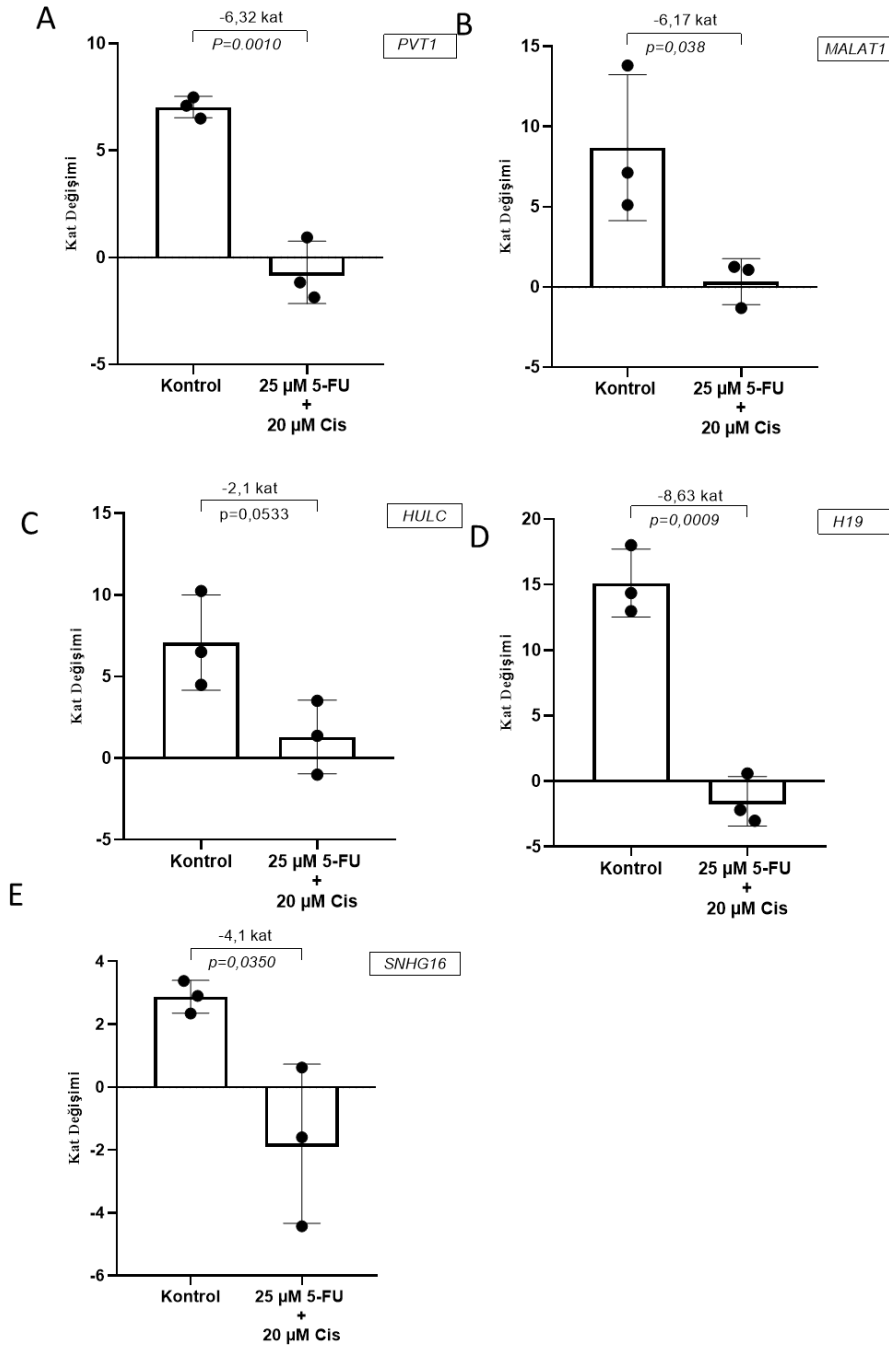


Şekil 131. 20 μM Cis'in AGS hücrelerinin lncRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi. **A:** PVT1, **B:** MALAT1, **C:**HULC, **D:** H19, **E:** SNHG16. (* $p<0,001$, Bağımsız t-test).



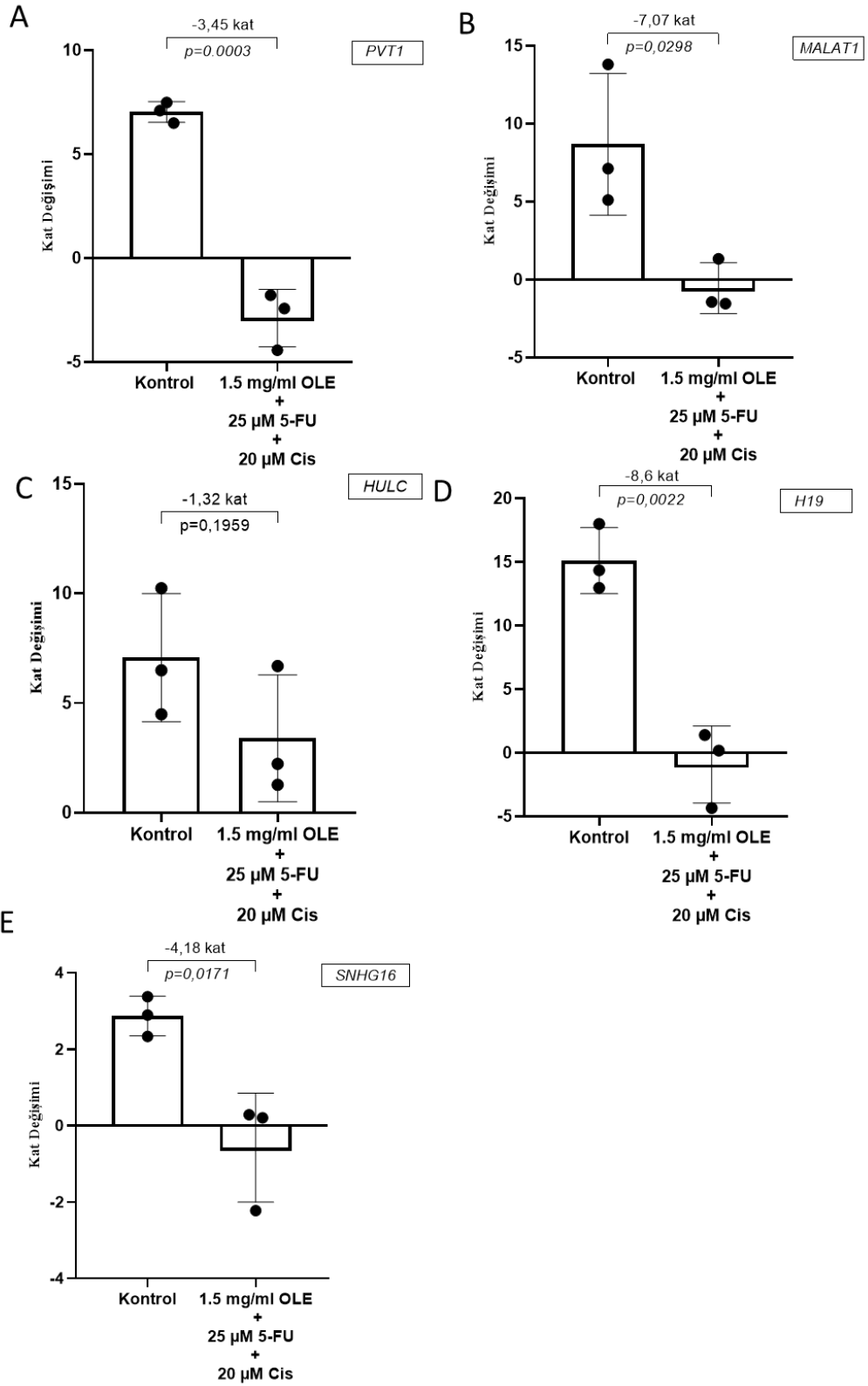
Şekil 132. 1.5 mg/ml OLE+ 20 µM Cis kombinasyonu ile tedavisi sonucunda AGS hücrelerinin lncRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi. **A:** PVT1, **B:** MALAT1, **C:** HULC, **D:** H19, **E:** SNHG16 (* $p<0.001$, Bağımsız t-test).

AGS hücrelerinin 5-FU+Cis ikili kombinasyon tedavisinde muamelesiz hücelere kıyasla LncRNA PVT1, MALAT1, H19 ve SNHG16'yı istatikselsel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edildi (sırasıyla, $p=0,0010$; $p=0,038$; $p=0,0009$; $p=0,0350$; Şekil 133). İkili kombin tedavi LncRNA HULC'un ekspresyon seviyesini anlamlı olmayan bir şekilde azalttığı görüldü ($p=0,0533$).

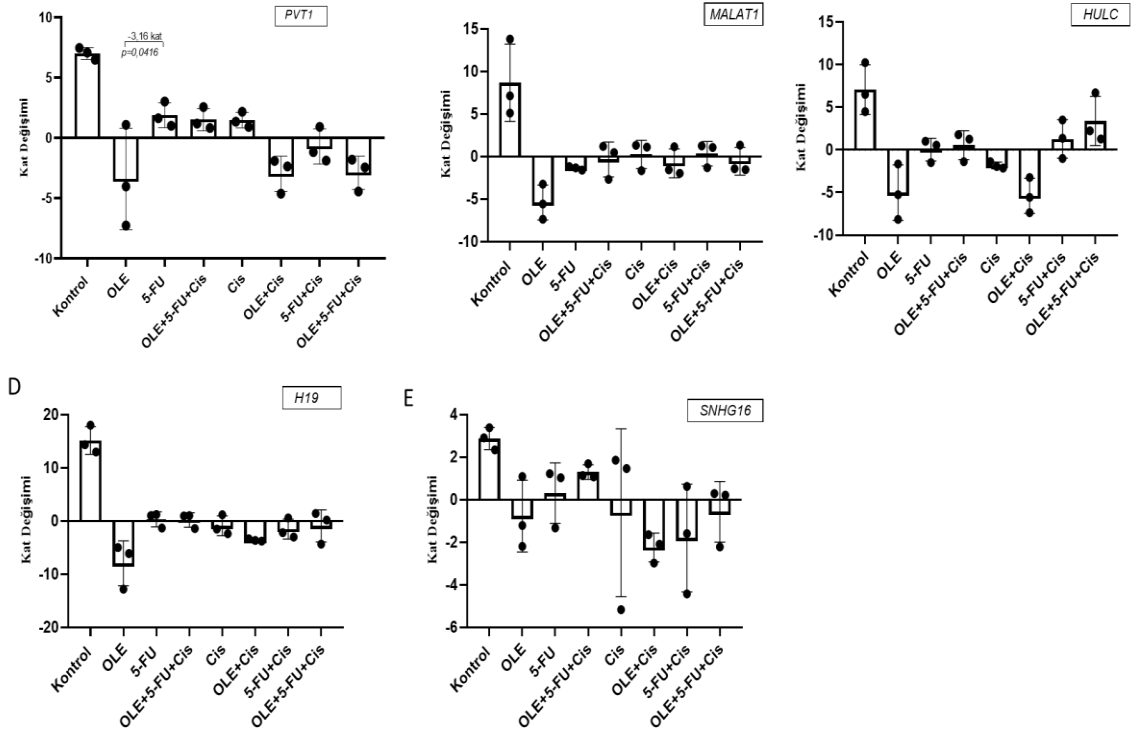


Şekil 133. 5-FU+Cis kombinasyonunun AGS hücrelerinin LncRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi. **A:** PVT1, **B:** MALAT1, **C:**HULC, **D:** H19, **E:** SNHG16 (* $p<0,001$, Bağımsız t-test).

OLE+5-FU+Cis üçlü kombinasyonu durumunda muamelesiz hücrelere kıyasla LncRNA PVT1, MALAT1, H19 ve SNHG16 sırasıyla -3,45, -7,07, -1,32, -8,6, -4,18 kat değişimi gösterdi. AGS hücrelerinde OLE'nin 5-FU+Cis ile üçlü kombinasyon tedavisinde LncRNA PVT1, MALAT1, H19 ve SNHG16 ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi (sırasıyla; p=0,0003; p=0,0298; p=0,0022; p=0,0171; Şekil 134). OLE'nin 5-FU+Cis ile üçlü kombinasyon durumunun muamelesiz hücrelere kıyasla LncRNA HULC'un ekspresyon seviyesini anlamlı bir şekilde azaltmadığı görüldü (-1,32 kat değişimi; p=0,1959). Elde edilen tüm veriler doğrultusunda OLE'nin 5-FU ve Cis ile benzer şekilde LncRNA ekspresyon seviyelerini azaltıcı yönünde etkisi olduğu analiz edildi. OLE'nin 5-FU, Cis ve 5-FU+Cis ile kombin halinde tedavisinin tek başına 5-FU, Cis ve 5-FU+Cis muameleleri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı (Şekil 135). Ancak OLE'nin kemoterapi ajanları ile kombin tedavilerinde LncRNA'ların ekspresyon seviyelerini 5-FU ve Cis ile benzer şekilde azalttığı görüldü.



Şekil 134. OLE+5-FU+Cis üçlü kombinasyon durumunun AGS hücrelerinin LncRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisi. A: PVT1, B: MALAT1, C:HULC, D: H19, E: SNHG16. (* $p<0.001$, Bağımsız t-test).



Şekil 135. OLE ve Kemoterapi ajanlarının AGS hücrelerinin lncRNA ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin toplu halde gösterimi. **A:** PVT1, **B:** MALAT1, **C:** HULC, **D:** H19, **E:** SNHG16 (* $p < 0.001$, Bağımsız t-test).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

GK epidemiyolojik ve histopatolojik farklılıklarla karakterize olan kötü prognozla ilişkilendirilmiş gastrointestinal sistem tümörlerden biridir (Röcken, 2017). İlerleyen tıbbi teknolojilere ve gelişen cerrahi tekniklere rağmen, erken tanı koyulabilmesindeki eksiklik ve yetersiz tedavi nedeniyle GK hala yüksek morbidite ve mortalite oranlarına sahiptir (Correa, 2013; Karimi ve ark., 2014). Erken evre GK'larda spesifik semptomlar göstermemesi sebebiyle tespit oranlarının düşük olması hastalığın seyrini ve tedavi etkinliğini oldukça düşürmektedir. Ayrıca oldukça agresif seyreden ileri evre GK'larda günümüzdeki mevcut tedavi yöntemlerinde kullanılan kemoterapi uygulaması hastalığın seyrini iyi yönde etkilemede kanser hücrelerinin kemoterapi ilaçlarına karşı direnç geliştirmesi ve sitotoksik yan etkilerinin oluşturması tedaviyi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu yüzden mevcut tedavi yöntemlerine ek olarak tedavi etkinliği daha yüksek sitotoksik yan etkileri daha az yeni terapötik hedef olabilecek yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Çeşitli kanser türlerinde bazı tıbbi bitkilerin yeni tedavi yöntemleri geliştirmesine katkı sağladığı, mevcut tedavi yöntemlerini daha etkin hale getirmesinde ve olası sitotoksik yan etkilerini azalttığı yönündeki çalışmaların önemi son zamanlarda giderek artmıştır (Cragg & Newman, 2006). Ayrıca bazı bitki ekstraktlarının kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanılmasının sinerjik veya additive etki oluşturarak kemoterapötik ajanın etkinliğini arttırdığı tespit edilmiştir. Böylece tedavide mevcut ajanın dozunun azaltılabileceğini ve kemoterapötik ajanın neden olabileceği sitotoksik yan etkilerin azaltılabileceğini gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (Li ve ark., 2010).

Olea europaea, Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde birçok hastalığın tedavisinde antioksidan özelliği ile yaygın bir şekilde kullanılan zeytin ağacıdır. OLE *Olea europaea* zeytin yapraklarından elde edilen ekstraktlardır ve sekoiridoidler, triptenler ve flavonoidler gibi bileşenlerden oluşur (Hamdi & Castellon, 2005; Ryan & Robards, 1998). Yapılan çalışmalar, OLE'nin bu biyoaktif bileşenlerinin lösemi, kolorektal, melanom ve meme kanseri dahil olmak üzere birçok kanser türünün tümör ilerlemesini azaltıcı yönde bir etkisi olduğunu göstermiştir (Bartolı ve ark., 2000). Anabilim Dalımızda yapılan daha önceki çalışmalar ile OLE'nin, beyin tümörleri arasında en agresif olan ve WHO Grade 4 olarak adlandırılan glioblastoma ve glioblastoma kök

hücrelerinde; hücre proliferasyonunu azalttığı, hücreleri hem apoptotik hem de nekrotik yolla öldürdüğü, MGMT metilasyon oranını arttırdığı, beyin tümörlerinde kemoterapi ilacı olarak kullanılan temozolomid'in etkinliğini arttırdığı, anjiogenezi azalttığı, bevacizumab'ın etkinliğini arttırdığı ve miRNA ve LncRNA ekspresyon seviyelerini değiştirerek epigenetik süreçlerde etkili olduğu belirlenmiştir (Mutlu ve ark., 2020; Tezcan ve ark., 2014; Tezcan ve ark., 2017a; Tezcan ve ark., 2017b; Tunca ve ark., 2012). Kountouri ve ark., zeytin meyve özütünün GK hücre hatlarındaki etkisini araştırmış özütün hücre proliferasyonu ve hücre ölümü üzerine etkili olduğunu saptamışlardır (Kountouri, Mylona, Kaliora & Andrikopoulos, 2007). Saleh ve ark. sıçanlarda mutlak etanolün neden olduğu gastrik mukozal hasar üzerinde OLE'nin koruyucu etkisi olduğunu belirlemişlerdir (Al-Quraishy, Othman, Dkhil & Abdel Moneim, 2017). 2017 yılında Geyikoglu ve ark., tarafından yapılan çalışmada OLE'nin içeriğinde yer alan fenolik bileşeni olan Oleuropein'in sıçan midesinde ve akciğerinde Cis kaynaklı oluşan oksidatif stres, genotoksisite ve patolojik değişiklikler üzerine koruyucu etkisini incelemişlerdir ve Oleuropeinin kemoterapiye karşı koruyucu olarak kullanılabilirliğini göstermişlerdir (Geyikoglu ve ark., 2017). Ancak OLE'nin daha önceki çalışmalarımızı gerçekleştirdiğimiz glial kökenli glioblastoma hücrelerinden farklı olarak epitelyal kökenli tümörlerden olan GK'daki etkilerinin moleküler düzeyde araştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle mevcut tez çalışmasında OLE'nin GK daki terapötik etkisini ortaya koyan in vitro düzeyde analizler gerçekleştirildi. Bu amaçla, bir GK hücre hattı olan AGS hücreleri OLE ile, GK tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlar olan 5-FU ve Cis ile ve OLE-5-FU-Cis'in kombinasyonları ile muamele edildi. OLE'nin AGS hücrelerinde, hücre canlılığı ve ölümü üzerindeki etkileri WST-1 ve Anneksin V analizi ile değerlendirildi. Yara iyileşme ve EMT mekanizmasında rol oynayan *TWIST*, *SNAIL*, *ZEB1*, *N-Kaderin* ve *E-Kaderin* genlerinin mRNA ekspresyon analizleri, in vitro koloni oluşturma ve CSC biyo-belirteçlerinden olan *CD133*, *NANOG*, *SOX2* ve *OCT4* genlerinin mRNA ekspresyon analizleri gerçekleştirilerek OLE'nin tek başına ve OLE-5-FU-Cis kombinlerinin AGS tümör hücrelerin migrasyon yeteneği ve agresifliği üzerindeki etkisi belirlendi. 3B hücre kültür yöntemi ve CAM analizi kullanılarak OLE'nin tek başına ve OLE-5-FU-Cis kombinlerinin tümör büyüklüğü, anjiogenez üzerindeki etkisi gözlendi. *MRP1*, *MRP5*, *LRP1*

genlerinin mRNA ekspresyon seviyeleri ve PVT1, MALAT1, HULC, H19 ve SNHG16 LncRNA'larının ekspresyon seviyeleri analiz edilerek kemoterapi direnci ve ilişkili olabilecek post-transkripsiyonel/post-translasyonel mekanizmalar değerlendirildi.

5-FU ve Cis'in ileri evre GK hastalarında tedaviye yanıt oranları nispeten yüksek olmakla birlikte hastaların büyük bir kısmında nüks oluşumu ve ilaç direnci geliştirdiği tespit edilmiştir (Tang ve ark., 2017; Wang ve ark., 2020). Bununla birlikte bu kemoterapötik ajanların uzun süreli kullanımlarında kanser hücrelerine karşı oluşturduğu sitotoksitesinin azaldığı ve kemoterapi ilaçlarının tedavi etkinliğini artırmak için alternatif bir tedavi yöntemi olarak bu ilaçların kombin halinde (5-FU+Cis) tedavi uygulamaları gerçekleştirilmiştir (Yamaguchi, Nakagawa, Yabusaki & Nashimoto, 2007). Ancak bu kombin tedavi sonucunda nispeten tolere edilebilir toksisite profili oluşturduğu ve ileri evre GK'larda ikinci veya üçüncü basamak tedavisi olarak kullanılabilmesi önerilmektedir (Yamaguchi ve ark., 2007). Bu yüzden tümör hücrelerinin agresifliğini baskılaması yönünde 5-FU ve Cis'in tedavi etkinliğini artırarak daha iyi bir 5-FU ve Cis yanıtı oluşturmak amacıyla bu kombin tedavilere ek olarak alternatif anti-tümöral etkinlik gösterebilecek bazı bitkisel özütlerin kombinasyon tedavi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bugüne kadar, kurkumin ve berberin gibi birkaç bitki özütlerinin 5-FU ve Cis'nin potansiyel tedavi etkinliğini artırıcı yönünde etkisi olabileceği gösterilmiştir (He ve ark., 2019; Kou, Tong, Wu, Liao & Zhao, 2020; Pandey ve ark., 2015). Bu nedenle mevcut tez çalışmasında, diğer çalışmalarımızdan elde edilen bulgular doğrultusunda OLE'nin temozolomidin etkinliğini artırdığı ve tümörün agresifliğini baskılanması yönündeki gösterdiği etkileri dikkate alınarak, OLE'nin 5-FU, Cis ve 5-FU+Cis ile birlikte eşzamanlı kombin tedavisinin GK hücrelerindeki tümörün agresifliğinin baskılanması yönündeki öngörülen olası etkilerini araştırıldı.

Mevcut tez çalışmasında belirlenen doz aralıkları ile gerçekleştirilen WST-1 analizi sonuçlarına göre OLE'nin AGS hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi incelendiğinde 1 mg/ml OLE dozu ile muamele edilen hücre grubundaki canlılık oranı % 67,3 oranında, 1.5 mg/ml OLE dozunda ise % 41,03 canlılık oranı tespit edildi. OLE'nin 48 saat muamelesi sonucunda canlılık oranının 1 mg/ml OLE dozunun % 52,4 olarak, 1.5 mg/ml OLE dozunun ise % 21,58 olduğu belirlendi. AGS hücrelerinde

hesaplanan SI indeksine göre lethal dozunun 1.5 mg/ml konsantrasyonundaki OLE dozu ve etkin süresinin ise 24 saat olduğu belirlendi. OLE'nin AGS hücrelerinin canlılığını doz ve zamana bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalttığı tespit edildi ($p < 0,0001$). Kontrol grubu olarak kullanılan HUVEC hücrelerinde aynı doz aralıkları ile gerçekleştirilen WST-1 analizi sonucuna göre, AGS hücrelerinde etkili saat olan 24 saat ve etkili doz olan 1.5 mg/ml 'de HUVEC hücrelerinin canlılık oranının % 71, 92 olduğu gösterildi. Etkili doz olan 1.5 mg/ml OLE'nin iki katı olan 3 mg/ml OLE dozu muamelesi sonucunda HUVEC hücrelerindeki canlılık oranının % 83,37 olduğu tespit edildi. Bulgularımız doğrultusunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde OLE'nin HUVEC hücreleri canlılığını azaltıcı yönünde bir etkisi olmadığı saptandı. Bu bulgumuz, OLE'nin GK tedavisinde kullanımının sağlıklı hücreler açısından sitotoksik etkisinin görece daha az olacağını ve dolayısıyla güvenli bir terapötik adayı olabileceğine işaret etmektedir.

Yang ve ark., tarafından yapılan analiz sonucuna göre AGS hücrelerin tek başına 5-FU'nun 48 saatte hücre canlılığını inhibe ettiği tespit edildi (Yang ve ark., 2017). Benzer şekilde mevcut tez çalışmasında WST-1 analizi bulgularına göre 25 μ M 5-FU'nun 48 saatte AGS hücreleride % % 37,45 canlılık oranı ile hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı derecede inhibe ettiği bulundu ($p < 0,0001$). Aynı etkili doz ve etkili sürede 5-FU'nun HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi incelendiğinde HUVEC hücrelerinin % 68,21 canlılık oranına sahip olduğu tespit edildi. 5-FU ile muamelesi sonucunda 48 saate HUVEC hücrelerinin canlılığını IC50 oranında inhibe etmediği görüldü. Wang ve ark., tarafından yapılan çalışmaya göre Cis AGS hücrelerin canlılığını 48 saatte IC50 olarak belirledikleri 10 μ M-20 μ M Cis konsantrasyonu aralığında inhibe ettiğini gösterdiler (Wang ve ark., 2020). Bulgularımız benzer şekilde 20 μ M Cis konsantrasyonunun 48 saatlik etkisinde AGS hücrelerinin canlılığını (% 45,29 canlılık oranı) istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığını gösterdi ($p < 0,0001$). Böylece AGS hücrelerinde Cis etkin dozunu 20 μ M etkili süresinin ise 48 saat olduğu belirlendi. Cis'in etkili bulunan 48 saat süresi ve 20 μ M konsantrasyonundaki dozunun HUVEC hücreleri üzerindeki etkisi analiz edildiğinde ise HUVEC hücre canlılığının arttığı görüldü (% 109,69). Bu nedenle verilerimiz Cis'in 48 saatlik etkin süresince HUVEC hücrelerinin canlılığını inhibe edici yönünde bir etkisi olmadığını ortaya koydu.

Daha önceki çalışmalarda kemoterapötik ajanların oluşturduğu sitotoksik yan etkileri azaltabilmeleri ve tedavi etkinliğini artırabilmeleri çeşitli kanser türlerinde ortaya konmuş olan kurkumin ve berberin'in Yang ve ark., tarafından 5-FU'nun etkisini artırabildikleri ve 5-FU ile sinerjik etki gösterebildikleri ortaya konmuştur (Pandey ve ark., 2015; Yang ve ark., 2017). Ayrıca; Kurkumin bir sentetik formu olan Curcuminoid WZ350'nin Cis ile kombinasyon tedavisinde GK hücrelerinin canlılığını sinerjik bir etki göstererek doza ve zamana bağlı bir şekilde azalttığı ortaya konmuştur (He ve ark., 2019). He ve ark. yapmış oldukları başka bir çalışmada 5-FU+Cis kombin tedavisinin kurkumin ile kombinasyon durumunda GK hücreleri üzerindeki anti-kanser etkinliğini araştırdılar. Analiz sonucuna göre kurkumin+5-FU+Cis üçlü kombinasyonunun kemoterapötik ajanların oluşturduğu kombin etkiyi destekleyerek hücre canlılığını azalttığını ve diğer fonksiyonel analizler üzerinde bu durumu destekleyici nitelikte etkileri olduğunu ortaya koydular (He, Wei, Liu, Xu & Zhao, 2017). Bu bulgular, bitkisel özütlerin 5-FU ve Cis etkinliği değiştirebilme yeteneğinde olabileceğini göstermiştir. Kurkumin ve Berberin'i yanısıra; mevcut tez çalışması bulguları OLE'nin de GK da 5-FU ve Cis etkinliği artırdığını ilk kez ortaya koymuştur. 1.5 mg/ml OLE'nin 5-FU, Cis ve 5-FU+Cis ile kombinasyonu durumunda AGS hücrelerinin canlılığını azaltıcı yönde etkisi olduğunu görüldü. Tek başına OLE ve 5-FU'nun birbiri ile benzer oranda hücre canlılığını azalttığı, Cis'in ise nispeten OLE ve 5-FU'ya göre daha az etkili olduğu saptandı. OLE ile 5-FU'nun ikili kombinasyonu durumunda tek başına 5-FU'ya göre etkinliğini artırdığı belirlendi. Böylece OLE'nin 5-FU ile additive bir etki göstererek kemoterapötik ajanın anti-tümöral etkinliğini destekleyici yönde bir etkisi olduğu bulundu. OLE ile Cis kombinasyon tedavisinde tek başına Cis'e göre hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalma saptandı ($p < 0,0001$). Sonuçlarımız doğrultusunda OLE Cis ile sinerjik etki gösterdi böylece OLE ile Cis'in kombin halinde uygulanmasının Cis'in potansiyel tedavi etkinliğini artırabileceği öngörüldü. 5-FU+Cis ikili kombinasyon ile tedavisinin OLE+5-FU+Cis üçlü kombinasyon tedavisi ile kıyaslandığında OLE'nin istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde ikili kombinasyonun hücre canlılığını azaltıcı yönündeki etkisini destekledi. Bliss Sinerji skoruna göre iki kemoterapi ajanın kombin tedavisi antagonistlik bir etki oluşturdu ancak OLE ile üçlü kombinasyon halinde tedavi edildiğinde bu etkinin additive bir etki olduğu görüldü. Elde edilen bulgular

yaygın olarak kullanılan 5-FU+Cis kombin tedavisinin etkinliğinin artırılması ve zararlı yan etkilerinin azaltılmasında OLE'nin kullanımının potansiyel faydasının olabileceğini desteklemektedir. Bulgularımız doğrultusunda OLE'nin tek başına kemoterapi ajanları ile birlikte tedavisi sonucunda hücre canlılığını azaltıcı yönünde etkisi olduğu ayrıca kemoterapi ajanlarının etkinliğini additive veya sinerjik olarak desteklediğini ve bunun sonucunda kemoterapi ajanları ile birlikte kombin halinde kullanımının antikanser etkinliğini artırarak mevcut tedaviye ek yeni terapötik hedef olarak kullanılabileceği ön görüldü.

Hücre çoğalması ve hücre ölümü arasında kontrollü bir denge vardır. Apoptoz, yaşlanmış ve hasarlı hücrelerin homeostazı sağlamak amacıyla sıkı bir şekilde kontrol mekanizması tarafından kontrol edilen programlanmış hücre ölüm tipidir (Safarzadeh ve ark., 2014). Apoptotik sinyal alan bir hücrede kromatin ve sitoplazma yoğunlaşmaya başlaması ile birtakım morfolojik değişiklikler gelişmeye başlar. Hücre membran bütünlüğü bozulmaz ve bir süre sonra hücre apoptotik cisimcik olarak adlandırılan daha küçük parçalara bölünür (Safarzadeh ve ark., 2014). OLE'nin apoptoz uyarıcı etkisi, melanom, glioblastoma, hepatokarsinom, lösemi, meme, kolon ve serviks gibi çeşitli kanser türleriyle ilişki çalışmalarda gösterilmiştir. Bu çalışmaların her birinde, OLE'nin farklı bir moleküler mekanizma ile ilgili apoptoz etkisini ortaya çıkardığını göstermişlerdir (Benot-Dominguez ve ark., 2021; Bermúdez-Oria ve ark., 2019; Essafi Rhouma ve ark., 2019; Ruzzolini ve ark., 2018; Zerouh ve ark., 2017; Katsoulis, 2016; Tezcan ve ark., 2014; Samet ve ark., 2014; Mijatovic ve ark., 2011). Benzer şekilde mevcut tez çalışmasında 1.5 mg/ml OLE'nin 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda % 24.7 apoptotik ölüme neden olduğu görüldü. OLE'nin AGS hücrelerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonucunda ise hücrelerin % 17.8'inin apoptotik ve % 14.7'inin nekrotik yolla ölümüne neden olduğu tespit edildi. Farklı tipte tümör hücrelerinde OLE'nin daha uzun maruz kalma sürelerinde nekroza eğilimli olduğu gösterilmiştir (Tezcan ve diğerleri, 2014; Mijatovic ve diğerleri, 2011). Böylece bulgularımız doğrultusunda OLE'nin 48 saat ve ileri inkübasyon süresinde nekrotik ölüm oranında artışa neden olduğunu ortaya koymuştur ve AGS hücrelerini apoptotik yolla öldürebilecek optimum OLE muamelesinin 24 saat olduğu belirlendi. Hastaların yaklaşık %10-30'u, 5-FU bazlı kemoterapiden sonra yaşamı tehdit eden ciddi toksik reaksiyonlar geliştirir (Matusaka ve Lenz, 2015). Bu nedenle, 5-FU ile

kombin oluşturacak aday molekülün, 5-FU ile birlikte anti-tümöral etkinlik gösterirken kemoterapi ajanına maruz kalma dozunun kısaltması beklenir (Takagi ve ark., 2009). Mevcut tez çalışmasında 25 µM 5-FU'nun IC50 dozu 48. saatte, 5-FU'nun tümör hücresi apoptotik etkisi de 48. Saat olarak belirlendi. Bulgularımız doğrultusunda 5-FU'nun 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda %17.2'sinin apoptotik ölümü indüklediği saptandı. OLE'nin 5-FU kombinasyon durumunda OLE ile 48 saatlik inkübasyon süresinde %22.3 oranında apoptotik ölüm, %23.8 nekrotik ölüm belirlendi. OLE'nin 25 µM 5-FU ile kombinasyonunun 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda %18.6 apoptotik, %1.1 nekrotik yolla öldürdüğü görüldü. Böylece elde edilen bulgular doğrultusunda 5-FU tedavisinde OLE eşlik ettiği durumda apoptotik ölümü indüklemesi için gereken süresinin 24 saatlik inkübasyon süresinin yeterli olabileceği ve 5-FU'nun tek başına olan inkübasyon süresini azaltıcı yönde destekleyebileceği öngörüldü. AGS hücrelerinin tek başına 20 µM Cis'in dozu ile 48 saat muamelesinin sonucunda %24 apoptotik ölüm, 1.5 mg/ml OLE'nin 20 µM Cis kombinasyonunun 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda % 14 apoptotik, %1.1 nekrotik yolla öldürdüğü belirlendi. 20 µM Cis'in etkili bulunan 48 saatlik inkübasyon süresinin 1.5 mg/ml OLE ile kombinasyonu sonucunda ise % 19 oranında apoptotik ölüm, %53.3 nekrotik ölüm belirlendi. Bulgular sonucunda OLE'nin Cis ile kombin tedavisinin tek başına Cis tedavisine göre apoptotik ölümü indüklemek için inkübasyon süresini kısaltıcı yönde etkisi olduğu saptandı. 25 µM 5-FU+ 20 µM Cis kombinasyonunun 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda % 14.9 apoptotik, %2 nekrotik yolla öldürdüğü görüldü. AGS hücrelerinde 25 µM 5-FU+ 20 µM Cis ikili kombinasyonunun 48 saatlik inkübasyon süresi sonucunda % 14.9 apoptotik, %2 nekrotik yolla öldürdüğü görüldü. OLE'nin 25 µM 5-FU+ 20 µM Cis ile birlikte üçlü kombinasyon durumunda 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda % 15.8 apoptotik, %1.4 nekrotik yolla öldürdüğü görüldü. Ancak üçlü kombinasyonun 48 saatlik inkübasyon sonucuna göre ise % 11.2 oranında apoptotik ölüm, %22.4 nekrotik ölüm belirlendi. Bu nedenle, mevcut bulgularımız, OLE'nin etkisinden dolayı, OLE varlığında 5-FU ve Cis kombinasyonları ile 48 saatlik inkübasyonun nekroz ile sonuçlanabileceğini ancak bu kombinasyonların faydalı etkilerini daha kısa maruz kalma süresinde ortaya çıktığını göstermektedir.

Akridin Orange (AO)/Propidium İyodür (PI) floresan boyama yöntemi kullanılarak muamele edilmemiş ve yalnızca OLE ile muamele edilmiş AGS hücrelerinin morfolojik değerlendirmeleri gerçekleştirildi. Sağlam yeşil çekirdeğe sahip hücreler canlı, çekirdekte yoğun yeşil kromatin yoğunlaşması alanları olan hücreler erken apoptotik, yoğun kırmızı kromatin yoğunlaşması alanları olan hücreler geç apoptotik ve kırmızı renkli çekirdeği bozulmamış hücreler nekrotik ölüm tipine sahip hücre olduğu literatürden edinilen bilgiler doğrultusunda kabul edildi (Anasamy ve ark., 2013; Ciapetti ve ark., 2002). Morfolojik analiz sonucunda Annexin V bulgularımızı destekler nitelikte 24 saatlik OLE tedavisinin apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olduğunu gösterildi. Elde edilen boyama görüntüleri sonucunda OLE ile muamele edilmiş hücrelerin kontrol hücre grubuna kıyasla sağlam yeşil çekirdeğe sahip hücreleri daha az içerdiği için hücre canlılığının daha az olduğu belirlendi. 1.5 mg/ml OLE ile 24 saat tedavisi sonucunda çekirdekte yoğun yeşil kromatin yoğunlaşması alanları olan hücreleri içerdiğini ve bu hücrelerin erken apoptotik hücreler olduğu, yoğun kırmızı kromatin yoğunlaşması alanları olan hücreleri içerdiğini bunların ise geç apoptotik hücreler olduğu gösterildi. Ayrıca aynı görüntüler doğrultusunda çekirdeği bozulmamış kırmızı renki hücrelerin olduğu ve bunların nekrotik ölüm tipine sahip hücreler olduğu tespit edildi. Mevcut tez bulguları kapsamında morfolojik analizler sonucunda OLE'nin 24 saat tedavisinde Annexin V analizini destekler nitelikte apoptotik ölümü indüklediği tespit edildi.

GK türlerinin büyük çoğunluğu, *CDHI* geninin ürünü olan E-kaderinin proteininin bozulmuş regülasyonu ile ortaya çıkmaktadır (Oliveira ve ark., 2009). E-kaderin, hücre-hücre adezyonunu ve hücre bağlantılarını dahil ederek doku bütünlüğü korunmasını sağlar. E-kaderin kaybının hücre göçünü ve EMT'yi desteklediği gösterilmiştir (Oliveira ve ark., 2009). EMT morfogenez ve gelişim sırasında, epitel hücrelerin gelişmiş göç kapasitesi içeren mezenkimal fenotipe dönüşmesini sağlayan bir mekanizmadır (Kalluri & Weinberg, 2009). E-kaderin kaybı ile gelişen EMT, adezyon kaybına yol açarak migrasyona neden olur ve sonuç olarak tümör dokularında metastaz gelişimini destekler (Kalluri & Weinberg, 2009). Anabilim Dalımızda gerçekleştirilen daha önceki çalışmalarımızda, OLE'nin EMT üzerindeki düzenleyici etkisini, *CDHI*'in mRNA ekspresyonunu yükselterek glioblastoma tümörlerinin agresifliğine karşı, EMT'yi teşvik eden genlerin, *TWIST*, *SNAIL*, *ZEB1* ve *CDH2*'nin

ekspresyonunu baskıladığını göstermiştir (Mutlu ve ark., 2020). Benzer şekilde GK hücre hattı olan AGS hücreleri üzerinde OLE'nin EMT mekanizmasını CDH1 ekspresyonunu artırarak, ZEB1 ve CDH2 ekspresyon seviyelerini azaltarak tersine çevrilmesini desteklediği görüldü. Aynı şekilde yara analizi olan fonksiyonel analizlerimizin sonuçları OLE'nin EMT'yi baskıladığı destekledi. OLE tedavisinden sonra, E-kaderin üretimini artırarak hücrelerin yapışkan özelliklerinin değiştirilmesinde artış anlamına gelen yara oluşturma analizinde AGS hücrelerinin migrasyon özelliklerinde önemli bir azalma gözlemlendi. OLE'nin mezenkimal geçiş mekanizmasını baskıladığı yönündeki etkisi dikkate alınarak, OLE'nin 5-FU, Cis ve 5-FU+Cis ile birlikte eşzamanlı kullanımının EMT mekanizması üzerindeki etkisi değerlendirildi. Elde edilen bulgular doğrultusunda tek başına 5-FU tedavisinde E-Kaderin proteinin üreten *CDH1* geninin mRNA ekspresyonunu artırdığı tespit edildi. OLE'nin 5-FU ve Cis kombinasyonu ile tedavisi sonucunda CDH1 geninin ekspresyon seviyesini artırıcı yönde etkisi olduğu görüldü. Böylece elde edilen veriler doğrultusunda OLE ile 5-FU kombin tedavisinin yalnızca 5-FU ile muamele edilmiş hücrelere kıyasla AGS hücrelerinin göç özelliklerini zayıflattığı tespit edildi. AGS hücrelerinde Cis'in tümör hücre göçü üzerindeki inhibitör etkisi, 5-FU, 5-FU+Cis ve bunların OLE kombin tedavisine kıyasla nispeten daha az olduğu görüldü. Ancak Cis OLE ile kombin halinde tedavi edildiğinde Cis etkinliğini artırarak *CDH1* geninin ekspresyon seviyesini artırdığı ve EMT'nin baskılanması yönünde destekleyici etkisi olduğu tespit edildi. Benzer şekilde yara oluşturma analizi sonucuna göre tek başına Cis muamelesi sonucunda oluşturulan yara alanının daha fazla kapanma göstererek Cis hücre göçünü baskılanması yönündeki etkisinin OLE ve 5-FU etkisinden nispeten daha az olduğu tespit edildi. Yara oluşum analizine göre OLE'nin Cis ile kombin durumunda tek başına Cis tedavisine göre büyük oranda kapanan alanın daha az olduğu ve OLE'nin Cis'in etkinliğini artırarak hücre göçünü baskılanmasını desteklediği görüldü. Tüm veriler doğrultusunda OLE'nin AGS hücrelerindeki göç etme yeteneğini önemli ölçüde baskıladığı, 5-FU'nun göç yeteneğini azalttığı, Cis'in göç etme yeteneğini nispeten yavaşlattığını kemoterapi ajanları ile kombinasyonu sonucunda yara alanlarındaki açıklığı artırdığı tespit edildi. Böylece OLE'nin tek başına ve kemoterapi ajanları ile birlikte kombin tedavi uygulanması sonucunda

EMT'nin baskılanmasını destekleyerek hücre göçünü inhibe edici yönünde bir etkisi olduğu saptandı.

Koloni oluşturma analizi hücrelerin sınırsız bölünme kabiliyetini incelemek amacıyla geliştirilen tek bir hücrenin koloniye dönüşme yeteneğini ve sınırsız çoğalma yeteneğini test edilmesini sağlayan bir analizdir (Franken ve ark., 2006; Munshi ve ark., 2015). CSC'ler kendi kendini yenileme, farklılaşma ve sınırsız bölünme kabiliyetine sahip tümör hücreleri içerisinde yer alan alt popülasyon grubudur. CSC'ler genellikle ilaç direnci ve nüks gelişimi ile ilişkidir ve sürekli bölünme yeteneklerine sahip oldukları için tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi ve kök hücre özelliğinin analiz edilebilmesi amacıyla koloni oluşturma analizi gerçekleştirilir. GK'da ilaç direnci, metastaz ve nüks gelişimi gibi biyolojik süreçlerde kanser kök hücrelerin varlığı önemli rol oynamaktadır. Mevcut tez çalışması kapsamında OLE'nin hücre agresifliğini baskılanması yönünde sınırsız bölünme yeteneğine olan olası etkinliği koloni oluşum analizi ve CSC belirteçleri olan *CD133*, *NANOG*, *SOX2* ve *OCT4* gen ekspresyon seviyeleri incelenerek değerlendirildi. Elde edilen bulgular doğrultusunda muamele edilmemiş AGS hücrelerine kıyasla OLE, 5-FU, Cis, OLE + 5-FU, OLE + Cis, 5-FU + Cis, OLE + 5-FU + Cis kombinasyonları ile tedavi edilen hücrelerde koloni sayısını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edildi ($p < 0,0001$). Böylece OLE'nin tek başına ve kemoterapi ajanları ile kombin tedavi uygulamalarında AGS hücrelerinin koloni oluşum yeteneğini baskılama yönünde etkisi olduğu saptandı. OLE'nin CSC belirteçleri olan *CD133*, *NANOG*, *SOX2* ve *OCT4* genlerinin ekspresyon seviyelerini koloni oluşturma analizini destekler şekilde baskıladığı belirlendi. Elde edilen bulgular doğrultusunda muamelesiz hücrelere kıyasla OLE, 5-FU, Cis OLE+5-FU, OLE+Cis ve OLE+5-FU+Cis kombinasyonlarının muamelesi sonucunda CD133 ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı saptandı ($p < 0,0001$). 5-FU+Cis ikili kombin tedavisinin muamelesiz hücrelere kıyasla CD133 geninin ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı olmayan şekilde azalttığı görüldü. Ancak OLE'nin 5-FU+Cis ikili tedavisine eşlik ettiği durumda CD133 geninin ekspresyon seviyesini azaltıcı yönünde etkisi olduğu görüldü. Tüm bulgular doğrultusunda OLE, 5-FU, Cis, OLE + 5-FU, OLE + Cis, 5-FU + Cis, OLE + 5-FU + Cis kombinasyonları ile tedavi edilen hücrelerin muamelesiz hücrelere kıyasla NANOG, SOX2 ve OCT4 genlerinin ekspresyonunu istatistiksel olarak

anamlı bir şekilde azalttığı tespit edildi ($p < 0,0001$). OLE'nin kemoterapötik ajanlar ile kombin durumunda tek başına 5-FU, Cis ve 5-FU+Cis tedavisine kıyasla CSC genlerinin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmediği ancak OLE'nin bu ajanların etkilerini destekleyerek CSC genlerinin ekspresyon seviyelerini azaltıcı yönünde etkisi olduğu saptandı. Elde edilen bulgulara göre OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanların kombin halinde muamelesinin kemoterapötik ajanların etkinliğini artırarak tümörün agresifliğinin bir göstergesi olan CSC özelliğini ve bununla ilişkili olarak koloni oluşturma yeteneğini baskıladığı saptandı.

Araştırıcılar ilaç geliştirme analizleri gibi birçok moleküler analizlerin gerçekleştirildiği farklı çalışmalarda sıklıkla hücrelerin bir tek tabakada büyüdüğu 2B hücre kültür yöntemlerini kullanmaktadırlar. Ancak bu 2B hücre kültür yöntemleri hücre-hücre etkileşimlerini, hücrenin mikroçevresini ve fizyolojik ortamını tam anlamıyla mimik edemediği için gerçekleştirilen analizler kısıtlı kalmaktadır. Bu yüzden in vitro koşullarda kanser hücrelerinin biyolojik davranışlarını ve hücrelerin doğal mikro çevresini daha doğru bir şekilde mimik ederek in vivo koşulları daha iyi bir şekilde yansıtmak için 3B hücre kültür yöntemleri geliştirilmiştir (Chen ve ark., 2018). 3B hücre kültür yöntemleri fizyolojik olarak hücrenin mikroçevresine uygun daha doğru bilgiler elde edilmesini sağladığı ve in vivo için daha öngörülebilir veriler elde edilmesini sağladığı için son zamanlarda yapılan analizlerde oldukça sık kullanılmaktadır (Chen ve ark., 2018; Wang, 2016). Diğer kanser türlerinde olduğu gibi GK analizlerinde de 3B kültür yöntemlerinin kullanılması daha geniş bir bakış açısı kazanılmasını sağlamıştır. GK hücre hatları kullanılarak geliştirilen 3B hücre kültür modellerinde tümör agresifliğinin baskılanmasına yönelik olarak EMT, CSC ve epigenetik mekanizmlarla ilişkili genlerin ekspresyon seviyelerinde birtakım farklılıkların olduğu tespit edilmiştir (Magalhães ve ark., 2018). Anabilim Dalımızda gerçekleştirilen daha önceki çalışmalar ile farklı tipte kanser olan glioblastoma hücrelerinde 3B kültür yöntemi kullanılarak OLE'nin tümör boyutunu küçültücü yönde etkisi olduğu tespit edildi (Mutlu ve ark., 2021). Bu doğrultuda OLE'nin tümör boyunu küçültücü yönündeki etkisi göz önüne alınarak mevcut tez kapsamında AGS hücrelerinde tek başına ve kombin tedaviler halinde uygulanmasının tümör boyutuna etkisi 3B hücre kültür yöntemi ile analiz edildi. GK hücre hattı olan AGS hücrelerinde OLE'nin tümör boyutuna olan etkisi glioblastoma hücrelerine olan etkisine benzer

şekilde tümör boyutunu küçültücü yönde olduğu belirlendi. Tek başına OLE ve 5-FU muamelesinin sonucunda benzer şekilde muamelesiz hücrelere kıyasla tümörün boyutunu azaltıcı yönde etkisi olduğu belirlendi. OLE'nin 5-FU ile kombinasyonu sonucunda tek başına 5-FU'ya kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ancak bu etkiyi destekleyici yönünde tümör boyutunu azalttığı gösterildi. AGS hücrelerinde Cis muamelesinin muamele edilmemiş AGS hücrelerine göre tümör hacmin küçültme yönünde bir etkisi olmadığı görüldü. OLE'nin Cis eşlik ettiği kombin tedavi sonucunda OLE'nin Cis'in etkinliğini artırarak tümör boyutunu küçülttüğü saptandı. Böylece OLE'nin Cis ile birlikte kullanımının tümör boyutunu küçültücü yönde terapötik hedefli tedavi molekülü olarak kullanılabilceği öngörülmektedir. 5-FU+Cis ikili kombinasyonu ve OLE+5-FU+Cis üçlü kombinasyonu ile muamele edilen hücrelerin tümör boyutunu küçülttüğü görüldü. Bulgularımız doğrultusunda OLE'nin tek başına ve kemoterapi ajanları ile kombin tedavisinde 5-FU'nun etkisini destekleyerek ve Cis'in etkinliğini artırarak tümör boyutunu küçültücü yönünde etkisi olduğu belirlendi.

Terapötik ilaç olma potansiyeline sahip olduğu düşünülen moleküllerin in vivo deneylerde analiz edilebilmesi için, tümör fare modelleri kullanılmaktadır. Ancak hayvan modelleri ile gerçekleştirilen deneyler oldukça yüksek maliyetli ve uzun süreli araştırmalardır. CAM analizi in vivo hayvan modellerine alternatif olarak kullanılabilcek ex vivo bir tekniktir (Ribatti, 2017). Bu teknik ile son dönemlerde çeşitli kanser türlerinde potansiyel ilaç adayı olabilecek molekülün anjiogenez üzerinde etkinliğinin analiz edilmesi giderek yaygınlaşmıştır (Ribatti, 2017). Anabilim dalımızda ekibimiz tarafından gerçekleştirilen eski çalışmalarda OLE'nin anjiogenizi baskıladığı yönündeki etkisi gösterilmiştir (Tezcan ve ark., 2017). Mevcut tez çalışmasında OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte kombin tedavisi uygulamalarında AGS hücrelerinin damar gelişimi üzerine etkileri CAM analizi yöntemi kullanılarak araştırıldı. OLE, 5-FU, Cis, OLE + 5-FU, OLE + Cis, 5-FU + Cis, OLE + 5-FU + Cis kombinasyonları ile tedavi edilen embriyolu yumurtaların muamelesiz embriyolu yumurtalara kıyasla damar oluşumunu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi ($p < 0,001$). OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte kullanıldığında AGS hücrelerinde damar oluşumunu baskılayarak tümörün invazyon ve metastaz yeteneğini azaltılabileceği belirlendi. Bulgularımız doğrultusunda

OLE'nin anjiogenzi baskılanması yönünde terapötik hedefli molekül olarak kullanılabilceği öngörüldü.

Günümüzde GK tedavisindeki başarısızlığın en büyük sebebi GK hücrelerinde kullanılan kemoterapi ajanlarına karşı MDR mekanizmasının gelişimidir. GK birinci basamak tedavisinde kullanılan 5-FU ve Cis ilaçlarına karşı geliştirilen MDR mekanizmasının etkilerini tersine çevirebilmek amacıyla alternatif tedavi yöntemleri uygulanmaktadır. Mevcut tez çalışması kapsamında OLE'nin 5-FU ve Cis ilaçlarının geliştirdiği MDR mekanizmasının inhibe edilmesi yönündeki ve kombin tedavilerin bu mekanizma üzerindeki olası etkinliğinin değerlendirilebilmesi amacıyla *MDR1*, *MRP5* ve *LRP1* genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendi. Bulgularımız doğrultusunda 1.5 mg/ml OLE ile muamele edilen AGS hücrelerinin muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde MDR1 geninin mRNA ekspresyon seviyesini azalttığı görüldü. Tek başına 5-FU, Cis+OLE, 5-FU+Cis ve OLE+5-FU+Cis kombinasyonu kombinasyonu ile muamelesinin muamelesiz hücrelere kıyasla MDR1 geninin ekspresyon seviyesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı saptandı. Ancak 5-FU+OLE kombinasyonunun muamelesiz hücrelere kıyasla MDR1 geninin ekspresyon seviyesini azaltıcı yönde etkisi olmadığı belirlendi. AGS hücrelerinde OLE, 5-FU, Cis, Cis+OLE, 5-FU+Cis ve OLE+5-FU+Cis muamelelerinin muamelesiz AGS hücrelerine kıyasla MRP5 geninin ekspresyonunu azaltıcı yönde bir etki oluşturmadığı belirlendi. Ancak OLE+5-FU kombinasyonunun MRP5 geninin ekspresyon seviyesini azaltıcı yönünde etkisi olduğu görüldü. OLE'nin MDR mekanizması ile ilişkilendirilen bir diğer gen olan LRP1 geninin ekspresyon seviyesini azalttığı görüldü. AGS hücrelerinin 5-FU, Cis, Cis+OLE, 5-FU+Cis LRP1 geninin ekspresyon seviyesini azaltıcı yönünde bir etkisi olmadığı ancak OLE+5-FU+Cis üçlü kombinasyonunun anlamlı olmayan bir şekilde azalttığı, OLE+5-FU kombinasyonunun ise anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edildi. Böylece OLE'nin LRP1 geninin ekspresyon seviyesini 5-FU ile birlikte kullanıldığında ilaç direncini kırıcı yönde bir etkisi olabileceği öngörüldü.

Son dönemde, kanser araştırmalarında epigenetik mekanizmaların değerlendirilmesi büyük önem kazanmıştır. Epigenetik düzenlemelerde rol oynayan en önemli RNA tabanlı moleküller, LncRNA molekülleridir. LncRNA'lar, 200 nükleotitten daha uzun olan ve protein kodlama potansiyeline sahip olmayan bir

transkript grubudur (Li,2016). Yapılan çalışmalar ile LncRNA'ların epigenetik düzenlenmeleri ile tümör hücrelerinin transkripsiyon ve translasyon sürecinde ve diğer fizyolojik aktivitelerinde rol oynayarak tümör hücrelerinin çoğalmasını tetiklediğini, ilaç direnci ve nüks gelişimi destekleyerek agresifliğini artırdığını ortaya koymuşlardır (Chen, 2017; Sun, 2016). GK kanser gelişimi ve ilerlemesinde LncRNA'ların anormal ekspresyon seviyelerinin önemli rolü olduğu gösterilmiştir. LncRNA PVT1, MALAT1, HULC, H19 ve SNHG16'nın GK'larda yüksek ekspresyon seviyesine sahip olduğu belirlenmiştir. GK'larda bu LncRNA moleküllerinin hücre çoğalması, hücre ölümü, invazyon, migrasyon, anjiogenez ve ilaç direnci gelişimini gibi hücresel süreçlerde rol oynadığı ilişkilendirilmiştir (Wang, 2016; Zhang, 2015). Gerçekleştirilen tez çalışmasında AGS hücrelerindeki OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte kombinasyonunun epigenetik mekanizmalar üzerindeki etkilerini LncRNA PVT1, MALAT1, HULC, H19 ve SNHG16'nın ekspresyon seviyeleri değerlendirilerek analiz ettik. Muamele edilmemiş AGS hücrelerinde tümör gelişimi ve agresifliği ile ilişkili oldukları belirlenen LncRNA PVT1, MALAT1, HULC, H19 ve SNHG16'nın yüksek ekspresyon seviyelerine sahip olduğu görüldü. OLE, 5-FU, Cis, OLE + 5-FU, OLE + Cis, 5-FU + Cis, OLE + 5-FU + Cis kombinasyonları ile tedavi edilen AGS hücrelerinin muamelesiz hücrelere kıyasla LncRNA PVT1, MALAT1, HULC, H19 ve SNHG16'nın ekspresyon seviyelerini azaltıcı yönünde etkisi olduğu belirlendi. OLE'nin ikili ilaç kombinasyonuna ilave edilmesinin anjiogenez ile ilişkili LncRNA PVT1'in ekspresyon seviyesini anlamlı şekilde düşürdüğü belirlendi. OLE'nin tek başına ve kemoterapötikler ile kombin halinde tedavi uygulamasının kemoterapi ajanlarının etkilerini desteklediği ve agresiflik ile ilişkili LncRNA'ların ekspresyon seviyelerini baskılayarak ilaç direncini ve tümör agresifliğini bu yollar ile baskılayabilme potansiyalinin olduğu anlaşıldı.

Gerçekleştirilen tez çalışması OLE'nin GK hücrelerinde hücre canlılığını inhibe edici yönündeki etkisinin, 24 saat inkübasyon süresinde apoptozu indükleyici etkisinin, EMT, CSC, koloni ve yara oluşturma analizi ile tümörün agresifliği üzerindeki etkisinin, hücre-hücre etkileşimlerini ve hücrenin mikroçevresini in vivo ya yakın bir şekilde mimik eden 3B hücre kültür yöntemini kullanarak tümörün boyutuna olan etkisinin, ex vivo analiz ile damar oluşumunu inhibe edici etkisinin, MDR'ye

etkisinin ve epigenetik mekanizma'lardan LncRNA'lar üzerindeki etkisinin analiz edilerek belirlendiği ilk çalışma olmuştur.

Mevcut Tez Kapsamında;

- OLE AGS hücrelerinin canlılığını doz ve zamana bağlı olarak önemli ölçüde azalttığı ve HUVEC hücreleri canlılığını azaltıcı yönünde bir etkisi olmadığı belirlendi
- GK hücrelerinde OLE kemoterapötik ajanları ile birlikte kombin tedavi uygulanması sonucunda kemoterapötik ajanlarının hücre proliferasyonunu baskılayıcı yöndeki etkinliğini artırdığı ilk kez belirlendi.
- Bliss Sinerji modeline göre; OLE+5-FU kombinasyonu additive bir etki, OLE+Cis kombinasyonu sinerjik bir etki, 5-FU+Cis ikili kombin tedavisi antagonist bir etki, OLE 5-FU+Cis üçlü kombinasyonu tedavi edildiğinde ise additive bir etki gösterdiği saptandı. Böylece OLE kemoterapötik ajanları ile birlikte kullanıldığında bu ajanların etkinliğini destekleyerek anti-tümöral özelliğini artırdığı in siliko analiz ile desteklendi.
- GK hücrelerinde OLE'nin 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda apoptotik ölümü indüklediği ilk kez tespit edilmiştir.
- OLE'nin kemoterapötik ajanlar ile birlikte kullanımında apoptotik ölümün indüklemesi için 24 saatlik bir inkübasyon süresinin yeterli olabileceği ve böylece kemoterapötik ajanlara maruz kalma dozunun azaltıcı yönde etkisi olduğu saptandı.
- Hücre morfolojisinin değerlendirilmesine göre OLE tedavisinin apoptoz yoluyla hücre ölümünü indüklediği belirlendi.
- GK hücreleri üzerinde OLE'nin *CDH1* ekspresyonunu artırarak, *ZEB1* ve *CDH2* genlerinin ekspresyon seviyelerini azaltarak ile EMT mekanizmasını baskıladığı ve yara oluşturma analizi ile migrasyon özelliğini azalttığı tespit edildi.
- OLE'nin 5-FU ve Cis kombinasyonu ile tedavisi sonucunda *CDH1* geninin ekspresyon seviyesini artırarak hücre göçünün inhibe edilmesini desteklediği belirlendi.
- OLE tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte kombin tedavisinde CSC belirteç genlerinin ekspresyon seviyelerini azaltarak ve koloni oluşturma

yeteneğini baskılayarak tümörün agresifliğini inhibe edici etkisi olduğu gösterildi.

- 3B hücre kültür yöntemi ile OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte tümör boyutunu küçülttüğü tespit edildi.
- OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile birlikte kullanıldığında anjiogenezi inhibe ederek tümörün invazyon ve metastaz yeteneğini engelleyebileceği saptandı.
- OLE'nin MDR genlerinin ekspresyon seviyelerini azaltarak ilaç direnci gelişimini kısıtıcı yönde etkisi olabileceği belirlendi.
- OLE'nin tek başına ve kemoterapötik ajanlar ile kombin tedavisinde kemoterapi ajanların etkilerini destekleyerek epigenetik mekanizma olan tümör gelişimi ve agresifliği ile ilişkili olan LncRNA'ların ekspresyon seviyelerini azaltarak tümörün agresifliğinin baskılanması yönünde etkili olabileceği gösterildi.

Bu kapsamda mevcut tez çalışmasının sonuçları OLE'nin GK tedavisinde anti-tümöral etkinliği olduğunu ve kemoterapötik ajanların etkilerini destekleyerek bu ajanların sitotoksik yan etkilerinin azaltılması yönünde kullanılabilecek potansiyel bir tedavi molekülü olabileceğini ortaya çıkarmıştır. GK hücrelerinde OLE'nin EMT, CSC, MDR, epigenetik mekanizma olan LncRNA ve damar oluşumunu inhibe etmesi ve 3B hücre kültür yöntemleri ile tümör boyutunu küçülterek tümörün agresifliğinin baskılanması yönündeki etkinliğinin belirlenmesi bu doğrultuda yapılabilecek ileriki çalışmalara yön verebilecektir. Mevcut bulgular, günümüzde tedavide istenilen başarıya henüz ulaşamayan GK'ların genetik ve epigenetik moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına ve böylece mevcut tedavi protokollerinin iyileştirilmesine yönelik sitotoksik etkisi daha az ve daha efektif olan yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlayabilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Adam, A., Thorsson, V., Shmulevich, I., & Cancer, g. a. (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517):202–209.
- Ahmed, N. (2005). 23 years of the discovery of *Helicobacter pylori*: is the debate over? *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 4:17.
- Alaskhar Alhamwe, B., Khalaila, R., Wolf, J., von Bülow, V., Harb, H., Alhamdan, F., . . . Potaczek, D. (2018). Histone modifications and their role in epigenetics of atopy and allergic diseases. *Allergy Asthma Clin Immunol. Allergy Asthma Clin Immunol.*, 23;14:39. doi:10.1186/s13223-018-0259-4.
- Al-Quraishy, S., Othman, M., Dkhil, M., & Abdel Moneim, A. (2017). Olive (*Olea europaea*) leaf methanolic extract prevents HCl/ethanol-induced gastritis in rats by attenuating inflammation and augmenting antioxidant enzyme activities. *Biomed Pharmacother.* , 91:338-34.
- Alzeeb, G., Metges, J., Corcos, L., & Jossic-Corcos, C. (2020). Three-Dimensional Culture Systems in Gastric Cancer Research. *Cancers (Basel)*. , 29; 12(10):2800. doi:10.3390/cancers12102800
- American Cancer Society. (2020). What Is Stomach Cancer? American Cancer Society: <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/about/what-is-stomach-cancer.html> adresinden erişim sağlandı.
- Anasamy, T., Abdul, A., Sukari, M., Abdelwahab, S., Mohan, S., Kamalidehghan, B., . . . Sulaiman Rahman, H. (2013). A Phenylbutenoid Dimer, cis-3-(3',4'-Dimethoxyphenyl)-4-[(E)-3''',4'''-Dimethoxystyryl] Cyclohex-1-ene, Exhibits Apoptogenic Properties in T-Acute Lymphoblastic Leukemia Cells via Induction of p53-Independent Mitochondrial Signalling Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*, 939810. doi:10.1155/2013/939810.
- Anderson, W., Camargo, M., Fraumeni, J., Jr Correa P., Rosenberg, P., & Rabkin, C. (2010). Age-specific trends in incidence of noncardia gastric cancer in US adults. *JAMA.*, 5;303(17):1723-8. doi:10.1001/jama.2010.496.
- Ang, T., & Fock, K. (2014). Clinical epidemiology of gastric cancer. *Singapore Med J.*, 55(12):621-8. doi:10.11622/smedj.2014174.
- Angelelli, G., Ianora, A., & Scardapane, A. (2001). Role of computerized tomography in the staging of gastrointestinal neoplasms. *Semin Surg Oncol*, 20:109–121.
- Araki, K., Shimura T., S. H., Tsutsumi, S., Wada, W., Yajima, T., . . . Kuwano, H. (2011). E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF- β -induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Cancer.*, 105(12): 1885–1893. doi:10.1038/bjc.2011.452
- Badisa, R., Darling-Reed, S., Joseph, P., & John, S. (2009). Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. *Anticancer Res*, 29(8):2993-6.

- Baghery, A., Khorasani, S., Sigaroodi, A., Pirsalehi, A., Safaroghli-azar, A., Zali, M., & Bashash, D. (2021). The PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in gastric cancer; from oncogenic variations to the possibilities for pharmacologic interventions. *European Journal of Pharmacology*, 893:173983.
- Barber, M., Murrell, A., & Ito, Y. (2008). Mechanisms and sequelae of E-cadherin silencing in hereditary diffuse gastric cancer. *J Pathol*, 216(3):295–306. doi:10.1002/path.2426
- Bartolí, R., Fernández-Bañares, F., Navarro, E., Castellà, E., Mañé, J., Alvarez, M., . . . Gassull, M. (2000). Effect of olive oil on early and late events of colon carcinogenesis in rats: modulation of arachidonic acid metabolism and local prostaglandin E(2) synthesis. *Gut*, 46(2):191-9. . doi:10.1136/gut.46.2.191.
- Berlth, F., Bollschweiler, E., Drebber, U., Hoelscher, A., & Moenig, S. (2014). Pathohistological classification systems in gastric cancer: Diagnostic relevance and prognostic value . *World J Gastroenterol.* , 20(19): 5679–5684.
- Berx, G., & van, R. F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(6):a003129. doi:10.1101/cshperspect.a003129
- Bise, R., Kanade, T., Yin, Z., & Huh, S. (2011). Automatic cell tracking applied to analysis of cell migration in wound healing assay. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2011:6174-9. doi:10.1109/IEMBS.2011.6091525.
- Boysen T, M. M., Hamilton-Dutoit, S., Vainer, B., Hansen, A., Wohlfahrt, J., & Friborg, J. (2009). EBV-associated gastric carcinoma in high- and low-incidence areas for nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer.*, 4;101(3):530-3. doi:10.1038/sj.bjc.6605168.
- Böger, C., Behrens, H., Mathiak, M., Krüger, S., Kalthoff, H., & Röcken, C. (2016;). PD-L1 is an independent prognostic predictor in gastric cancer of Western patients. . *Oncotarget* , 7(17):24269–24283.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., & A., J. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.*, 68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492.
- Burke, E., Karpeh, M., Conlon, K., & Brennan, M. (1997). Laparoscopy in the management of gastric adenocarcinoma . *Ann. Surg.*, 225:262–267. doi:10.1097/0000658-199703000-00004
- Camargo MC, K. K., Yatabe, Y., Kim, S., Rocha-Guevara, E., Lissowska, J., Pawlita, M., & Rabkin, C. (2016). Anti-Helicobacter pylori Antibody Profiles in Epstein-Barr virus (EBV)-Positive and EBV-Negative Gastric Cancer. . *Helicobacter* , 21(2):153–7. doi:10.1111/hel.12249
- Canale, M., Casadei-Gardini, A., Ulivi, P., Arechederra, M., Berasain, C., Lollini, P., . . . Avila, M. (2020). Epigenetic Mechanisms in Gastric Cancer: Potential New Therapeutic Opportunities. . *Int J Mol Sci*, 31;21(15):5500.

- Cancer Genome Atlas Research, N. (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513(7517):202–209. doi:10.1038
- Carneiro, P., Fernandes, M., Figueiredo, J., & Caldeira, J. (2012). E-cadherin dysfunction in gastric cancer—cellular consequences, clinical applications and open questions. . *FEBS Lett*, 586(18):2981–2989.
- Champa Jayasuriya, A., & Darr, A. (2013). Controlled release of cisplatin and cancer cell apoptosis with cisplatin encapsulated poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 6:5;7. doi:10.4236/jbise.2013.65074
- Chan, A., Peng, J., Lam, S., Lai, K., Yuen, M., Cheung, H., . . . Wong, B. (2006). Eradication of *Helicobacter pylori* infection reverses E-cadherin promoter hypermethylation. *Gut* , 55(4), 463–468.
- Chaudhry, S., Liman, N., & Peterson, D. (2020). Anatomy, Abdomen and Pelvis Stomach. StatPearls (Internet). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482334/> adresinden erişim sağlandı.
- Chen, D., Liu, L., W. K., Yu, H., Wang, Y., Liu, J., . . . Zhang, H. (2017). The role of MALAT-1 in the invasion and metastasis of gastric cancer. . *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, , 52(6-7):790-796. . doi:10.1080/00365521.2017.1280531.
- Chen, Q., & Wang, Y. (2020). The application of three-dimensional cell culture in clinical medicine. *Biotechnology Letters*, 42,2071-2082.
- Chen, Y., Chang, W., Lin, S., Minami, M., Jean, C., Hayashi, H., . . . Pain, B. (2018). Three-dimensional culture of chicken primordial germ cells (cPGCs) in defined media containing the functional polymer FP003. *PLoS One. Sep*, 21;13(9):e0200515. doi:10.1371/journal.pone.0200515.
- Chiurillo, M. (2015). Role of the Wnt/ β -catenin pathway in gastric cancer: An in-depth literature review. *World J Exp Med*, 5(2): 84–102.
- Ciapetti, G., Granchi, D., Savarino, L., Cenni, E., Magrini, E., Baldini, N., & Giunti, A. (2002). In vitro testing of the potential for orthopedic bone cements to cause apoptosis of osteoblast-like cells. *Biomaterials*, 23(2):617-27. doi:10.1016/s0142-9612(01)00149-1.
- Cisło, M., Filip, A., Arnold-Offerhaus, G., Ciseł, B., Rawicz-Pruszyński, K., Skierucha, M., & Polkowski, W. (2018). Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Laurén to molecular pathology . *Oncotarget*, 10;9(27):19427-19442. . doi:10.18632/oncotarget.24827
- Cisło, M., Filip, A., Offerhaus, A., Ciseł, B., Rawicz-Pruszyński, K., Skierucha, M., & Polkowski, W. (2018). Distinct molecular subtypes of gastric cancer: from Laurén to molecular pathology. *Oncotarget*, 10;9(27):19427-19442. doi:10.18632/oncotarget.24827

- Clinton, S., Giovannucci, E., & Hursting, S. (2020). The World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research Third Expert Report on Diet, Nutrition, Physical Activity, and Cancer: Impact and Future Directions. *The Journal of Nutrition*, 150(4):663-671. doi:<https://doi.org/10.1093/jn/nxz268>
- Correa, P. (2013). Gastric cancer: overview. *Gastroenterol Clin North Am.*, 42(2):211-7. doi:10.1016/j.gtc.2013.01.002.
- Cowell, C., Yan, I., Eiseler, T., Leightner, A., Döppler, H., & Storz, P. (2009). Loss of cell-cell contacts induces NF-kappaB via RhoA-mediated activation of protein kinase D1. *J Cell Biochem*, 106(4):714–728. doi:10.1002/jcb.22067
- Cragg, G., & Newman, D. (2006). Plants as a Source of Anti-Cancer Agents. *Ethnopharmacology*, 72-79. doi:10.1016/j.jep.2005.05.011.
- Cristescu, R., Lee, J., Nebozhyn, M., Kim, K., Ting, J., Wong, S., & Liu, J. (2015). Molecular analysis of gastric cancer identifies subtypes associated with distinct clinical outcomes. *Nat Med*, 21(5):449–456. doi:10.1038/nm.3850
- Danenberg, P. (1977). Thymidylate synthetase - a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta*, 473:73–92.
- Deng, N., Goh, L., Wang, H., Das, K., Tao, J., & ... Tan, I. (2012). A comprehensive survey of genomic alterations in gastric cancer reveals systematic patterns of molecular exclusivity and co-occurrence among distinct therapeutic targets. *Gut* , 61(5):673–684.
- Diasio, R., & Harris, B. (1989). Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. . *Clin. Pharmacokinet.* , 16, 215–237.
- Dicken, B., Bigam, D., Cass, C., Mackey, J., & Joy, A. (2005). Hamilton S.M. Gastric Adenocarcinoma. *Ann Surg*, Jan; 241(1): 27–39.
- Ebrahimi, V., Soleimanian, A., Ebrahimi, T., Azargun, R., Yazdani, P., Eyvazi, S., & Tarhriz, V. (2020). Epigenetic modifications in gastric cancer: Focus on DNA methylation. *Gene.* , 5;742:144577. . doi: 10.1016/j.gene.2020.144577.
- Edmondson, R., Broglie, J., Adcock, A., & Yang, L. (2014). Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev Technol.*, 12(4):207-18. doi:10.1089/adt.2014.573.
- Eskiizmir, G., & Özgür, E. (2018). Epithelial-Mesenchymal Transition in Tumor Microenvironment Induced by Hypoxia. *Cancer Metastasis*. doi:10.5772/intechopen.78717
- Fang, Q., Chen, X., & Zhi, X. (2016). Long Non-Coding RNA (LncRNA) 2016 Urothelial Carcinoma Associated 1 (UCA1) Increases Multi-Drug Resistance of Gastric Cancer via Downregulating miR-27b. . *Med Sci Monit.* , 1;22:3506-3513.
- Fattahi, S., Amjadi-Moheb, S., Tabaripoure, R., Hossein, G., Haleh, A., & Niaki, A. (2020). PI3K/AKT/mTOR signaling in gastric cancer: Epigenetics and beyond. . *Life Sciences.* , 262: 118513.

- Ferlay, J., Ervik, M., Lam, F., Colombet, M., & Mery, L. (2018). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.: <https://gco.iarc.fr/today/home> adresinden erişim sağlandı.
- Franken, N., Rodermond, H., Stap, J., Haveman, J., & van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc.*, 1(5):2315-9. doi:10.1038/nprot.2006.339.
- Fu, Y., Li, H., & Hao, X. (2017). The self-renewal signaling pathways utilized by gastric cancer stem cells. *Tumor Biology*, (39)4.
- Galluzzi, L., Senovilla, L., & Vitale, J. M. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene volume 31*, 1869–1883.
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., . . . Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene volume 31*, 1869–1883.
- Gately, D. P., & Howell, S. B. (1993). Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *British Journal of Cancer*, 67:6;1171–1176 .
- Geyikoglu, F., Isikgoz, H., Onalan, H., Colak, S., Cerig, S., Bakir, M., . . . Yildirim, S. (2017). Impact of high-dose oleuropein on cisplatin-induced oxidative stress, genotoxicity and pathological changes in rat stomach and lung. *J Asian Nat Prod Res.*, 12:1214-1231. doi:10.1080/10286020.2017.1317751.
- Goseki, N., Takizawa, T., & Koike, M. (1992). Differences in the mode of the extension of gastric cancer classified by histological type: new histological classification of gastric carcinoma. *Gut*, 33:606–612.
- Gottardi, C., Wong, E., & Gumbiner, B. (2001). E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. *J Cell Biol*, 153(5):1049–1060. doi:10.1083/jcb.153.5.1049
- Grem, J. (2000). 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest New Drugs*, 18:299–313.
- Grem, J. (2000). 5-Fluorouracil: forty-plus and still ticking. A review of its preclinical and clinical development. *Invest New Drugs*, 18:299–313.
- Guggenheim, D., & Shah, M. (2013). Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Surg Oncol*, 107(3):230-6. doi:10.1002/jso.23262.
- Hamdi, H., & Castellon, R. (2005). Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2;334(3):769-78.
- Han, J., Won, M., Kim JH., Jung, E., Min, K., Jangili, P., & Kim, J. .. (2020). Cancer stem cell-targeted bio-imaging and chemotherapeutic perspective. *Chem Soc Rev.*, 49(22):7856-7878. doi:10.1039/d0cs00379d.
- Han, Y., Ye, J., Wu, D., Wu, P., Chen, Z., Chen, J., . . . Huang, J. (2014). LEIGC long non-coding RNA acts as a tumor suppressor in gastric carcinoma by inhibiting

- the epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, 11;14:932. . doi:10.1186/1471-2407-14-932
- Hansford, S., Kaurah, P., Li-Chang, H., Woo, M., Senz, J., & Pinheiro, H. (2015). Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. *JAMA Oncol* , 1:23–32.
- Hao, N., He, Y., Li, X., Wang, K., & Wang, R. (2017). The role of miRNA and lncRNA in gastric cancer. . *Oncotarget* . , 12;8(46):81572-81582.
- He, B., Wei, W., Liu, J., Xu, Y., & Zhao, G. (2017). Synergistic anticancer effect of curcumin and chemotherapy regimen FP in human gastric cancer MGC-803 cells. *Oncol Lett.*, 14(3):3387-3394. doi:10.3892/ol.2017.6627.
- He, W., Xia, Y., Cao, P., Hong, L., Zhang, T., Shen, X., . . . Zou, P. (2019). Curcuminoid WZ35 synergize with cisplatin by inducing ROS production and inhibiting TrxR1 activity in gastric cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 21;38(1):207. . doi:10.1186/s13046-019-1215-y.
- Higgins, M., & Baselga, J. (2011). Targeted therapies for breast cancer. *J Clin Invest*, Oct;121(10):3797-803.
- Hsu, M., Safadi, O., & Forshing, L. (2020). Physiology, Stomach. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535425/> adresinden erişim sağlandı.
- Hu, B., El, H., Sittler., S., Lammert, N., Barnes, R., & Meloni-Ehrig, A. (2012). Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol.*, 3:251–261.
- Hu, B., Hajj, N., Sittler, S., Lammert, N., Barnes, R., & Meloni-Ehrig, A. (2012). Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol*, 3(3): 251–261. . doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.021
- Huang, L., Wu, R., & Xu, A. (2015). Epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *Am J Transl Res.*, 7(11): 2141–2158.
- Huang, T., Zhou, Y., Cheng, A., Yu, J., To, K., & Kang, W. (2016). NOTCH receptors in gastric and other gastrointestinal cancers: oncogenes or tumor suppressors? . *Molecular Cancer*, 15:80:2454.
- Huang, W., Ruan, S., Wen, F., Lu, X., Gu, S., Chen, X., . . . Shu, P. (2020). Multidrug Resistance of Gastric Cancer: The Mechanisms and Chinese Medicine Reversal Agents. *Cancer Manag Res.* , 12:12385-12394. doi:10.2147/CMAR.S274599.
- Huelsken, J., & Rens, J. (2002). The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci.*, 115(21);3977-8.
- Ianevski, A., Giri, A., & Aittokallio, T. (2020.). SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies. *Nucleic Acids Research (NAR)* , 48; 488-493.

- Imai, S., Nishikawa, J., & Takada, K. (1998). Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. . *J. Virol.*, 72:4371-4378.
- Jarmuła, A., Dowierciał, A., & Rode, W. A. (2008). molecular modeling study of the interaction of 2'-fluoro-substituted analogues of dUMP/FdUMP with thymidylate synthase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* , 18:2701–2708. doi:10.1016/j.bmcl.2008.03.016
- Jeanes, A., Gottardi, C., & Yap, A. (2008). Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? *Oncogene*, 27(55):6920–6929.
- Kalluri, R., & Weinberg, R. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* , 119(6): 1420–8. .
- Kamiya, S., Rouvelas, I., Lindblad, M., & Nilsson, M. (2018). Current trends in gastric cancer treatment in Europe. *J Cancer Metastasis Treat* , 4:35.
- Karimi, P., Islami, F., Anandasabapathy, S., Freedman, N., & Kamangar, F. (2014). Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. . *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 23(5):700. doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-1057.
- Karpeh, M., & Brennan, M. (1998). Gastric carcinoma. *Ann Surg Oncol*, 5:650–656.
- Katona, B., & Rustgi, A. (2017). Gastric Cancer Genomics: Advances and Future Directions. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* , 3(2):211-217. .
- Kazimierczyk, M., Kasprowicz, M., Kasprzyk, M., & Wrzesinski, J. (2020). Human Long Noncoding RNA Interactome: Detection, Characterization and Function. *Int J Mol Sci*, 4;21(3):1027. doi:10.3390/ijms21031027.
- Kelley, J., & Duggan, J. (2003). Gastric cancer epidemiology and risk factors. Elsevier. . *Journal of Clinical Epidemiology*, 56:1;1-9.
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.*, 4(2): 68–75. . doi:10.4161/org.4.2.5851.
- Kopan, R. (2012). Notch Signaling. . *Cold Spring Harb Perspect Biol.* , 4(10): a011213.
- Kou, Y., Tong, B., Wu, W., Liao, X., & Zhao, M. (2020). Berberine Improves Chemo-Sensitivity to Cisplatin by Enhancing Cell Apoptosis and Repressing PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway in Gastric Cancer. *Front Pharmacol*, 9;11:616251. doi:10.3389/fphar.2020.616251
- Kountouri, A., Mylona, A., Kaliora, A., & Andrikopoulos, N. (2007). Bioavailability of the phenolic compounds of the fruits (drupes) of 2007 *Olea europaea* (olives): impact on plasma antioxidant status in humans. . *Format: AbstractSend to Phytomedicine*, 14(10):659-67.
- Koushyar, S., Powell, A., Vincan, E., & Phesse, T. (2020). Targeting Wnt Signaling for the Treatment of Gastric Cancer. . *Int J Mol Sci.* , 21(11): 3927.

- Kuntz, C., & Herfarth, C. (1999). Imaging diagnosis for staging of gastric cancer. *Semin Surg Oncol*, 17:96–102.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., . . . Dick, J. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367:645–648.
- Laurén, P. (1965). The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand.*, 64:31–49.
- Layke, C. J., & Lopez, P. (2004). Gastric Cancer: Diagnosis and Treatment Options. *Am Fam Physician*, Mar 1;69(5):1133-1141.
- Lei, Y., Tang, L., Hu, J., Wang, S., Liu, Y., Yang, M., . . . B., T. (2020). Inhibition of MGMT-mediated Autophagy Suppression Decreases Cisplatin Chemosensitivity in Gastric Cancer. *Biomed Pharmacother.*, 125:109896. doi:10.1016/j.biopha.2020.109896
- Lei, Z., Tan, I., Das, K., Deng, N., Zouridis, H., Pattison, S., & Chua, C. (2013). Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. *Gastroenterology*, 145(3):554–565
- Li, J., Liu, H., Ramachandran, S., Waypa, G., Yin, J., Li, C., . . . Shao, Z. (2010). Grape seed proanthocyanidins ameliorate Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Chin Med.*, 38(3):569-84.
- Li, J., Liu, H., Ramachandran, S., Waypa, G., Yin, J., Li, C., . . . Shao, Z. (2010). Grape seed proanthocyanidins ameliorate Doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Am J Chin Med.*, 38(3):569-84.
- Li, T., Mo, X., Fu, L., Xiao, B., Guo., & J. (2016). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs on gastric cancer. *Oncotarget*, 23;7(8):8601-12.
- Lin, X., Wang, C., Liu, X., Yan, K., Li, S., B. H., . . . Liu, X. (2014). Lin XJ, Wang CP, Liu XD, et al. Body mass index and risk of gastric cancer: a meta-analysis. *Jpn J Clin Oncol.*, 44:783–91. doi:10.1093/jjco/hyu082.
- Liu, J., Zhu, X., Xu, X., & Dai, D. (2014). DNA promoter and histone H3 methylation downregulate NGX6 in gastric cancer cells. *Med Oncol*, 31-817.
- Liu, X., Liu, J., Qiu, H., Kong, P., Chen, S., & . . . Li W. (2015). Prognostic significance of Epstein-Barr virus infection in gastric cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer*, 15:782.
- Lizasa, H., Nanbo, A., Nishikawa, J., Jinushi, M., & Yoshiyama, H. (2012). Epstein-Barr Virus(EBV)-associated Gastric Carcinoma. *Viruses*, 4, 3420-3439.
- Loh, C., Chai, J., Tang, T., Wong, W., Sethi, G., Shanmugam, M., & CY., . . L. (2019). The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cell*, 20;8(10):1118. . doi:10.3390/cells8101118.

- Longley, D. B., Harkin, D. P., & Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer*, 3(5), 330–338. doi:10.1038/nrc1074
- Magalhães, L. Q., Lopes D.C.F., & Vidal A.F., P. A. (2018). APC gene is modulated by hsa-miR-135b-5p in both diffuse and intestinal gastric cancer subtypes. *BMC Cancer*, 18:1055.
- Mani, S., Guo, W., Liao, M., Eaton, E., Ayyanan, A., Zhou, A., . . . Weinberg, R. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133:704–715.
- Maresch, J., Schoppmann, S., Thallinger, C., Zielinski, C., & Hejna, M. (2012). Her-2/neu gene amplification and over-expression in stomach and esophageal adenocarcinoma: From pathology to treatment. *Crit Rev Oncol Hematol*, Jun;82(3):310-22.
- Marin, J., Perez-Silva, L., Macias, R., Asensio, M. P.-V., Sanchez-Martin, A., Cives-Losada, C., . . . Lozano, E. (2020). Molecular Bases of Mechanisms Accounting for Drug Resistance in Gastric Adenocarcinoma Cancer. *Basel*, 12(8):2116.
- Marqués-Lespier, J., González-Pons, M., & Cruz-Correa, M. (2016). Current Perspectives on Gastric Cancer. *Gastroenterol Clin North Am*, 45:413–28.
- Mathiak, M., Warneke, V., Behrens, H., Haag, J., Böger, C., & Krüger, S. (2017). Clinicopathologic characteristics of microsatellite instable gastric carcinomas revisited: urgent need for standardization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 25:12–24.
- Melo, S., Figueiredo, J., & Fernandes, M. (2017). Predicting the functional impact of CDH1 Missense mutations in hereditary diffuse gastric cancer. *Int J Mol Sci*, 18:12. doi:10.3390/ijms18122687
- Metzger, M., Behrens, H., Böger, C., Haag, J., Krüger, S., & Röcken, C. (2016). MET in gastric cancer - discarding a 10% cutoff rule. *Histopathology*, 68(2):241–253.
- Micaela, M., Viktoria, S. W., Hans-Michael, B., Jochen, H., Christine, B., Sandra, K., & Christoph, R. (2017). Clinicopathologic Characteristics of Microsatellite Instable Gastric Carcinomas Revisited: Urgent Need for Standardization. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 25(1):12-24.
- Mikels, A., & Nusse, R. (2006). Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene*, 25(57):7461-8.
- Ming, S. (1977). A pathobiological classification Gastric carcinoma. *Cancer*, 39:2475–2485.
- Mita, M., Toyota, M., Aoki, F., Akashi, H., Maruyama, R., Sasaki, Y., . . . Tokino, T. (2009). A novel method, digital genome scanning detects KRAS gene amplification in gastric cancers: involvement of overexpressed wild-type

- KRAS in downstream signaling and cancer cell growth. *BMC Cancer.*, 9:198. doi:10.1186/1471-2407-9-198
- Molaei, F., Forghanifard, M., Fahim, Y., & Abbaszadegan, M. (2018). Molecular Signaling in Tumorigenesis of Gastric Cancer. *Iran Biomed J.*, 22(4):217-30. . doi: 10.22034/ibj.22.4.217.
- Motohara, T., & Semelka, R. (2002). MRI in staging of gastric cancer. *Abdom Imaging*, 27:376–383.
- Munshi, A., Hobbs M., & Meyn, R. (2015). Clonogenic Cell Survival Assay. *Chemosensitivity* , 110; 21-28.
- Mutlu, M., Tunca, B., Aksoy, S., Tekin, C., Egeli, U., & Cecener, G. (2020). Inhibitory Effects of *Olea europaea* Leaf Extract on Mesenchymal Transition Mechanism in Glioblastoma Cells. *Nutr Cancer*, 14;1-8. doi:10.1080/01635581.2020.1765260.
- Nature, C. G. (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature*, 513:202–209. doi:10.1038/nature13480.
- Nishikawa, J., Iizasa, H., Yoshiyama, H., Shimokuri, K., Kobayashi, Y., Sasaki, S., . . . Sakaida, I. (2018). Clinical Importance of Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Cancer. *Cancers (Basel)*, 10(6):167. doi:10.3390/c
- Oliveira, C., Pinheiro, H., Figueiredo, J., Seruca, R., & Carneiro, F. (2015). Familial gastric cancer: genetic susceptibility, pathology, and implications for management. *Lancet Oncol* , 16: e60–e70.
- Oliveira, C., Senz, J., Kaurah, P., Pinheiro, H., Sanges, R., Haegert, A., & Corso G, S. J. (2009). Germline CDH1 deletions in hereditary diffuse gastric cancer families. *Human molecular genetics*, 18(9): 1545-1555.
- Pandey, A., Vishnoi, K., Mahata, S., Tripathi, S., Misra, S., Misra, V., . . . Bharti, A. (2015). Berberine and Curcumin Target Survivin and STAT3 in Gastric Cancer Cells and Synergize Actions of Standard Chemotherapeutic 5-Fluorouracil. *Nutr Cancer*, 67(8):1293-304. doi:10.1080/01635581.2015.
- Park, Y., Jin, M., Kim, Y., Yook, JH., Kim, B., & Jang, S. (2008). The global histone modification pattern correlates with cancer recurrence and overall survival in gastric adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* , 15:1968-76. .
- Parkin, D., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.*, 55(2):74-108. doi:10.3322/canjclin.55.2.74.
- Perrais, M., Chen, X., Perez-Moreno, M., & Gumbiner, B. (2007). E-cadherin homophilic ligation inhibits cell growth and epidermal growth factor receptor signaling independently of other cell interactions. *Mol Biol Cell*, 18(6):2013–2025. doi:10.1091/mbc.e06-04-03
- Puneet, K., Kumari, S., Tiwari, S., Khanna, A., & Narayan, G. (2018). Epigenetic Mechanisms and Events in Gastric Cancer-Emerging Novel Biomarkers. *Pathol Oncol Res.*, 24(4):757-770.

- Puneet, Kazmi, H., Kumari, S., Tiwari, S., Khanna, A., & Narayan, G. (2018). Epigenetic Mechanisms and Events in Gastric Cancer-Emerging Novel Biomarkers. *Pathol Oncol Res*, 24(4):757-770.
- Ramsay, P., & Carr, A. (2011). Gastric acid and digestive physiology. *Surg Clin North Am.*, 91(5):977-82. doi:doi: 10.1016/j.suc.2011.06.010.
- Rashidi, M., Seghatoleslam, A., Namavari, M., & Amiri, A. (2017). Selective Cytotoxicity and Apoptosis-Induction of *Cyrtopodion scabrum* Extract Against Digestive Cancer Cell Lines. *International journal of cancer management*. doi:10.5812/IJCM.8633.
- Rawla, P., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of gastric cancer: global trends, risk factors and prevention. *Prz Gastroenterol.*, 14(1):26-38. doi:10.5114/pg.2018.80001.
- Ribatti, D. (2017). The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reprod Toxicol.*, 70:97-101.
- Ribatti, D., Tamma, R., & Annese, T. (2020). Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol*, 13(6):100773. doi:10.1016/j.tranon.2020.100773
- Roche, J. (2018). The Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer. . *Cancers (Basel)*, 10(2): 52.
- Rodriguez, L., Wu, X., & Guan, J. (2005). Wound-healing assay. . *Methods Mol Biol.*, 294:23-9. doi:10.1385/1-59259-860-9:023.
- Röcken, C. (2017). Molecular classification of gastric cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 17(3):293-301.
- Röcken, C., Behrens, H., Böger, C., & Krüger, S. (2016). Clinicopathological characteristics of RHOA mutations in a Central European gastric cancer cohort. *J Clin Pathol.* , 69(1):70–75.
- Ruan, T., Liu, W., Tao, K., & Wu, C. (2020). A Review of Research Progress in Multidrug-Resistance Mechanisms in Gastric Cancer. . *Onco Targets Ther*, 13:1797-1807. doi:10.2147/OTT.S239336. eCollection 2020.
- Rutman, R., Cantarow, A., & Paschkis, K. (1954). Studies on 2-acetylaminofluorene carcinogenesis: III. The utilization of uracil-2-C14 by pre-neoplastic rat liver. *Cancer Res*, 14:119–123. .
- Ryan, D., & Robards, K. (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123:31–44.
- Sakamoto, M., Kondo, A., & Kawasaki, K. (2001). Analysis of gene expression profiles associated with cisplatin resistance in human ovarian cancer cell lines and tissues using cDNA microarray. *Human Cell*, 14:6;305-315.
- Samadani, A., Noroollahi, S., Mansour-Ghanaei, F., Rashidy-Pour, A., Joukar, F., & Bandegi, A. (2019). Fluctuations of epigenetic regulations in human gastric Adenocarcinoma: How does it affect? *Biomed Pharmacother*, 109:144-156.

- Serrano-Gomez, S., Maziveyi, M., & Alahari, S. (2016). Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications. *Mol Cancer*, 24; 15:18. doi:10.1186/s12943-016-0502-x.
- Shaloam, D., & Paul, B. T. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol.*, Oct 5; 0: 364–378.
- Shang-Hung, C., & Jang-Yang, C. (2019). New Insights into Mechanisms of Cisplatin Resistance: From Tumor Cell to Microenvironment. *Int J Mol Sci*, Sep; 20(17): 4136.
- Shenoy, S. (2019). CDH1 (E-Cadherin) Mutation and Gastric Cancer: Genetics. *Molecular Mechanisms and Guidelines for Management*, 11: 10477–10486.
- Sigrid, A., & Front, L. (2018). Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Pharmacol.* doi:org/10.3389/fphar.2018.00006
- Singh, S., & Jha, H. (2017). Status of Epstein-Barr virus coinfection with Helicobacter pylori in gastric cancer. *J Oncol*, 28;3456264. . doi:10.1155/2017/3456264.
- Sitarz R, S. M., Mielko, J., Offerhaus, G., Maciejewski, R., & Polkowski, W. (2018). Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag Res*, 7;10:239-248. . doi:10.2147/CMAR.S149619.
- Sohn, B., Hwang, J., Jang HJ., Lee HS., Oh, S., & Shim, J. (2017.). Clinical significance of four molecular subtypes of gastric cancer identified by The Cancer Genome Atlas Project. . *Clin Cancer Res*.
- Sohn, K., Lee, J., & Lee, S. (2000). Comparing MR Imaging and CT in the staging of gastric carcinoma. *AJR Am J Roentgenol*, 174:1551–1557.
- Song, Z., Wu, Y., Yang, J., Yang, D., & Fang, X. (2017). Progress in the treatment of advanced gastric cancer. . *Tumour Biol*, 39(7). doi:10.1177/1010428317714626
- Soybel, D. (2005). Anatomy and Physiology of the Stomach. *Surg Clin N. Am*, 85 875–894. doi:Doi: 10.1016/j.suc.2005.05.009
- Stomach cancer incidence statistics*. (2020). Cancer Research UK: 26) <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/stomach-cancer/incidence> adresinden erişim sağlandı.
- Sun, K., Jia, K., Lv, H., Wang, S., Wu, Y., Lei, H., & Chen, X. (2020). EBV-Positive Gastric Cancer: Current Knowledge and Future Perspectives. . *Front Oncol.*, 10:583463. .
- Sun, Z., Song, X., Li, X., Su, T., Qi, S., Qiao, R., . . . Cao, F. (2014). In vivo multimodality imaging of miRNA-16 iron nanoparticle reversing drug resistance to chemotherapy in a mouse gastric cancer model. *Nanoscale*, 6;6.

- Suneel, V., Onteru, K., & Singh, D. (2015). Reproduction and nutriment–nurture crosstalk: epigenetic perspectives. . *Journal of Reproductive Health and Medicine.*, 1:2;50-59.
- T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri. (2021). T.C. Sağlık Bakanlığı Kanser İstatistikleri: <https://www.saglik.gov.tr/TR,11587/kanser-istatistikleri-2003-2004-2005.html> adresinden erişim sağlandı.
- Tahara, T., & Arisawa, T. (2015). DNA methylation as a molecular biomarker in gastric cancer. *Epigenomics*, 7(3):475-86.
- Takagi, T., Iio, A., Nakagawa, Y., Naoe, T., Tanigawa, N., & Akao, Y. (2009). Decreased expression of microRNA-143 and -145 in human gastric cancers. *Oncology*. 77(1):12-21. doi:10.1159/000218166.
- Takahashi, T., Saikawa, Y., & Kitagawa, Y. (2013). Gastric Cancer: Current Status of Diagnosis and Treatment. *Cancers (Basel)*, Mar; 5(1): 48–63.
- Tan, I., Ivanova, T., Lim, K., Ong, C., Deng, N. ., Lee, J., & Tan, S. (2011). Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy. *Gastroenterology*, 141(2):476–485. doi:e471-411
- Tang, H., Zeng, L., Wang, J., Zhang, X., Ruan, Q., Wang, J., . . . Yang, D. (2017). Reversal of 5-fluorouracil resistance by EGCG is mediate by inactivation of TFAP2A/VEGF signaling pathway and down-regulation of MDR-1 and P-gp expression in gastric cancer. *Oncotarget*, 8:82842-82853. doi:https://doi.org/10.18632/oncotarget.20666
- Tanida, S., Mizoshita, T., Ozeki, K., Tsukamoto, H., Kamiya, T., Kataoka, H., . . . Joh, T. (2012). Mechanisms of Cisplatin-Induced Apoptosis and of Cisplatin Sensitivity: Potential of BIN1 to Act as a Potent Predictor of Cisplatin Sensitivity in Gastric Cancer Treatment. *Int J Surg Oncol*, 2012:862879. doi:10.1155/2012/862879
- Tao, K., Yin, Y., Shen, Q., Chen, Y., Li, R., Chang, W., . . . Zhang, P. (2016). Akt inhibitor MK-2206 enhances the effect of cisplatin in gastric cancer cells. . *Biomed Rep.*, 4(3): 365–368. doi:10.3892/br.2016.594.
- Teo, J., & Kahn, M. (2010). The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: a tale of two coactivators. *Adv. Drug Deliv.* , 62:1149–1155.
- Tezcan, G., Taskapilioglu, M., Tunca, B., Bekar, A., Demirci, H., Kocaeli, H., . . . Tolunay, S. (2017a). *Olea europaea* leaf extract and bevacizumab synergistically exhibit beneficial efficacy upon human glioblastoma cancer stem cells through reducing angiogenesis and invasion in vitro. *Biomed Pharmacother*, 90:713-723. doi:10.1016/j.biopha.2017.04.022.
- Tezcan, G., Tunca, B., Bekar, A., Budak, F., Sahin, S., Cecener, G., . . . Tumen, G. (2014). *Olea europaea* leaf extract improves the treatment response of GBM stem cells by modulating miRNA expression. *Am J Cancer Res*, 4(5):572-90.

- Tezcan, G., Tunca, B., Demirci, H., Bekar, A., Taskapilioglu, M., Kocaeli, H., . . . Vatan, O. (2017b). Olea europaea Leaf Extract Improves the Efficacy of Temozolomide Therapy by Inducing MGMT Methylation and Reducing P53 Expression in Glioblastoma. *Nutr Cancer*, 69(6):873-880. doi:10.1080/01635581.2017.1339810.
- Theodore, J., Wigle, E. V., Tsvetkova, S. A., Welch, R. B., & Kim. (2019). DPYD and Fluorouracil-Based Chemotherapy: Mini Review and Case Report. *Pharmaceutics*, May; 11(5): 199.
- Tokunaga, M., & Land, C. (1998). Epstein-Barr virus involvement in gastric cancer: biomarker for lymph node metastasis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 7(5):449-450.
- Trédaniel, J., Boffetta, P., Buiatti, E., Saracci, R., & Hirsch, A. (1997). Tobacco smoking and gastric cancer: review and meta-analysis. *Int J Cancer*, 72:565-73.
- Tunca, B., Ak, A. S., Mutlu, M., & Tekin, C. (2019). Mide kanserinde genetik ve epigenetik mekanizmaların rolü. Özkan L, Kurt M, editörler. Mide Kanseri ve Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri*, 7-14.
- Tunca, B., Tezcan, G., Cecener, G., Egeli, U., Ak, S., Malyer, H., . . . Bilir, A. (2012). Olea europaea leaf extract alters microRNA expression in human glioblastoma cells. *J. Cancer Res Clin Oncol.*, 138(11):1831-44. . doi:10.1007/s00432-012-1261-8
- Ushiku, T., Ishikawa, S., & Kakiuchi, M. (2016). RHOA mutation in diffuse-type gastric cancer: a comparative clinicopathology analysis of 87 cases. *Gastric Cancer*, 19(2):403-411. doi:10.1007/s10120-015-0493-0
- Usui, G., Matsusaka, K., Mano, Y., Urabe, M., Funata, S., Fukayama, M., . . . Kaneda, A. (2021). DNA Methylation and Genetic Aberrations in Gastric Cancer. *. Digestion.*, 102(1):25-32. .
- Waldum, H., & Fossmark, R. (2018). Types of Gastric Carcinomas. *Int J Mol Sci.*, 19(12): 4109. . doi:10.3390/ijms19124109
- Wang, J., Sun, J., Wang, J., Song, Y., Gao, P., Shi, J., . . . Wang, Z. (2016). Long noncoding RNAs in gastric cancer: functions and clinical applications. *. Onco Targets Ther*, , 10;9:681-97. doi:10.2147/OTT.S95412.
- Wang, Q., Liu, G., & Hua, C. (2019). Molecular Classification of Gastric Adenocarcinoma . *Gastroenterology Res.*, 12(6): 275-282. . doi:10.14740/gr1187
- Wang, X., Xu, Z., Sun, J., Lv, H., Wang, Y., Ni, Y., . . . Cheng, X. 2. (2020). Cisplatin resistance in gastric cancer cells is involved with GPR30-mediated epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Mol Med*, 24(6): 362. doi:10.1111/jcmm.15055.

- Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X., & Zhou, B. (2013). The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis. *Curr Cancer Drug Targets*, 13(9):963-972. doi:10.2174/15680096113136660102.
- Washington, K. (2010). 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Stomach Annals of Surgical Oncology volume . 3077. doi:3079()
- Wei, W., Cheng, Y., & Wang, B. (2016). Cancer and Genomic Instability. *Genome Stability (From Virus to Human Application)*, 463-486.
- What Is Stomach Cancer?* (2020). American Cancer Society: <https://www.cancer.org/cancer/stomach-cancer/about/what-is-stomach-cancer.html> adresinden erişim sağlandı.
- Willis, S., Truong, S., & Gribnitz, S. (2000). Endoscopic ultrasonography in the preoperative staging of gastric cancer: accuracy and impact on surgical therapy. *Surg Endosc*, 14:951–954.
- Wong, S., Kim, K., Ting, J., Yu, K., Fu, J., Liu, S., & Cristescu, R. (2014). Genomic landscape and genetic heterogeneity in gastric adenocarcinoma revealed by whole-genome sequencing. *Nat Commun*, 5:5477. doi:10.1038/ncomms6477
- World Cancer Research Fund International*. (2018). Stomach cancer statistics: World cancer research fund/american institute for cancer research . : <https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/stomach-cancer-statistics> adresinden erişim sağlandı.
- Xian, H., Zhuo, Z., Sun, Y., L. B., & Zhao, X. (2018). Circulating long non-coding RNAs HULC and ZNF1-AS1 are potential biomarkers in patients with gastric cancer. *Oncol Lett.*, 16(4):4689-4698.
- Xiaofeng, W., Zhiyuan, X., Jiancheng, S., Hang, L., Yiping, W., Yixiu, N., . . . Xiangdong, C. (2020). Cisplatin resistance in gastric cancer cells is involved with GPR30-mediated epithelial-mediated epithelial-mesenchymal transition . *J Cell Mol Med*, Mar;24(6):3625-3633.
- Xu, Z., Tang, J., Xie, H., Du, Y., Huang, L., Yu, P., & Cheng, X. (2015). 5-Fluorouracil Chemotherapy of Gastric Cancer Generates Residual Cells with Properties of Cancer Stem Cells. *Int J Biol Sci*, 11(3): 284–294.
- Yamaguchi, K., Nakagawa, S., Yabusaki, H., & Nashimoto, A. (2007). Combination chemotherapy with 5-fluorouracil, cisplatin and paclitaxel for pretreated patients with advanced gastric cancer. *Anticancer Res*, 27(5B):3535-9.
- Yang, H., Huang, S., Wei, Y., Cao, S., Pi, C., Feng, T., . . . Ren, G. (2017). Curcumin Enhances the Anticancer Effect Of 5-fluorouracil Against Gastric Cancer Through Down-Regulation of COX-2 and NF- κB Signaling Pathways. *J Cancer.*, 17;8(18):3697-3706. doi:10.7150/jca.20196
- Yang, J., Liu, Z., Zeng, B., Hu, G., & Gan, R. (2020). Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: A distinct subtype. *Cancer Lett.* , 28;495:191-199. doi: 10.1016/j.canlet.2020.09.019.

- Yang, J., Zhou, X., Liu, X., Ling, Z., & Ji, F. (2021). Role of the Gastric Microbiome in Gastric Cancer: From Carcinogenesis to Treatment. *Front Microbiol.*, 12:641322. doi:10.3389/fmicb.2021.641322.
- Yang, M., & Wei, W. (2019). SNHG16: A Novel Long-Non Coding RNA in Human Cancers. *Onco Targets Ther*, 12: 11679–11690. doi:10.2147/OTT.S231630
- Yang, W., Gu, J., & Zhen, T. (2014). Recent advances of histone modification in gastric cancer. *J Cancer Res Ther.* , 10;240-5. doi:10.4103/0973-1482.151450.
- Yao, Y., Ni, Y., Zhang, J., Wang, H., & Shao, S. (2017). The role of Notch signaling in gastric carcinoma: molecular pathogenesis and novel therapeutic targets. . *Oncotarget.* , 8(32):53839-53853. .
- Yoon, H., & Kim, N. (2015). Diagnosis and Management of High Risk Group for Gastric Cancer. *Gut Liver*, Jan; 9(1): 5–17.
- Yu, Z., Pestell, T., Lisanti, M., & Pestell, R. (2012). Cancer Stem Cells. . *Int J Biochem Cell Biol.* , 44(12): 2144–2151. doi:10.1016/j.biocel.2012.08.022
- Zali, H., Tavirani, M., & Azodi, M. (2011). Gastric cancer: prevention, risk factors and treatment. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.Autumn*, 4(4): 175–185.
- Zhang, H., Li, Y., Zhang, H., & Jin, X. (2007). DPYD*5 Gene Mutation Contributes to the Reduced DPYD Enzyme Activity and Chemotherapeutic Toxicity of 5-FU: Results From Genotyping Study on 75 Gastric Carcinoma and Colon Carcinoma Patients. *Med Oncol*, 24(2):251-8. doi:10.1007/BF02698048
- Zhang, H., Li, Y., Zhang, H., & Jin, X. (2007). DPYD*5 gene mutation contributes to the reduced DPYD enzyme activity and chemotherapeutic toxicity of 5-FU: results from genotyping study on 75 gastric carcinoma and colon carcinoma patients. *Med Oncol.*, 24(2):251-8. doi:10.1007/BF02698048.
- Zhang, H., Song, Y., Yang, C., & Wu, X. (2018). UHRF1 mediates cell migration and invasion of gastric cancer. . *Biosci Rep.*, 38(6):BSR20181065.
- Zhang, L., Zhong, K., Dai, Y., & Zhou, H. (2009). Genome-wide analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation by ChIP-chip in gastric cancer patients. *J Gastroenterol* , 44:305-12.
- Zhang, N., Yin, Y., Xu, S., & Chen, W. (2008). 5-Fluorouracil: Mechanisms of Resistance and Reversal Strategies. *Molecules*, Aug; 13(8): 1551–1569.
- Zhang, X., Bu, P., Liu, L., Zhang, X., & Li, J. (2015). Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in gastric cancer cells promotes the development of multidrug resistance. . *Biochem Biophys Res Commun*, 3;462(3):227-32.
- Zhang, Y., & Wang, X. (2020;). Targeting the Wnt/β-catenin signaling pathway in cancer. *Journal of Hematology & Oncology.* , 13:165.
- Zheng, S., Fu, G., Shen, H., Liu, Q., & Wang, W. (2021). Inhibitory effects of combinations of trastuzumab and cytotoxic chemotherapy drugs in HER2-positive gastric cancer. . *Cancer Biology.*, 226-235 | .

- Zhou, Z., Lin, Z., Pang, X., Tariq, M., Ao, X., & Li, P. (2018). Epigenetic regulation of long non-coding RNAs in gastric cancer. . *Onco Targets.*, 9(27): 19443–19458. . doi:10.18632/oncotarget.23821.
- Zhu, Q., Ma, C., Wang, Q., Song, Y., & Lv, T. (2016). The role of TWIST1 in epithelial-mesenchymal transition and cancers. *Tumour Biol.*, 37(1):185-97. doi:10.1007/s13277-015-4450-7.
- Zubarayev, M., Min, E., & Son, T. (2019). Clinical and molecular prognostic markers of survival after surgery for gastric cancer: tumor-node-metastasis staging system and beyond. *Transl Gastroenterol Hepatol*, 4: 59. doi:10.21037/tgh.2019.08.05

7. SİMGELER ve KISALTMALAR

- 2B:** 2 Boyutlu
3B: 3 boyutlu
5-FU: 5-Fluorasil
AJCC: Amerikan Kanser Ortak Komitesi
CAM: Koriallantoik Zar
Cis: Cisplatin
CIN: Kromozomal Kararsızlık
CSC: Kanser Kök Hücre
CSL: DNA Bağlanma Proteini
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNMT: DNA Metiltransferaz
dTMP: Deoksitimidin Mono-Fosfat
dUMP: Deoksüridin Monofosfatın
EBV: Epstein-Barr Virüs
EGF: Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EMT: Epitelyal Mekenkimal Geçiş
FBS: Fetal Bovine Serum
F-dUMP: Florodeoksiüridin Monofosfat
F-dUTP: Florodeoksiüridin Tripfosfat
F-UTP: Florouridin Trifosfat
FIGC: Ailesel İntestinal Gastrik Kanser
GAPPS: Proksimal Polipozis
GCSC: Gastrik Kanser Kök Hücresi
GK: Gastrik Kanser
HAT: Histon Asetiltransferaz
HDAC: Histon Deasetilaz
HDGC: Kalıtsal Diffüz Gastrik Kanser
H. pilori: Helikobakter Piloni
HUVEC: Human Umbilical Vein Endotelial Cells
IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
LncRNA: Uzun Kodlama Yapmayan RNA
MDR: Çoklu İlaç Direnci
MET: Mezenkimal Epitelyal Geçiş
miRNA: mikroRNA
MSI: Mikrosatellit Kararsızlık
OLE: Olea europaea Yapraklarından Elde Edilen Özüt
P-gp: P-glikoprotein
PI3K/AKT: Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PTEN: Phosphatase ve Tensin
SI: Seçicilik İndeksi
SNP: Tek Nükleotit Polimorfizmi
TP53: Tumor Protein P53
TS: Timidilat Sentaz
UICC: Uluslararası Kanserle Mücadele Birliği
WHO: Dünya Sağlık Örgütü

9. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca, ders döneminde ve tez çalışmalarında desteğini benden asla esirgemeyen, bilgilerini her daim benimle paylaşan, her zaman hoşgörülü, sabırlı, kibar ve sevgi dolu olan değerli danışmanım olan Prof. Dr. Berrin TUNCA'ya, tüm eğitim hayatım boyunca bilgi ve deneyimlerini sabır ile aktaran, her konuda hoşgörülü yaklaşan sayın hocalarım Prof. Dr. Ünal EGELİ ve Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER'e

Tüm tez çalışmalarım boyunca bu zorlu süreçte her anımda yanımda olan bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen her anlamda tüm kalbiyle destek olan ve emeklerinin karşılığını asla ödeyemeyeceğim çok değerli ekip arkadaşlarım Melis Mutlu'ya, Seçil Aksoy'a ve Gülçin Tezcan'a, bu yolda her zaman birlikte mücadele ettiğimiz sevgili dostlarım Ecem Efendi'ye, Dilara Kamer Çolak'a, Raşit Çevikalp'e Ufuk Ünal'a ve Havva Tezcan'a ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı asistan, öğrenci ve tüm çalışanlarına,

Tüm yaşantım boyunca her anımda tüm kalpleriyle yanımda olan ve bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan, tüm olumsuzluklara karşı yılmadan çalışmamı destekleyen her olumsuzluğa karşı benimle birlikte göğüs geren desteklerini her zaman kalbimde hissettiğim canım ailem Annem Aysun Tekin'e, Babam İsmail Tekin'e ve kardeşim Ceyda Tekin'e

sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

10. ÖZGEÇMİŞ

2014 yılında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümüne yerleştim. 2017 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Moleküler Genetik Laboratuvarında stajyer olarak görev aldım. 2018 yılında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesinden mezun olduktan sonra aynı sene Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım. Halen Uludağ Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime devam etmekteyim.