



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KÜÇÜK HÜCRELİ AKCİĞER KANSERLERİNDE  
EKSOZOM SALINIMINI HEDEFLEMENİN TEDAVİYE  
KATKISININ ARAŞTIRILMASI**

**Nesrin İREP**

**OCAK- 2023  
DENİZLİ**

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÜÇÜK HÜCRELİ AKCİĞER KANSERLERİNDE EKSOZOM  
SALINIMINI HEDEFLEMENİN TEDAVİYE KATKISININ  
ARAŞTIRILMASI**

**KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Nesrin İREP**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Onur TOKGÜN**

**OCAK- 2023  
DENİZLİ**

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Nesrin İREP

İmza :

**ÖZET**  
**KÜÇÜK HÜCRELİ AKCİĞER KANSERLERİNDE EKSOZOM**  
**SALINIMINI HEDEFLEMENİN TEDAVİYE KATKISININ**  
**ARAŞTIRILMASI**

Nesrin İREP

Yüksek Lisans Tezi, Kanser Moleküler Biyolojisi AD

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Onur TOKGÜN

Ocak- 2023, 65 Sayfa

Küçük hücreli akciğer kanseri, akciğer kanserlerinin %15-20'sini oluşturmaktadır. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK); erken ve uzak metastaz yeteneği, yüksek proliferasyon kapasitesi, düşük sağkalım oranları ve agresif yapısı ile karakterize edilen tümörlerdir. KHAK'nin mevcut tedavisinde etoposid ile kombine sisplatin veya platin türevi bileşikler kullanılmaktadır. Ancak, son 30 yılda yapılan temel ve klinik araştırmalara rağmen, tedavisinde bir ilerleme kaydedilememiştir. Bu nedenle, KHAK'nin erken teşhisi ve tedavisi için yeni tedavi stratejileri ve yeni biyobelirteçler keşfedilmelidir. Son yıllarda, normal ve kanserli hücreler tarafından sürekli olarak salındığı saptanan eksozom adı verilen hücre dışı veziküllerin, hücreler arası iletişimde ve çeşitli kanser türlerinin ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Bu veziküllerin biyogenezini/salınımını hedeflemek için çeşitli inhibitörler geliştirilmeye başlanmıştır. Bu çalışmada, KHAK tedavisinde birçok kanser hücresi tarafından salgılandığı tespit edilen eksozomların hedeflenmesinin KHAK karsinogenezi ve tedavi süreci üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Deneyde eksozom salınımında rol oynayan Rab27a ve nSMase'yi hedef alan Nexinhib20 ve GW4869 inhibitörleri kullanıldı. Bu inhibitörlerin tek başına veya mevcut tedaviye ek olarak KHAK hücre hatları olan N417 ve H524'e uygulanması, hücre proliferasyon tahlili ile belirlendi ve hücre çoğalma hızında önemli bir azalma meydana geldi ( $p < 0,0001$ ). İnhibitörlerin tek başına ve mevcut tedaviye ek olarak kullanılmasının KHAK hücrelerinden salınan eksozom miktarlarında önemli azalmaya neden olduğu tespit edildi. Ayrıca mevcut tedaviye ek olarak GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin kullanılması, KHAK hücrelerini apoptoza yönlendirdi. Hücrelere GW4869 ve Nexinhib20'nin tek başına veya kombine uygulanması sonucunda hücre siklus genlerinin ve CD9, CD63, TSG101, Rab27A gibi eksozom marker genlerinin ifade düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ). Sonuçlarımız, eksozomların in vitro olarak KHAK patogeneziinde önemli rollere sahip olduğunu ve KHAK hücre hatlarında RAB27A ve nSMase genlerinin hedeflenmesinin ekzozomal yolun aktivitesini önemli ölçüde azalttığını ortaya koydu. Bu nedenle, mevcut tedavi stratejilerine ek olarak, RAB27A ve nSMase genlerinin KHAK tedavisinde potansiyel terapötik hedef olabileceğini düşünmekteyiz.

**Anahtar Kelimeler:** Eksozom, tedavi, küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), GW4869, Nexinhib20

“”“Bu çalışma, TÜBİTAK (Proje No: 220S104) ve PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 2022SABE005)”””

**ABSTRACT**  
**INVESTIGATION OF THE CONTRIBUTION OF TARGETING EXOSOME**  
**RELEASE TO THERAPY IN SMALL CELL LUNG CANCERS**

Nesrin İREP

M. Sc. Thesis in Cancer Molecular Biology

Supervisor: Doç. Dr. Onur TOKGÜN (PhD)

January 2023, 65 Pages

Small cell lung cancer accounts for 15-20% of lung cancers. Small cell lung cancer (SCLC) is a tumor characterized by its early and distant metastasis ability, high proliferation capacity, low survival rates, and aggressive structure. The current treatment of SCLC uses cisplatin or platinum-derived compounds combined with etoposide. However, despite the basic and clinical research conducted over the past 30 years, no progress has been made in its treatment. Therefore, there is a necessity for new treatment strategies and new biomarkers to be discovered for the early diagnosis and treatment of SCLC. Extracellular vesicles called exosomes, which have been found to be constantly released by normal and cancerous cells in recent years, have been determined to play an important role in intercellular communication and the progression of various types of cancer. Various inhibitors have begun to be developed to target the biogenesis/release of these vesicles. In this study, the effects of targeting exosomes in SCLC treatment on SCLC carcinogenesis and the treatment process were investigated. Nexinhib20 and GW4869 inhibitors targeting Rab27a and nSMase, which play a role in exosome release, were used in the experiment. Administration of these inhibitors to SCLC cell lines N417 and H524 alone or in addition to existing therapy was determined by the cell proliferation assay and resulted in a significant reduction in cell proliferation rate ( $p < 0,0001$ ). We observed that the use of inhibitors alone or in addition to existing therapy leads to a significant decrease in the number of exosomes released from SCLC cells. Additionally, the use of GW4869 and Nexinhib20 inhibitors in addition to the existing treatment caused SCLC cells to undergo apoptosis. As a result of the administration of GW4869 and Nexinhib20 alone or in combination, it was observed that the expression levels of cell cycle and exosome marker genes such as CD9, CD63, TSG101, Rab27A were found to be decreased ( $p < 0,0001$ ). Our results revealed that exosomes have important roles in SCLC pathogenesis in vitro and targeting of RAB27A and nSMase genes in SCLC cell lines significantly reduces the activity of the exosomal pathway. Therefore, we believe that in addition to existing treatment strategies, the RAB27A and nSMase genes may be potential therapeutic targets in the treatment of SCLC.

**Keywords** : Exosome, Treatment, Small cell lung cancer (SCLC), GW4869, Nexinhib20

**This study was supported by TUBITAK (Project Number: 220S104) and Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project Number: 2022SABE005)**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam süresince bana yol gösteren, akademik hayatımda yeni tecrübeler kazanmamı sağlayan, bilimsel ve deneyimsel katkılarını esirgemeyen başta tez danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Onur TOKGÜN' e,

Tüm eğitim sürecimde bana kattıkları değerli bilgiler ve yorumlarla bilimsel alt yapımın gelişimine katkısı bulunan başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Hakan AKÇA ve tüm hocalarıma,

Tez çalışmam sürecinde yardımlarını esirgemeyen ve kritik yorumlarını paylaşan çalışma arkadaşlarım Büşra ÇELİKKAYA ve Kubilay İNCİ' ye,

Ve beni bugünlere getiren, tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her koşulda yanımda olan canım aileme teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>ÖZET</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	vii
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	viii
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xi
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	xii
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	xiii
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Amaç .....	2
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI</b> .....	3
2.1. Akciğer Kanseri .....	3
2.1.1. Epidemiyoloji .....	3
2.1.2. Etiyoloji .....	4
2.1.2.1. Sigara .....	4
2.1.2.2. Diyet ve Beslenme .....	4
2.1.2.3. Hava Kirliliği .....	5
2.1.2.4. Mesleki ve Çevresel Maruziyet .....	5
2.1.2.5. Genetik Eğilim .....	6
2.1.2.6. Radyoterapi .....	6
2.1.2.7. Sosyo-ekonomik Durum .....	6
2.2. Akciğer Kanseri Histopatolojik Sınıflaması .....	6
2.2.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri .....	9
2.2.1.1. Sınırlı Evre .....	9

2.2.1.2. Yaygın Evre .....	10
2.2.2. Akciğer Kanseri Evrelendirme .....	10
2.2.3. Prognostik Faktörler .....	11
2.3. Küçük Hücreli Akciğer Kanserinde Tedavi Stratejileri .....	12
2.4. Sisplatin .....	12
2.5. Etoposid .....	14
2.6. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Tedavisinde Sisplatin-Etoposid Kombinasyonunun Rolü .....	14
2.7. Ekstraselüler Veziküller (EV) .....	15
2.8. Eksozomlar .....	15
2.8.1. Eksozom Biyogenezi .....	15
2.8.2. Eksozom Aracılı Hücreler Arası İletişim .....	18
2.9. Akciğer Kanserinde Eksozomlar .....	18
2.10. Eksozom Salınımında RAB27A Önemi .....	19
2.10.1. RAB27A'nın Kanser Progresyonundaki Rolü .....	20
2.11. Nötr Sfingomiyelinaz (nSMase 2) Aracılı Eksozom Salınımı .....	20
2.11.1. nSMase2'nin Kanserdeki Rolü .....	21
2.12. Kanserde Terapötik Hedefler Olarak Eksozomlar .....	21
2.13. GW4869 .....	22
2.13.1. Kanserde GW4869 .....	23
2.14. Nexinhib20 .....	24
2.15. Hipotez .....	25
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>26</b>
3.1. Gereçler .....	26
3.2. Yöntemler .....	28
3.2.1. Hücre Kültürü .....	28
3.2.1.1. Hücre Dondurma Prosedürü .....	28
3.2.1.2. Hücreleri Çözme .....	29
3.2.1.3. Hücre Ekimi .....	29
3.2.2. Deneyde Kullanılacak İnhibitörlerin Çözülmesi ...	29
3.2.3. Sitotoksinite ve Proliferasyon .....	30



3.2.3.1. Proliferasyon.....	30
3.2.4. Eksozomların Toplanması .....	31
3.2.5. Eksozom İzolasyonu .....	31
3.2.6. Eksozom Kantitasyonu .....	32
3.2.7. Total RNA İzolasyonu .....	32
3.2.8. Total RNA'nın cDNA'ya Dönüşümü .....	33
3.2.9. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR) .....	33
3.2.10. Apoptoz Tespiti .....	34
3.2.11. İstatistiksel Analiz .....	35
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>36</b>
4.1. KHAK Hücre Hatlarına Uygulanan İnhibitörlerin IC50 Değerlerinin Belirlenmesi .....	36
4.2. KHAK Hücre Hatlarına Uygulanan İnhibitörler, Hücre Proliferasyonu ve Hücre Morfolojisine Etkisi .....	37
4.3. KHAK Hücre Hatlarına GW4869 ve Nexinhib20 İnhibitörlerinin Uygulandığında Eksozom Salınım Miktarlarının Belirlenmesi .....	41
4.4. Mevcut Tedaviye Ek GW4869 ve Nexinhib20 İnhibitörlerinin Uygulanmasının Apoptoza Yönlendirmesi .....	42
4.5. GW4869 ve Nexinhib20 İnhibitörlerinin Uygulanması Sonucu, Hücre Siklus Genlerinin ve Eksozom Marker Genlerinin İfade Düzeylerinin Real-Time PCR Aracılığıyla Belirlenmesi .....	45
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>48</b>
<b>6. SONUÇLAR .....</b>	<b>55</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>57</b>
<b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>64</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 1.1</b> Sisplatinin DNA ile etkileşimi .....	13
<b>Şekil 2.1.</b> Topoizomeraz II'ye bağlanan etoposid etki mekanizması .....	14
<b>Şekil 3.1.</b> Eksozom biyogenez ve salgı mekanizmaları .....	16
<b>Şekil 3.2.</b> ESCRT'ye bağımlı ve bağımsız MVB biyogenezi ...	17
<b>Şekil 3.3.</b> Akciğer kanseri ilerlemede eksozomların rolü ...	19
<b>Şekil 3.4.</b> Eksozom salınımlarında nSMase2'nin rolü .....	21
<b>Şekil 4.1.</b> GW4869 yapısı .....	22
<b>Şekil 4.2.</b> GW4869 ve nSMase arasındaki etkileşimler .....	23
<b>Şekil 5.1.</b> Nexinhib20'nin RAB27A-JFC1 mekanizması .....	24
<b>Şekil 6.1.</b> KHAK hücre hatlarına uygulanan inhibitörlerin IC50 değerlerinin belirlenmesi .....	36
<b>Şekil 7.1.</b> KHAK hücre hatlarına inhibitörlerin uygulanması sonucu hücre proliferasyon hızı .....	38
<b>Şekil 7.2.</b> KHAK tedavisine ek GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri uygulanması sonucu hücre proliferasyon hızı .....	40
<b>Şekil 7.3.</b> KHAK hücre hatlarında eksozom salınımı baskılanması sonucu koloni morfolojisinin değişimi .....	40
<b>Şekil 8.1.</b> KHAK hücre hatlarında kalitatif eksozom miktar tayini .....	42
<b>Şekil 9.1.</b> KHAK hücre hatlarında tedaviye ek GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin uygulanması sonucu apoptotik hücreler .....	43
<b>Şekil 9.2.</b> KHAK tedavisine ek hücre ölüm oranı .....	44
<b>Şekil 10.1.</b> KHAK hücre hatlarında hücre siklus genlerinin ifade düzeyleri .....	45
<b>Şekil 10.2.</b> N417 hücre hattında eksozom marker genlerinin ifade düzeyleri .....	46
<b>Şekil 10.3.</b> H524 hücre hattında eksozom marker genlerinin ifade düzeyleri .....	47

**TABLULAR DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 1.1.</b> Dünya Sağlık Örgütü'ne göre akciğer kanserlerinin histopatolojik sınıflandırılması .....	7
<b>Tablo 2.1.</b> Güncel TNM evreleme sistemi .....	11
<b>Tablo 3.1.</b> Küçük hücreli akciğer kanserinde prognostik faktörler .....	12
<b>Tablo 4.1.</b> Çalışmada kullanılan cihazlar .....	26
<b>Tablo 4.2.</b> Çalışmada kullanılan kitler .....	26
<b>Tablo 4.3.</b> Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PZR) kullanılan primerler .....	27
<b>Tablo 4.4.</b> Deneyde kullanılan inhibitörler .....	27
<b>Tablo 5.1.</b> qRT-PZR koşulları .....	34
<b>Tablo 6.1.</b> KHAK hücre hatlarına uygulanan inhibitörlerin IC50 değerleri .....	37

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD .....	Amerika Birleşik Devletleri
AICR .....	Amerikan Kanser Araştırmaları Enstitüsü
AJCC .....	Amerikan Ortak Kanser Komitesi
cDNA .....	Komplementer DNA
circRNA.....	Dairesel RNA
DMSO.....	Dimetilsülfoksit
DNA .....	Deoksiribonükleik Asit
EMT .....	Epitelyal-Mezenkimal Geçişte
ESMO .....	Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği
ESCRT .....	Endozomal sıralama taşıma kompleksi
EV .....	Ekstraselüler Veziküller
FBS.....	Fetal Dana Serumu
GLOBOCAN .....	Küresel Kanser İstatistikleri
GBDP .....	Küresel Hastalık Yükü Projesi
HSP .....	Isı Şoku Proteinleri
IARC .....	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
ILV .....	İntralüminal Veziküllerin
JFC1 .....	Sinaptotagmin Benzeri Protein1 (Slp1)
kDa .....	Kilodalton
KHAK .....	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK .....	Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri
LDH .....	Laktat Dehidrogenaz
lncRNA.....	Uzun Kodlayıcı Olmayan RNA
ml .....	Mililitre
miRNA .....	MikroRNA
MV .....	Mikroveziküller
MVB .....	Multiveziküler Gövde
MYC.....	Avian myelocytomatosis viral oncogene Homolog
NCCN .....	National Comprehensive Cancer Network
nSMase 2 .....	Nötr Sfingomiyelinaz 2
NE .....	Nöroendokrin
PA .....	Fosfatidik Asit
PM .....	Partikül Maddeler
PS .....	Fosfatidilserin
PZR.....	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qRT-PCR.....	Kantitatif Eş Zamanlı PZR
RNA.....	Ribonükleik Asit
SE .....	Sınırlı Evre

SNARE'ler .....Çözünebilir N-etilmaleimide Duyarlı Faktör Bağlanma Proteini  
Reseptörleri  
SM .....Sfingomyelin  
TEM .....Tetraspanin ile Zenginleştirilmiş Mikro Bölgeler  
YE .....Yaygın Evre  
VALSG .....Veteran's Administration Lung Cancer Study Grup  
V16 .....Vepesid  
Vps4 .....Vakuolar Protein Ayırma ile İlişkili Protein 4  
WCRF ..... Dünya Kanser Araştırma Fonu  
µl.....Mikrolitre

## 1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, her yıl artan yeni vaka sayısı ile dünya çapında kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir. GLOBOCAN (Global Cancer Statistics) 2020 raporuna göre, 2020 yılında yaklaşık 2.2 milyon yeni vaka tespit edilmiş ve 1.8 milyon kişi akciğer kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiştir (Sung vd. 2021). Diğer kanser türleri ile karşılaştırıldığında, akciğer kanseri erkeklerde birinci sırada yer alırken kadınlarda ikinci sırada yer almaktadır. Akciğer kanseri genel olarak küçük hücreli akciğer kanseri ve küçük hücre dışı akciğer kanserleri olarak iki alt gruba ayrılmaktadır. Küçük hücreli akciğer kanseri; yüksek metastaz yeteneği, yüksek proliferasyon kapasitesi, kötü sağkalım oranları ve agresif yapısı ile birlikte akciğer kanserinin %15-20' sini oluşturan nöroendokrin (NE) tümörlerdir. Küçük hücreli akciğer kanserinin (KHAK) sınırlı evre ve yaygın evre olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Sınırlı evre KHAK olgularında tek bölge akciğer tutulumları veya yakın lenf nodu tutulumları gözlenirken, yaygın evre KHAK olgularında tüm akciğer tutulumu veya beyin, kemik, karaciğer vb. diğer organlara metastatik bulgulara sahip olduğu gözlemlenmiştir.

KHAK, erken ve uzak metastaz yeteneğine sahip olduğundan geleneksel tedaviye yanıt oranları oldukça düşüktür. KHAK vakalarının çoğunda ilk kemoterapi uygulamasından sonra direnç geliştiği ve tümör progresyonunun desteklendiği belirlenmiştir. Bu sebeple KHAK tedavisinde etkili bir tedavi stratejisi ve kanıtlanmış hedef bir ilaç bulunamamıştır. Ancak kombine kemoterapi (sisplatin, etoposid) ve iyonize radyasyon ile tedavi edilerek ortalama sağkalım oranı arttırılmaya çalışılmaktadır. Sisplatin ve etoposid tedavisi KHAK tedavisinde en sık kullanılan kombine tedavidir. Fakat gelişen ilaç direnci ve çeşitli yan etkiler kısa vadede sağkalım oranını arttırmış olsa da uzun vadede yetersiz kalmıştır. Kemoterapi etkinliği ve ortalama sağkalım oranlarının arttırılması ve istenmeyen yan etkilerin azaltılması amacı ile yeni tedavi stratejileri araştırılmaya başlanmıştır.

Son yıllarda KHAK dahil olmak üzere birçok tümör hücresi tarafından salgılandığı tespit edilen eksozom adı verilen veziküllerin, hücre içi/hücre dışı iletişimde ve tümör

büyümesinde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. Eksozomlar kan, idrar, amniyotik sıvı, beyin omurilik sıvısı, anne sütü, serum ve plazma gibi birçok vücut sıvısında bulunan çift katlı lipit tabaka ile çevrili, yaklaşık 30- 150 nm aralığında hücre dışı veziküllerdir. Bu veziküller hücre proliferasyonunu etkiler, tümör hücrelerinin invazyon ve metastazını indükler, anjiyogenezi uyarır, ilaç direncini artırır ve tümör mikroçevresindeki faktörler ile bağışıklık modülasyonunda rol oynar. Bu nedenle kanser hücrelerinden salgılanan eksozomlar; erken teşhis, yüksek metastatik kanser hücrelerinin tespiti, kanser heterojenliğinin değerlendirilmesi, uygun tedavi stratejilerinin belirlenmesi ve tedaviye direnç mekanizmalarının tespitinde önemli bir biyobelirteç oluşturabilir. Bu veziküllerin kargo içerikleri aydınlatılmalı ve kargo içeriklerinden faydalanarak eksozomal inhibitörler geliştirilmelidir. Son yıllarda bu bileşenlerden yararlanılarak geliştirilen Nexinhib20 ve GW4869 inhibitörleri, eksozom salınımını farmakolojik olarak inhibe ettiği kanıtlanan eksozomal inhibitörleridir. Ancak mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır.

Literatürden elde edilen bilgilere göre KHAK' inde eksozom salgı miktarının fazla olduğu tespit edilmiştir. KHAK hücrelerinden salınan eksozomların, tümör oluşumu ve tedavi stratejisinin belirlenmesine yönelik çalışmaların yetersiz kalması, eksozomların KHAK'lerinde önemli bir araştırma konusu olduklarını ortaya koymuştur. KHAK tedavisinde geliştirilen eksozom inhibitörlerinin kullanımı, tedaviye duyarlılığını arttırmak için yeni bir tedavi stratejisi olarak umut vaat edici potansiyele sahiptir. Elde edilen verilerden yararlanarak kanser hücrelerinden salınan eksozomlara müdahale etmenin, geleneksel tedavilere alternatif ya da destek bir tedavi stratejisi geliştirilmesine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

## 1.1 AMAÇ

Sınırlı ve yaygın evre KHAK hücrelerinin Nexinhib20 ve GW4869 ile hedeflenmesinin eksozom salınım mekanizmasına etkisinin aydınlatılması ve KHAK tedavisinde kullanılan geleneksel tedavi stratejisi olan sisplatin-etoposid tedavisine ek olarak Nexinhib20 ve GW4869 inhibitörlerinin tedavi sürecine olası etkisinin araştırılması amaçlanmaktadır. Eksozom salgılayan hücre dizileri aracılığıyla oluşturulacak olan in vitro modelde eksozom salınımının hedeflenmesinin KHAK'lerinde olası bir destek tedavi stratejisi olma potansiyeli araştırılacaktır.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1 Akciğer Kanseri

#### 2.1.1 Epidemiyoloji

Akciğer kanseri, dünya çapında en sık teşhis edilen kanserdir ve kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir. Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan GLOBOCAN (Global Cancer Statistics) 2020 raporuna göre, 2020 yılında yaklaşık 2.2 milyon yeni vaka tespit edilmiş ve 1.8 milyon kişi akciğer kanseri nedeniyle hayatını kaybetmiştir (Sung vd. 2021). Bu rapora göre, akciğer kanseri erkeklerde mortalite ve morbiditesi ile birinci sırada iken, kadınlarda ölüm oranı olarak meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Bu durum, birçok Avrupa ülkesinde, kadınlarda sigara kullanımına bağlı olarak giderek artmaktadır.

Türkiye Kanser İstatistikleri 2017 verilerine göre akciğer kanseri, erkeklerde 100.000 kişide 56,7 ile yaşa göre en sık görülen 10 kanser arasında ilk sırada yer alırken, kadınlarda 100.000 kişide 11,1 ile dördüncü sırada yer almaktadır. Ülkemizde akciğer kanseri erkeklerde 25-49 yaş grubunda %10,5, 50-69 yaş grubunda %26,2 ve 70 ve üzeri yaş grubunda %20,4; kadınlarda 25-49 yaş grubunda %2,6, 50-69 yaş grubunda %7,1, 70 ve üzeri yaş grubunda ise %8,7'inde görüldüğü tespit edilmiştir (Türkiye Kanser İstatistikleri, 2017).

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre Türkiye, 2020 yılında 41.264 yeni akciğer kanseri vakası ve 37.070 ölümlü dünya ortalamasında üst sıralarda yer almaktadır. Bu vakaların 34.207'sini erkekler, 7.057'sini ise kadınlar oluşturmaktadır. Bu verilerden elde edilen sonuçlar, Türkiye'nin tüm dünya ülkeleri arasında erkeklerde akciğer kanserinde en yüksek insidans (74.8/ 100.000) ve mortalite oranına (67.5/ 100.000) sahip olduğunu göstermektedir (web 1).



## **2.1.2 Etiyoloji**

### **2.1.2.1 Sigara**

Tütün maruziyeti ve özellikle de sigara kullanımı, başta KHAK olmak üzere tüm akciğer kanserlerinin %90-95'inden sorumludur. İçilen sigara miktarı, sigara maruziyeti, sigara içme yoğunluğu, sigaraya başlama yaşı, cinsiyet, tütün içeriği gibi birçok faktör akciğer kanseri riskini arttırmaktadır. Ayrıca sigara dumanına pasif olarak maruz kalmak da akciğer kanseri riskini arttıran bir diğer faktördür.

Küresel Hastalık Yüğü Projesi'ne (GBDP) göre, dünya genelinde 2019 yılında yaklaşık 1,14 milyar insanın sigara içtiğini ve bu rakamın 1990'da bir milyarın altında olduğu tahmin edilmektedir. 2020 yılında dünya genelinde tütün kullanımının, %80'i erkeklerde ve %87'si halen sigara içenlerde olmak üzere 7,7 milyon ölümden sorumlu olduğunu tahmin edilmektedir (web 2). Sigara içme prevalansı göz önüne alındığında ise, Çin ve Hindistan gibi bazı Asya ülkelerinde sigara içme oranlarının yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Ticari olarak satılan sigaralar, 7000'den fazla kimyasal bileşen içermektedir. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) bu bileşenlerden 70'den fazlasının karsinogen özellikte olduğu belirtmiştir. Sigara dumanında bulunan çok sayıda karsinogen özellikteki bileşik (polisiklik aromatik hidrokarbonlar, arsenik, krom gibi diğer organik ve inorganik bileşikler) akciğer kanserine neden olan başlıca zararlardandır. Ancak nikotin, tütün ürünlerinin kullanımının zararlı etkilerinden doğrudan sorumlu değildir.

### **2.1.2.2 Diyet ve Beslenme**

Meyve ve sebze tüketimi, sigara içenlerde akciğer kanseri riskinin azalmasıyla ilişkilendirilmiş; özellikle turpgillerden sebzelerin yenmesinin akciğer kanseri riski ile ters orantılı olduğu tespit edilmiştir (Büchner vd. 2010, Lam vd. 2010). Antioksidan açısından zengin olan Vitamin A, C ve E karsinogenezi bloke etmede anahtar rol oynamaktadır. Bu vitaminlerin eksikliğinin ise akciğer kanserine neden olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle günlük diyetinde tüketilmesi tavsiye edilmektedir. Dünya Kanser Araştırma Fonu/Amerikan

Kanser Araştırmaları Enstitüsü (WCRF/AICR) diyet, beslenme, fiziksel aktivite ve akciğer kanserine ilişkin raporunda; özellikle alkol, kırmızı ve işlenmiş et tüketiminin daha yüksek akciğer kanseri riski ile ilişkili olduğunu gstermiştir (web 3).

### **2.1.2.3 Hava Kirliliği**

Hava kirliliği, havada çok sayıda zararlı madde birikmesi sonucunda meydana gelir. Birikim belirli bir konsantrasyona ulaştığında insan sağlığı üzerinde zararlı etkilere neden olabilir (Landrigan 2017, Li vd. 2021, Linou vd. 2018, Thurston vd. 2017). İklim değişikliği ve sanayileşmenin hızı nedeniyle ciddi bir küresel sorun olan hava kirliliği; yüksek konsantrasyonlarda partikül maddeler (PM), kükürt dioksit, nitrik oksit, toksik metaller ve dumanın kaydedildiği dünya genelinde birçok büyük nüfuslu şehirde meydana gelmektedir. Fosil yakıtların yanması sonucu oluşan, polisiklik aromatik hidrokarbonları ve arsenik, nikel ve krom gibi metaller akciğer kanserine sebep olan diğer kanserojenlerdir.

### **2.1.2.4 Mesleki ve evresel Maruziyet**

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı, akciğer kanseri için kanserojen olarak 12 farklı mesleki ve çevresel maruziyet faktörü belirlemiştir (alüminyum üretimi, arsenik, asbest, bis-klorometil eter, berilyum, kadmiyum, krom ve kömür gazlaştırma dumanları, silika, nikel, radon ve kurum) (International Agency for Research on Cancer, 2019). Mesleki ve çevresel kanserojenlere maruz kalmanın, küresel akciğer kanseri vakalarının %5-10'unu oluşturduğu tahmin edilmektedir ve bunun en yaygın nedeni olarak asbest gösterilmektedir. Asbest, alev geciktirici özelliklerinden dolayı inşaatta kullanılan doğal olarak oluşan lifli bir mineraldir. Asbestin akciğerlerde lif biriktirdiği bilindiğinden çeşitli akciğer patolojileri ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca asbest lifleri tütün partiküllerini yakaladığı için, sigara içmek asbeste maruz kalanlarda akciğer kanseri riskini arttırmaktadır.

Radon, akciğer kanseri vakalarında mesleki ve çevresel nedenlerin bir başka yaygın nedenidir. Radon, uranyumun bozunmasından kaynaklanan mutajenik özelliklere sahip bir doğal bir gazdır. İç mekan dekorasyon, toprak, kaya ve yapı malzemeleri ve madenlerde değişik konsantrasyonlarda bulunur. Özellikle madencilikte radon maruziyeti nedeni ile akciğer kanseri insidansı oldukça yüksektir. Amerika Birleşik Devletleri'nde akciğer kanserinin sigaradan sonra ikinci en yaygın nedeni radondur ve her yıl yaklaşık 20.000 ölüm radonla ilgilidir (Pawel and Puskin 2004).

### **2.1.2.5 Genetik Eğilim**

Literatürde, akciğer kanseri risk tahmin algoritmalarında ailede akciğer kanseri öyküsünün önemi vurgulanmıştır. Ailesinde akciğer kanseri öyküsü olan olgularda, sigara içmeyenlerde risk artarken, sigara içenlerde akciğer kanseri riskinin 2 kat artmış olduğu gözlenmiştir (Matakidou 2005). Ayrıca son 20 yılda akciğer kanserine genetik yatkınlık konusunda 1000'den fazla aday gen ilişkilendirme çalışması yapılmıştır.

### **2.1.2.6 Radyoterapi**

Radyoterapi akciğer kanseri tedavisinde kullanılan önemli bir yöntemdir. Malignite sebebi ile radyoterapi alan hastalarda akciğer kanseri riskinin artmış olduğu bilinmektedir. Meme kanseri, özofagus kanseri, lenfoma, prostat kanseri dahil olmak üzere birçok kanser tedavisinde uygulanan radyoterapiden sonra akciğer kanseri görülme olasılığının artmış olduğu belirlenmiştir.

### **2.1.2.7 Sosyo-ekonomik Durum**

Amerikan Kanser Derneği'nden elde edilen sonuçlar, kanser nedenli ölümlerin genel olarak Amerika Birleşik Devletleri'ndeki zengin bölgelere göre yoksul bölgelerde %28 daha fazla olduğu ve yoksul bölgelerde erkekler arasında >%40 daha yüksek olduğu bulunmuştur (Siegel vd. 2019). 17.021 vaka ve 20.885 kontrolden oluşan bir çalışmada, Uluslararası Sosyo-Ekonomik İndeksi göre düşük sosyoekonomik statüye sahip kişilerde, erkeklerde akciğer kanseri riskinde %84 ve kadınlarda %54 artmış riskle ilişkilendirilmiştir (Hovanec vd. 2018).

## **2.2 Akciğer Kanseri Histopatolojik Sınıflaması**

Dünya Sağlık Örgütü'nün 2015 yılında yapmış olduğu en son patolojik sınıflandırma Tablo 1' de verilmiştir.

**Tablo 1.1** Dünya Sağlık Örgütü'ne göre akciğer kanserlerinin histopatolojik sınıflandırılması (Web 4).

Table 1. List of Lung Tumors in 2021 WHO Classification of Thoracic Tumors With ICD-O Codes		
<b>Epithelial tumors</b>		
<i>Papillomas</i>		
Squamous cell papilloma, NOS	8052/0	Pleomorphic carcinoma
Squamous cell papilloma, inverted	8053/0	Giant cell carcinoma
Glandular papilloma	8260/0	Spindle cell carcinoma
Mixed squamous cell and glandular papilloma	8560/0	Pulmonary blastoma
<i>Adenomas</i>		Carcinosarcoma
Sclerosing pneumocytoma	8832/0	<i>Other epithelial tumors</i>
Alveolar adenoma	8251/0	NUT carcinoma
Papillary adenoma	8260/0	Thoracic SMARCA4-deficient undifferentiated tumor <sup>o</sup>
Bronchiolar adenoma/ciliated muconodular papillary tumor <sup>o</sup>	8140/0	<i>Salivary gland-type tumors</i>
Mucinous cystadenoma	8470/0	Pleomorphic adenoma
Mucous gland adenoma	8480/0	Adenoid cystic carcinoma
<i>Precursor glandular lesions</i>		Epithelial-myoepithelial carcinoma
Atypical adenomatous hyperplasia	8250/0	Mucoepidermoid carcinoma
Adenocarcinoma in situ		Hyalinizing clear cell carcinoma <sup>o</sup>
Adenocarcinoma in situ, nonmucinous	8250/2	Myoepithelioma
Adenocarcinoma in situ, mucinous	8253/2	Myoepithelial carcinoma
<i>Adenocarcinomas</i>		<b>Lung neuroendocrine neoplasms</b>
<i>Minimally invasive adenocarcinoma</i>		<i>Precursor lesion</i>
Minimally invasive adenocarcinoma, nonmucinous	8256/3	Diffuse idiopathic neuroendocrine cell hyperplasia
Minimally invasive adenocarcinoma, mucinous	8257/3	<i>Neuroendocrine tumors</i>
<i>Invasive nonmucinous adenocarcinoma</i>		Carcinoid tumor, NOS/neuroendocrine tumor, NOS
Lepidic adenocarcinoma	8250/3	Typical carcinoid/neuroendocrine tumor, grade 1
Acinar adenocarcinoma	8551/3	Atypical carcinoid/neuroendocrine tumor, grade 2
Papillary adenocarcinoma	8260/3	<i>Neuroendocrine carcinomas</i>
Micropapillary adenocarcinoma	8265/3	Small cell carcinoma
Solid adenocarcinoma	8230/3	Combined small cell carcinoma
<i>Invasive mucinous adenocarcinoma</i>		Large cell neuroendocrine carcinoma
Mixed invasive mucinous and nonmucinous adenocarcinoma	8254/3	Combined large cell neuroendocrine carcinoma
Colloid adenocarcinoma	8480/3	<b>Tumors of ectopic tissues</b>
Fetal adenocarcinoma	8333/3	Melanoma
Adenocarcinoma, enteric type	8144/3	Meningioma
Adenocarcinoma, NOS	8140/3	<b>Mesenchymal tumors specific to the lung</b>
<i>Squamous precursor lesions</i>		Pulmonary hamartoma
		Chondroma
		Diffuse lymphangiomatosis <sup>o</sup>
		Pleuropulmonary blastoma
		Intimal sarcoma

Adenocarcinoma, NOS	8140/3	Pleuropulmonary blastoma	8973/3
Squamous precursor lesions		Intimal sarcoma	9137/3
Squamous precursor lesions		Congenital peribronchial myofibroblastic tumor	8827/1
Squamous cell carcinoma in situ	8070/2	Pulmonary myxoid sarcoma with EWSR1-CREB1 fusion	8842/3
Mild squamous dysplasia	8077/0		
Moderate squamous dysplasia	8077/2		
Severe squamous dysplasia	8077/2		
Squamous cell carcinomas		<b>PEComatous tumors</b>	
Squamous cell carcinoma, NOS	8070/3	Lymphangioliomyomatosis	9174/3 <sup>b</sup>
Squamous cell carcinoma, keratinizing	8071/3	PEComa, benign	8714/0
Squamous cell carcinoma, nonkeratinizing	8072/3	PEComa, malignant	8714/3
Basaloid squamous cell carcinoma	8083/3	<b>Hematolymphoid tumors</b>	
Lymphoepithelial carcinoma	8082/3	MALT lymphoma	9699/3
Large cell carcinomas		Diffuse large B-cell lymphoma, NOS	9680/3
Large cell carcinoma	8012/3	Lymphomatoid granulomatosis, NOS	9766/1
Adenosquamous carcinomas		Lymphomatoid granulomatosis, grade 1	9766/1
Adenosquamous carcinoma	8560/3	Lymphomatoid granulomatosis, grade 2	9766/1
Sarcomatoid carcinomas			
Lymphomatoid granulomatosis, grade 3			9766/3
Intravascular large B-cell lymphoma			9712/3
Langerhans cell histiocytosis			9751/1
Erdheim-Chester disease			9749/3

Note: These morphology codes are from the ICD-O-3.2 (IACR [Internet]), Lyon (France): IARC; 2019. ICD-O-3.2; updated 2019 April 23. Available from: [http://www.iacr.com.fr/index.php?option=com\\_content&view=article&id=149:icd-o-3-2&catid=80&Itemid=545](http://www.iacr.com.fr/index.php?option=com_content&view=article&id=149:icd-o-3-2&catid=80&Itemid=545). Behavior is coded /0 for benign tumors; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behavior; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; /3 for malignant tumors, primary site; and /6 for malignant tumors, metastatic site. Behavior code /6 is not generally used by cancer registries. This classification is modified from the previous WHO classification, taking into account changes in our understanding of these lesions. Subtype labels are indented. Reprinted from WHO Classification of Tumours, Thoracic Tumours, 5th edition, pages 2-3, IARC, 2021.

<sup>a</sup>Labels marked with a dagger have undergone a change in terminology of a previous code.

<sup>b</sup>Codes marked with an asterisk were approved by the IARC/WHO Committee for ICD-O at its meeting in October 2020.

IACR, International Association of Cancer Registries; IARC, International Agency for Research on Cancer; ICD-O-3.2, International Classification of Diseases for Oncology, third edition, second revision; NOS, not otherwise specified.

WHO akciğer kanserlerini biyolojik özellikleri, tedavi seçenekleri ve prognozlarına göre iki büyük sınıfa ayırmıştır. Bunlar küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) (%15-20) ve küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) (%80-85)'dir (Travis vd. 2004). Tüm akciğer kanserlerinin %15-20'sini küçük hücreli karsinomlar, %10'unu büyük hücreli farklılaşmamış karsinomlar, %28-42'sini adenokarsinomlar, %25-44'ünü epidermoid (skuamöz) karsinomlar ve %1-2'sini karsinoid tümörler oluşturmaktadır. Ayrıca akciğer kanserlerininin %2'den daha az kısmını ise nadir akciğer tümörleri oluşturmaktadır (Travis vd. 2004).

### 2.2.1 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KHAK, 1958 yılında Veteran's Administration Lung Cancer Study Grup (VALSG) tarafından yapılan evreleme sistemine göre sınırlı evre (SE) ve yaygın evre (YE) olarak sınıflandırılmıştır (Kalemkerian 2011). Her yıl dünya çapında tahmini 250.000 yeni vaka ve en az 200.000 ölüm içermektedir (International Agency for Research on Cancer, 2014). ABD' de ise, her yıl 30.000-35.000 yeni KHAK vakası teşhis edilmektedir (Govindan vd. 2006, Kalemkerian vd. 2018). Tütün kullanımına bağlı olarak farklı ülke/bölgelerde KHAK insidansı değişiklik göstermektedir.

KHAK, tüm akciğer vakalarının %15-20'sini oluşturan nöroendokrin kökenli kanserlerdir. Hemen hemen tüm KHAK vakaları, mevcut veya eski sigara içenlerde görülmektedir. Hiperkromatik nükleuslu, dar sitoplazmalı ve lenfositlenmiş iki kat büyük hücrelerin oluşturduğu gruplardan oluşmaktadır. Yüksek mitotik oranlar ve yaygın nekroz göstermektedir. Sitolojik olarak dar sitoplazmalı, organelden fakir hücrelerdir. Sitoplazmada nöroendokrin salgı özelliği bulunan yoğun granüller görülür. Tanı anında hastaların %80'inde uzak metastaz gözlemlenmiştir (Bishnoi vd. 2011). İkiye katlanma zamanı yaklaşık 30 gündür.

KHAK vakalarının yaklaşık %70'ini yaygın evre KHAK, yaklaşık %30'unu sınırlı evre KHAK oluşturmaktadır. KHAK; yüksek büyüme oranı, kısa sürede katlanma zamanı, erken ve uzak metastaz potansiyeli ile karakterize agresif bir malignitedir. Kemoterapi ve radyoterapiye olan duyarlılıkları ise oldukça yüksektir. Ortalama sağkalım oranları 8-10 aydır ve 5 yıllık sağkalım oranları %2'nin altındadır. Bunun sebebi son 30 yılda çok az klinik iyileşme sağlanmış olmasıdır. KHAK tedavisinde yaygın olarak etoposid-platin kombine standart tedavileri kullanılmaktadır. Bu tedavinin yetersizliği, ilave tedavi stratejilerinin geliştirilmesine neden olmuştur. Ancak tedavi için kanıtlanmış hedef ilaç ve tedavi stratejisi bulunamamıştır.

#### 2.2.1.1 Sınırlı Evre

Sınırlı evre, tüm KHAK vakalarının %25- 30'unu oluşturmaktadır. Sınırlı evre KHAK olgularında, tek akciğer tutulumu ve yakın lenf nodu bölgelerine tutulum gözlemlenmektedir. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) 2018 kılavuzu ve IASLC Lung Cancer Staging Proje'sine göre sınırlı evre KHAK'ta sisplatin ve etoposid

kombine kemoterapisi ile radyoterapi beraber önerilmektedir. Sınırlı evre KHAK vakalarında tek bir radyasyon alanıyla tedaviye yanıt oranı yüksek olmasına rağmen, uzun süreli sağkalım oranları oldukça düşüktür. Tedavi ile sınırlı evre hastalarda ortalama yaşam süresi 14-16 aya, yaygın evre hastalarda ise 8-11 aya kadar uzamaktadır.

### **2.2.1.2 Yaygın Evre**

Yaygın evre; akciğer boyunca ve diğer akciğere, göğsün diğer tarafındaki lenf düğümlerine veya vücudun diğer bölgelerine (kemik iliği dahil), özellikle de beyin ve karaciğere ve lenf bezlerine uzak metastaz yapmaktadır. KHAK'li her 3 kişiden 2'sini oluşturan yaygın evre KHAK'lerinin, tedavisiz sağkalım ortalama 1-3 aydır. NCCN (National Comprehensive Cancer Network) ve ESMO (Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği) kılavuzlarında yaygın evre KHAK tedavisinde platin-etoposid kombine tedavisi standart kemoterapi rejimi olarak kabul edilmektedir. Ancak 5 yıllık sağkalım oranlarına bakıldığında sınırlı evre olgularında %10-13 iken, yaygın evre KHAK olgularında ise %1-2 kadar düştüğü gözlemlenmiştir (Tai 2003, Lally vd. 2007).

### **2.2.2 Akciğer Kanseri Evrelendirme**

Akciğer kanserinde evrelendirme; tümörün yayılımını göstermek, olası prognoz ve tedavi stratejilerini belirleyebilmek için oldukça önemlidir. Bu nedenle kanser anatomisinin tanımlanması ve evresinin belirlenmesi için Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) tarafından TNM Evreleme Sistemi olarak adlandırılan akciğer kanseri evreleme kılavuzu yayınlanmıştır. Bu sistem, primer tümör boyutu ve yayılımını (T), tümörün lenf düğümüne yayılmasını ve konumunu (N) ve metastaz varlığını veya yokluğunu (M) kullanarak kanserin evrelerini belirlemeye yardımcı olmaktadır (Goldstraw vd. 2016). Evre-0 in situ evre olarak değerlendirilirken, Evre-1 erken evre, evre-4 ise son evre olarak tanımlanmaktadır. Bu sistem Tablo 2' de ayrıntılı bir şekilde özetlenmiştir.

**Tablo 2.1.** Güncel TNM evreleme sistemi (Goldstraw vd. 2016).

<b>Evre</b>	<b>Primer Tümör</b>	<b>Nodül</b>	<b>Metastaz</b>
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T2a	N0	M0
<b>IIA</b>	T2b	N0	M0
<b>IIA</b>	T1	N1	M0
<b>IIA</b>	T2a	N1	M0
<b>IIB</b>	T1	N1	M0
<b>IIB</b>	T2b	N1	M0
<b>IIB</b>	T3	N0	M0
<b>IIIA</b>	T1	N2	M0
<b>IIIA</b>	T2	N2	M0
<b>IIIA</b>	T3	N1	M0
<b>IIIA</b>	T4	N0	M0
<b>IIIA</b>	T4	N1	M0
<b>IIIB</b>	T1	N3	M0
<b>IIIB</b>	T2	N3	M0
<b>IIIB</b>	Herhangi büyüklükte	N2-3	M0
<b>IV</b>	Herhangi büyüklükte	Herhangi tutulmuş	M1

### 2.2.3 Prognostik Faktörler

Tedavi öncesi prognostik faktörlerin bilinmesi sağkalım süresinin tahmin edilmesinde önemlidir. Hastalık prognozunun; performans skorunun kötü olması (örn; PS 2/4), cinsiyet, kilo kaybı, yaş, ırk, hastalığın aşırı yaygın oluşu, tümör kitlesinin büyüklüğünü gösteren belirteçlerin (örn; laktat dehidrogenaz (LDH)) yüksek olması, hiponatremi, alkalin fosfatazın yüksek olması ve metastaz sayısının artması bilinen en önemli kötü prognostik faktörleridir.



**Tablo 3.1.** Küçük hücreli akciğer kanserinde prognostik faktörler

Prognostik Faktörler	İyi Prognoz	Kötü Prognoz
<b>Performans Durumu (ECOG)</b>	0-1	2-4
<b>Vücut ağırlığı</b>	Değişmemiş	>%10 azalmış
<b>Cinsiyet</b>	Kadın	Erkek
<b>Yaş</b>	<70	>70
<b>İrk</b>	Beyaz	Siyah
<b>Evre</b>	Sınırlı	Yaygın
<b>Laktat Dehidrogenaz (LDH)</b>	Normal	Yüksek
<b>Serum Na<sup>+</sup> (sodyum)</b>	Normal	Düşük
<b>Albümin</b>	Normal	Düşük
<b>Metastaz sayısı</b>	1	>1

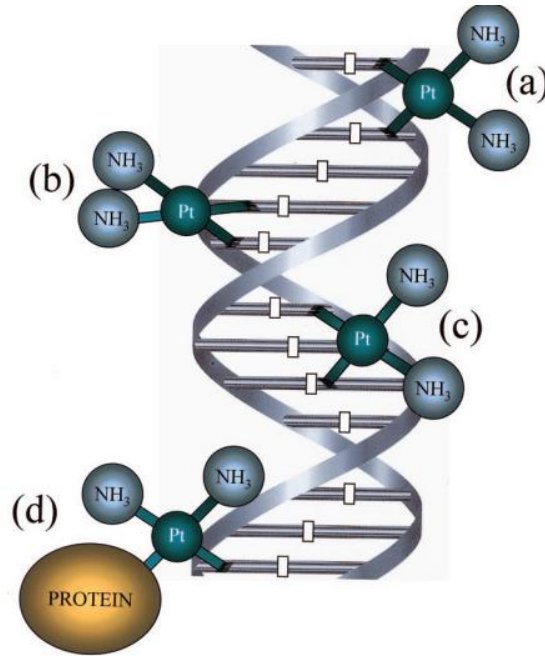
### 2.3 Küçük Hücreli Akciğer Kanserinde Tedavi Stratejileri

KHAK tedavisinde cerrahi, kemoterapi ve radyoterapisinin yanı sıra kombine kemoterapi uygulamaları kullanılmaktadır. Tedavide kullanılan standart kemoterapi sisplatin-etoposiddir. Son yıllarda kemoterapi, hedefe yönelik tedavi, immünoterapi, radyasyon tedavisi ve cerrahi tedavi en yaygın kullanılan seçeneklerdir (Mott 2018). Ancak heterojen tümör yapısı, gelişen ilaç direnci ve yan etkiler sebebi ile KHAK tedavinde oldukça az ilerleme kaydedilmiştir.

### 2.4 Sisplatin

Sisplatin ilk kez 1845 yılında Michele Peyrone tarafından keşfedilmiş olmasına rağmen biyolojik özellikleri 1965 yılında Dr. Barnett Rosenberg'in hücre bölünmesini inhibe edici özelliklerini keşfedilmesi ile ortaya çıkmıştır (Trimmer vd. 1999). Cis-diamindikloroplatin olarak bilinen sisplatin, kemoterapötik etkileri ile kanser araştırmalarında sıklıkla kullanılan cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] moleküler formülüne sahip platin

türevi bir ilaçtır. Oda sıcaklığında beyaz veya sarı-turuncu renklidir ve kristal bir yapıya sahiptir. Suda az çözünebilir veya dimetilprimanid ve *N,N*- dimetilformamid'de çözünebilir (Dasari ve Tchounwou 2015).

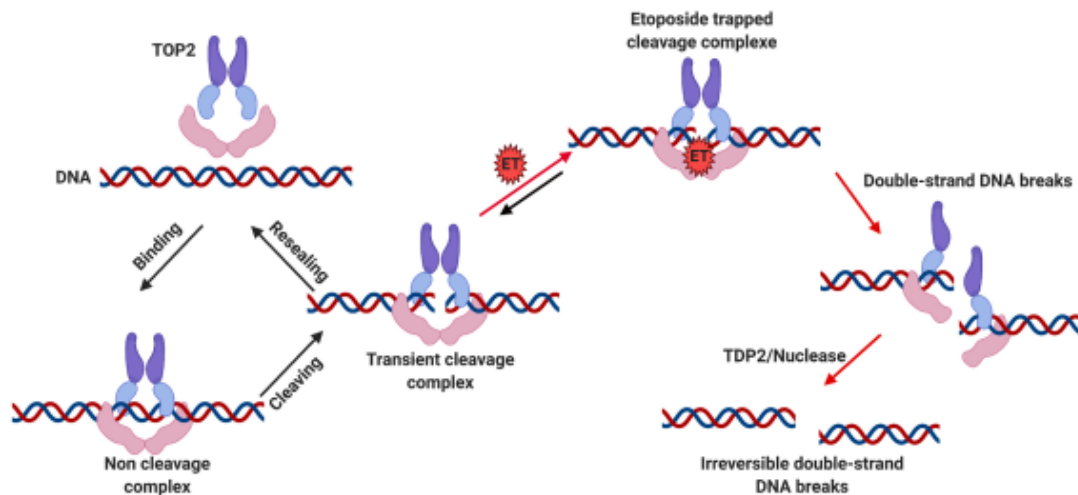


**Şekil 1.1** Sisplatinin DNA ile etkileşimi. (a) gruplar arası çapraz bağ, (b) 1,2-intrastrand çapraz-bağ. (c) 1,3 intrastrand çapraz bağ. (d), protein-DNA çapraz bağ (Gonzalez ve diğerleri, 2001).

Kanser hücrelerinde sisplatin, pürin bazlarıyla kovalent bağlar yaparak DNA'ya çapraz bağlanır ve DNA'nın tamir mekanizmasına etki ederek hücrelerde apoptozu indükler (Green 2014). Akciğer, meme, testis, yumurtalık, baş-boyun, pankreas, mesane, yemek borusu, rahim ağzı kanseri, mide, lenfoma, melanom gibi birçok kanserin tedavisinde tek başına veya diğer kemoterapötik ajanlarla birlikte hatta radyoterapi ile kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Tedavide önemli oranda iyileşme sağlanmasına rağmen gelişen ilaç direnci ve/veya önemli yan etkiler nedeniyle sisplatin tedavisinin başarı oranı olumsuz etkilenmektedir. Bu nedenle sisplatin, kombine tedavilerde yaygın olarak kullanılmaktadır.

## 2.5 Etoposid

Etoposid, ticari adı Vepesid (V16), topoizomeraz II enzimine doğrudan bağlanarak topoizomeraz II'yi inhibe eder. DNA'da meydana gelen çift zincir kırıklarının yeniden bağlanmasını önler. Etoposid mitozu inhibe eder ve S fazında veya G2 fazında hücre bölünmesini durdurur (Zhao vd. 2020). Ayrıca kaspaz aracılı apoptozu tetikler (Wang vd. 2006). Etoposid; akciğer kanseri, meme, yumurtalık, testis, beyin, lenfoma, lösemi gibi birçok kanserin tedavisinde kullanılan önemli bir ilaçtır. Çoğu antikanser ilacı gibi etoposid tedavisi de sınırlı aktiviteye sahiptir. Bu nedenle kombine kemoterapilerde sisplatin, karboplatin ve siklofosfamid gibi ilaçlar ile birlikte kullanılmaktadır.



**Şekil 2.1** Topoizomeraz II'ye bağlanan etoposid etki mekanizması (Zhang vd. 2021).

## 2.6 Küçük Hücreli Akciğer Kanseri Tedavisinde Sisplatin-Etoposid Kombinasyonunun Rolü

Sisplatin-etoposid kombinasyon kemoterapisi, 1980'lerin başından günümüze kadar birçok kanserin tedavisinde kullanılmıştır. Platin (sisplatin veya karboplatin) ve etoposid ile kombinasyon kemoterapisi, KHAK tedavisinde en yaygın kullanılan rejimlerden biridir (Loehrer vd. 1988). Sisplatin-etoposid'in KHAK'de kombinasyon kemoterapisine yanıt oranları yüksektir, ancak hastaların çoğu, direnç geliştirir ve hastalık nükseder.

## 2.7 Ekstraselüler Veziküller (EV)

Ekstraselüler veziküller (EV), ilk olarak 1967 yılında Peter Wolf tarafından gözlemlenmiştir (Wolf 1967). Bu veziküller yıllar içerisinde farklı isimlerde adlandırılrsa da günümüzde “ekstraselüler veziküller” olarak adlandırılmaktadır (Kalluri ve LeBleu 2020). EV'ler tüm hücre tipleri tarafından salınan ve tüm biyolojik sıvılarda bulunan fosfolipit çift katmanlı veziküllerdir. EV'ler, genel olarak mikroveziküller (MV'ler), eksozomlar ve apoptotik cisimler olmak üzere üç gruba ayrılırken, biyolojik işlevlerine, biyogenez yollarına, boyutlarına ve içeriğine göre; mikroveziküller (MV'ler) ve eksozomlar olmak üzere iki ana alt tipe ayrılır (Kalluri ve LeBleu 2020, Wiklander vd. 2015).

## 2.8 Eksozomlar

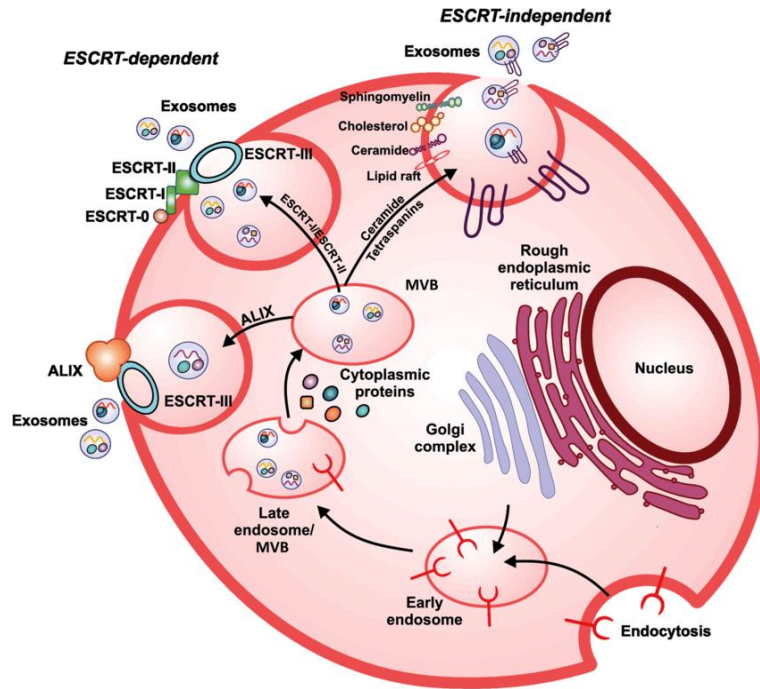
Eksozomlar, çapları ~30-150 nm arasında değişen endozomal kökenli ve nano boyutlu veziküllerdir (Kalluri and LeBleu 2020). Eksozomlar; nükleik asitler (DNA, mRNA, mikroRNA (miRNA), lncRNA, circRNA, vb.), proteinler ((tetraspanin ailesi (CD9, CD63, CD81 ve CD82), taşıma proteinleri (Alix, TSG101), ısı şok proteinleri (HSP60, HSP70, HSP90 vb.)), enzimler (GAPDH, ATPase, pgk1) ve lipitler (sfingomiyelin, kolesterol ve seramidler vb.) gibi çok sayıda bileşen içermektedir. Eksozom veritabanının (<http://www.exocarta.org>) en son güncelleme listelerine göre eksozomlar; 9769 protein, 3408 mRNA, 2838 miRNA ve 1116 lipid'ten oluşmaktadır.

### 2.8.1 Eksozom Biyogenezi

Eksozomlar, multiveziküler gövde (MVB) zarının içe doğru tomurcuklanmasıyla oluşan geç endozomlardan üretilir. Geç endozomal membranların içe doğru tomurcuklanması, MVB'lerde intralüminal veziküllerin (ILV'ler) oluşumuyla sonuçlanır (Minciacchi vd. 2015). Bu işlem sırasında, sitosolik bileşenler ILV'ler tarafından yutulur ve ILV'ler içine kapatılırken, bazı proteinler invajinasyon membranına dâhil edilir. ILV'ler, plazma membranı ile füzyonu sonucu olarak “eksozom” olarak adlandırılır ve ekstraselüler boşluğa salınır (Sahu vd. 2011, Record 2014).

Endozomal sıralama taşıma kompleksi (ESCRT), ILV'lerin oluşumunda taşıma işlevi için gereklidir. Eksozomların biyogenezi, ESCRT bağımlı yol ve ESCRT'den bağımsız

yol olmak üzere iki farklı mekanizma ile meydana gelebilir. ESCRT'ye bağlı mekanizmada; MVB oluşumunu, vezikül tomurcuklanmasını ve protein kargo sınıflandırmasını kolaylaştırmak için, ESCRT-0, -I, -II ve -III olarak adlandırılan dört farklı proteinden oluşan karmaşık bir mekanizma söz konusudur. Bu kompleks yaklaşık otuz proteinden oluşmaktadır (Zhang vd. 2019).

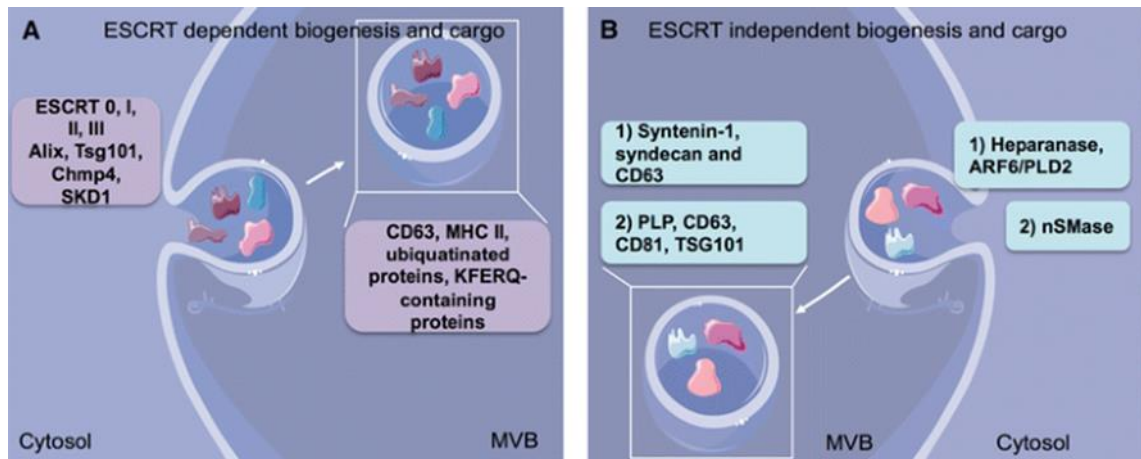


**Şekil 3.1.** Eksozom biyogenez ve salgı mekanizmaları (Jadli vd.2020).

ESCRT-0, ubiquitinlenmiş proteinlerin ubiquitin bağlayıcı alt birimleri tarafından endozomal zarın belirli alanlarının tanınmasını sağlar (Raiborg and Stenmark 2009). ESCRT-I ve -II kompleksleri daha sonra tomurcuklanma süreçlerini desteklemek için Alix ve Tsg101 ile etkileşime giren bir protein kompleksi olan ESCRT-III ile birleşir (Babst et al. 2002; Henne et al. 2013). Son olarak, ILV'leri oluşturmak üzere tomurcukların bölünmesinin ardından, ESCRT-III kompleksi, ayırma proteini vakuolar protein ayırma ile ilişkili protein 4 (Vps4) tarafından sağlanan enerji ile MVB zarından ayrılır. Çeşitli hücre tiplerinden izole edilen eksozomlarda farklı ESCRT bileşenleri ve ubiquitine proteinler tanımlanmıştır. Bu durum, çeşitli çalışmalarda, eksozom oluşumu ve salınım için ESCRT'ye bağlı mekanizmanın önemli olduğunu doğrulamıştır (Metcalf ve Isaacs 2010, Kowal vd. 2014).

ESCRT'den bağımsız mekanizmada, MVB ayrılması, eksozomal kargonun endozomal membran içinde lateral olarak ayrılması mikro alanlara bağlıdır ve bu alanlar,

sfingomyelini seramide hidrolize eden nötr tip II sfingomyelinaz tarafından seramid üretimini gerektirir. Seramid daha sonra, membran üzerinde kendiliğinden bir negatif eğrilik sağlayarak içe doğru tomurcuklanmayı teşvik eder ve ILV oluşumuna yol açar. Eksozomlar, zengin seramid içeriğine sahiptir. Sonuç olarak, seramide bağımlı bu mekanizma, eksozom biyogenezinde eksozomal lipidlerin anahtar rolünü vurgulamaktadır (Zhang vd. 2019).



**Şekil 3.2** ESCRT'ye bağımlı ve bağımsız MVB biyogenezini (Abels and Breakefield,2016).

Tetraspaninler, (CD63, CD81, CD82 ve CD9) çeşitli yüklerin eksozomlara ayrılmasında doğrudan yer alır (Buschow vd. 2009, Chairoungdua vd. 2010). Bu tetraspaninler, farklı transmembran ve sitosolik proteinler ile kümeler oluşturarak, mikro bölgelerin (TEM) oluşumunda rol oynarlar. Mikro bölgeler, plazma zarındaki reseptörlerin ve sinyal proteinlerinin bölünmesi için her yerde bulunan özelleşmiş membranlardır. Ayrıca, tetraspanin CD81 ile birlikte zenginleştirildikleri mikro bölgelerin içe doğru tomurcuklanmasına neden olurlar (Zhang vd. 2019). Sonuç olarak hem ESCRT'ye bağımlı hem de ESCRT'den bağımsız mekanizmaların eksozom biyogenezinde rol oynadığı ve kargo içeriklerinin hücre tipine bağlı olarak değişebileceği görülmektedir. Ayrıca, eksozomların salgılanmasında Rab proteinleri, GTPaz aktivitesini kullanılarak vezikül tomurcuklanması, yerleştirme ve membran füzyonu gibi hücre içi veziküler trafiğinin düzenlenmesinde yer almaktadır.

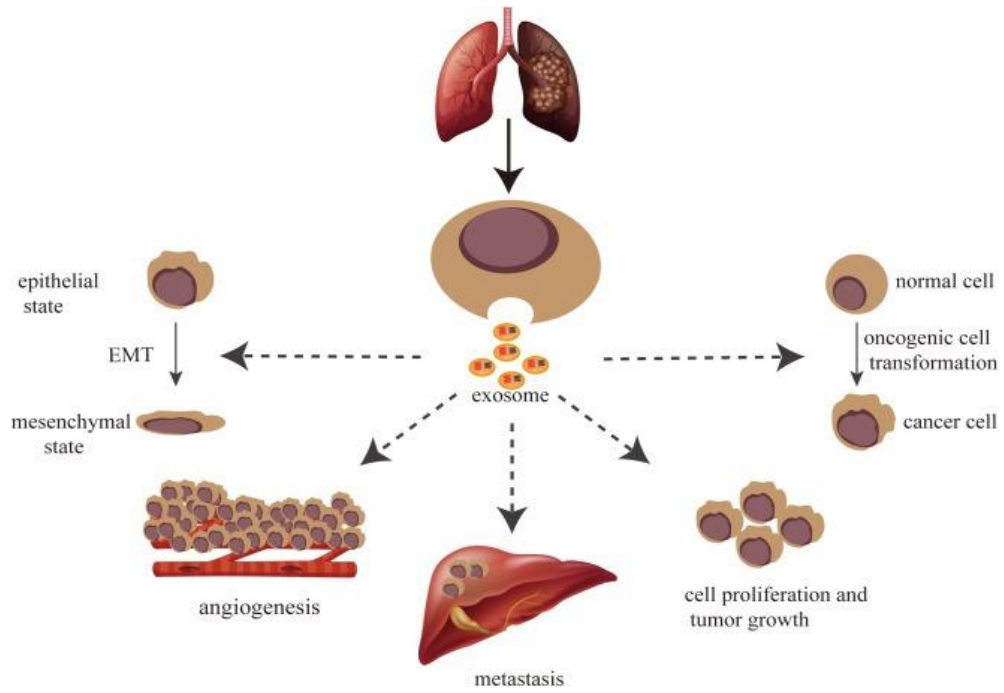
### 2.8.2 Eksozom Aracılı Hücreler Arası İletişim

Hücreler arasında sinyal iletimini kolaylaştırmak için eksozomlar, hormonlar ve sitokinler gibi salgılanan çözünen faktörler yoluyla hedef hücelere proteinler, lipidler ve düzenleyici RNA'lar dahil olmak üzere intraluminal EV yükünü aktarırlar (Zhang vd. 2019). Eksozomlar, reseptör ligand etkileşimleri, alıcı proteinlerin plazma zarı ile doğrudan füzyonu veya endositoz yoluyla elde edilebilen genetik materyallerin etkili bir şekilde iletilmesi gibi çeşitli mekanizmalar ile hücreler arası iletişime aracılık ederler. Son yıllarda, bu özelliklerinden yararlanılarak eksozomlar birçok kanser türünün tedavisinde umut vaat etmeye başlamıştır.

### 2.9 Akciğer Kanserinde Eksozomlar

Kanser hücreleri tarafından salgılanan eksozomlar, mutant onko-proteinler, onkojenik transkriptler, mikroRNA ve DNA dizileri taşıyarak tümör büyümesini indükleyebilirler ve kanser mikroçevresini değiştirebilirler. Böylece eksozomlar, tümör proliferasyonunda, epitelyal-mezenkimal geçişte (EMT), tümör migrasyonu ve metastazında, immünsüpresyon ve anjiyogenezde önemli bir rol oynar.

Cazzoli ve ark. akciğer kanseri hastalarının plazmasından alınan eksozomlardaki miRNA'yı tanımladı ve akciğer adenomakarsinomlarını ve karsinomlarını eski sigara içenlerden ayırt etmek için yararlı olan dört miRNA, miR-378a, miR-379, miR-139 5p ve miR-200b-5p buldu (Cazzoli et. al., 2013). Rabinowits ve ark. miR 17-3p, miR-21, miR-106a, miR-146, miR-155, miR 191, miR-192, miR203, miR-205, miR-210, miR 212 ve miR-214 oluşan 12 ekzozomal miRNA'nın kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, akciğer kanseri hastalarının plazmasında farklı şekilde eksprese edildiğini tespit etti (Rabinowits vd. 2009). Bu da eksozomların, sıvı biyopsilerde potansiyel biyobelirteçler olarak değerlendirilebileceğini doğruluyor (Yanaihara vd. 2006).



**Şekil 3.3** Akciğer kanseri ilerlemesinde eksozomların rolü.

Çok sayıda çalışma da belirtildiği gibi, akciğer kanseri hücrelerinden salınan eksozomlar, akciğer kanserinin erken teşhisi, prognozu ve tedavi yanıtını gözlemlemek için biyobelirteç olmuştur. Bu nedenle eksozomlar, eksozomal kargo içeriklerinden yararlanarak çeşitli terapötik ajanların geliştirilmesinin temellerini atmıştır.

### 2.10 Eksozom salınımında RAB27A Önemi

GTPazların Rab süper ailesindeki en bol protein ailesi olan Rab27 alt ailesinin, Rab27A ve Rab27B olmak üzere iki farklı izoformu bulunur. İnsan genomunda Rab ailesinin 70'den fazla üyesi tanımlanmıştır. Rab27A, vezikül tomurcuklanması, veziküllerin hücre iskeleti boyunca taşınması ve ayrıca hedef bölgeye membran füzyonu dahil olmak üzere hücre içi vezikül taşınmasında önemli bir rol oynamaktadır. Rab27A hem ESCRT'ye bağımlı hem de ESCRT'den bağımsız mekanizmalarda eksozom salınımının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Rab27a'nın eksozom salınımı üzerindeki etkisi, farklı kanser türlerine ait farklı hücre hatları kullanılarak yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir (Peinado vd. 2012, Hoshino vd. 2013, Bobrie vd. 2012, Webber vd. 2015).

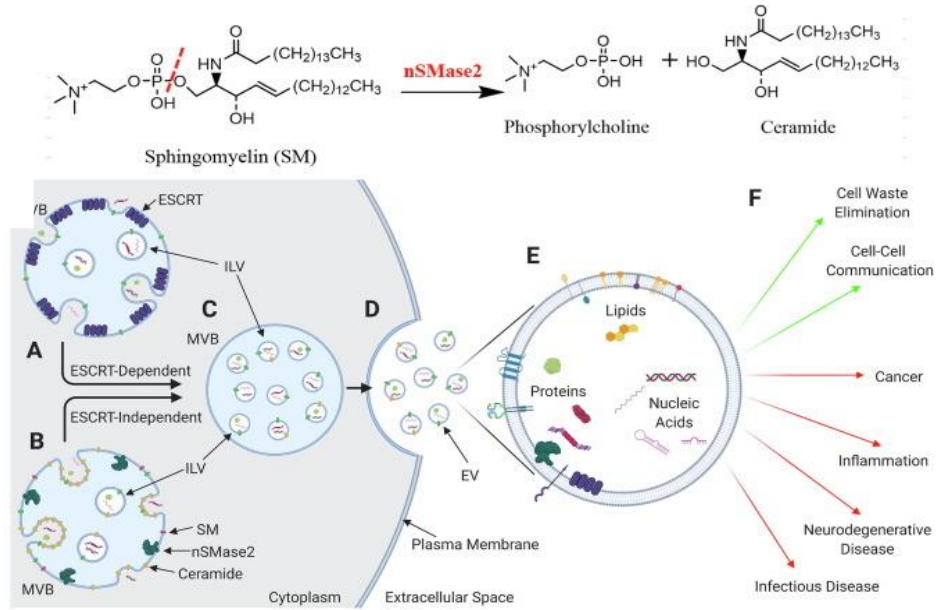


### 2.10.1 RAB27A'nın Kanser Progresyonundaki Rolü

Rab27a, kanser ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Rab27A'nın, hücre proliferasyonunu teşvik ettiği, hücre invazyonunu ve kemorezistansı arttırdığı belirlenmiştir. Rab27A'nın onkojenik işlevi, eksozom salgısını düzenlemesinden kaynaklanmaktadır. Örneğin, Rab27A proteininin aşırı ifadesi, hücre döngüsünü ve proliferasyonunu etkileyen, kanser hücrelerinin invaziv ve metastatik potansiyeli ile ilişkilendirilmiştir (Hendrix ve Wever 2013; J.S. Wang vd. 2008). Meme kanseri hücrelerinde RAB27A'nın susturulması, eksozomların salgılanmasının azalmasına ve daha yavaş tümör büyümesine ve yayılmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Bobrie vd. 2012). Akavia ve ark. shRNA transfeksiyonu ile Rab27A baskılanmasının melanom hücre hatlarında (WM1385 ve WM1960) hücre büyümesini azalttığını belirlemiştir (Akavia vd. 2010). Literatürde yapılan çalışmalardan yola çıkarak, Rab27A'nın baskılanmasının, kanser progresyonuna olan etkisi araştıran, Rab27A'yı doğrudan hedef alan inhibitörler geliştirilmelidir.

### 2.11 Nötr Sfingomiyelinaz (nSMase 2) Aracılı Eksozom Salınımı

Eksozomlar, nötr sfingomiyelinaz 2'yi (SMPD3 tarafından kodlanan nSMase2) içeren ESCRT'den bağımsız yollar tarafından salgılanabilir. nSMase2 esas olarak Golgi ve plazma zarına lokalizedir (Catalano and O'Driscoll, 2019). nSMase2, sfingomyelin seramid ve fosforilkoline hidrolize eder ve asit, alkalın veya nötr pH optimumuna sahiptir. SMPD3 en çok çalışılan nötr SMaz'dır (nSMase) ve fosfatidilserin (PS) ve fosfatidik asit (PA) gibi anyonik fosfolipitler tarafından aktive edilen 71 kDa'lık zarla ilişkili bir enzimdir. Eksozomlar seramid açısından oldukça zengindir. Seramid, proliferasyon, apoptoz, farklılaşma ve enflamasyon gibi birçok biyolojik fonksiyonda yer alan biyoaktif bir sfingolipiddir.



**Şekil 3.4** Eksozom salınımında nSMase2'nin rolü (Tallon vd. 2021).

### 2.11.1 nSMase2'nin Kanserdeki Rolü

Sfingolipidlerin kanserdeki rolü son zamanlarda dikkatleri üzerine çeken bir konudur. nSMase2, seramid üretimini hızlandırarak, çeşitli kanserlerin proliferasyonun ve kemorezistansını inhibe ederken, apoptoz, farklılaşma ve enflamasyonu indükler (Ghandour vd. 2021). Ayrıca, farklı kargoların eksozom salınımına aracılık eden nSMase2-seramid yolu birçok kanserin ilerlemesini teşvik eder (Singh vd. 2014, Poggio vd. 2019, Madeo vd. 2018). Bu nedenle, nSMase2/seramid yolunu doğrudan hedef alan inhibitörlerin geliştirilmesi, karsinogenezi düzenlemede fonksiyonel bir rol oynayabileceğini düşündürmüştür. İn vitro ve in vivo çalışmalarda, nSMase'lerin GW4869 adı verilen inhibitör yardımı ile inhibe edilebileceği ortaya çıkmıştır.

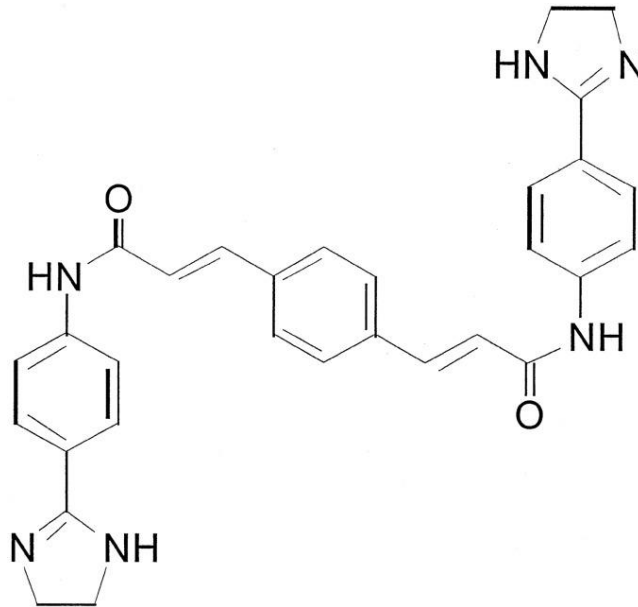
### 2.12 Kanserde Terapötik Hedefler Olarak Eksozomlar

Eksozomlar, kanser hücreleri tarafından salgılanarak ya da hücreler arası iletişim yoluyla alıcı hücreler tarafından alınarak patolojik süreçte rol oynamaktadır. Bu nedenle eksozom oluşumunun ve salınımının inhibe edilmesinin veya alıcı hücre tarafından eksozom alımının bloke edilmesinin, tümör oluşumunu ve kanser metastazını inhibe etmede önemli olabileceği düşünülmüştür.

Eksozomları terapötik olarak hedeflemek için üç ana yaklaşım araştırılmaktadır: (1) nötr sfingomiyelinaz (nSMase 2) yolunu hedefleyerek eksozom salınımını inhibe etmek, (2) ESCRT mekanizmasının bileşenlerini hedefleyerek eksozom salınımını engellemek ve (3) alıcı hücreler tarafından patolojik eksozomların alınımının engellenmesi. Bununla birlikte, patojenik eksozomları spesifik olarak hedefleyen bileşiklerin ve yaklaşımların belirlenmesi önem teşkil etmektedir.

### 2.13 GW4869

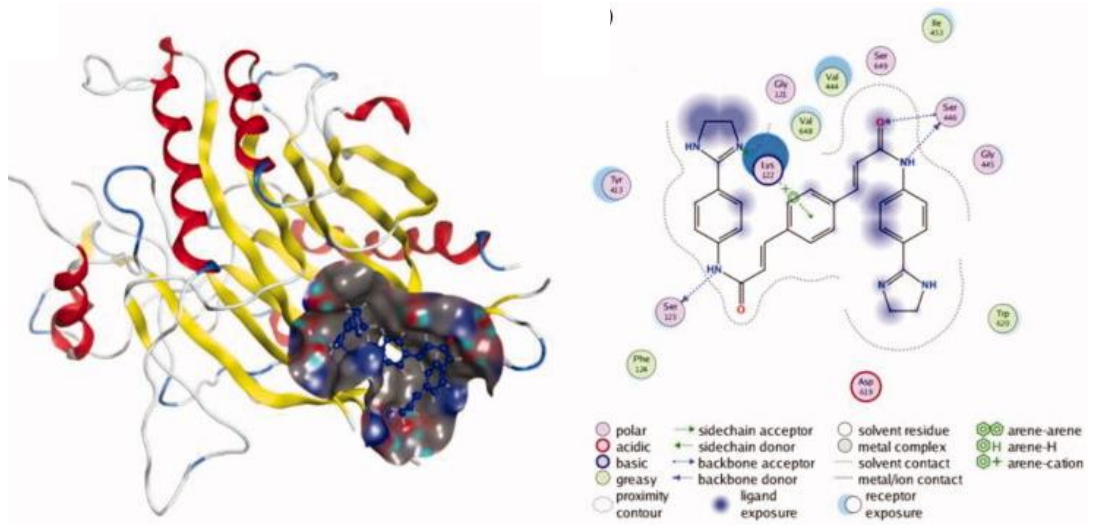
GW4869 ( $C_{30}H_{30}Cl_2N_6O_2$ ), güçlü ve spesifik bir membran nötr sfingomiyelinaz (nSMase) inhibitörüdür (Catalano and O'Driscoll, 2019). GW4869, üç benzen halkası ve iki diazol grubuna sahip, hücre geçirgen, simetrik bir dihidroimidazolo-amid bileşiğidir. nSMase, lipid sfingomyelinin hidrolizi ile biyoaktif seramid üreten her yerde bulunan bir enzimdir (Zhang vd. 2020). Sfingomyelini (SM) fosfokolin ve seramide ayırmaktan sorumludurlar (Catalano and O'Driscoll, 2019). GW4869, eksozom üretimini bloke etmek ve eksozom salınımını azaltmak için en yaygın kullanılan farmakolojik ajandır.



**Şekil 4.1.** GW4869 yapısı (Luberto vd. 2002).

nSMase'in inhibe edilmesi, salınan eksozom miktarını azaltır (Zhang vd. 2020). Bu nedenle nSMase, eksozom salınımının inhibisyonu için potansiyel bir terapötik hedefdir.

Eksozomlar tümör ilerlemesinde rol oynadığından, eksozom önleyici maddeler olarak nSMase inhibitörlerini geliştirmek için birçok çaba sarf edilmiştir.



**Şekil 4.2** GW4869 ve nSMase arasındaki etkileşimler (Zhanga vd. 2020).

### 2.13.1 Kanserde GW4869

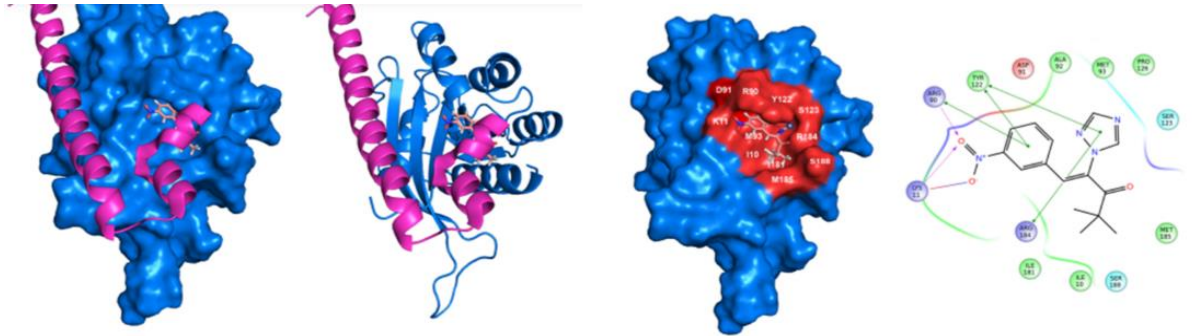
nSMase2'nin inhibe edilmesi, meme tümörlerinde, eksozom salınımına aracılık edebilir ve anjiyogenezi ve metastazı azaltır (Kosaka vd. 2013). Seramid yolu, insan multiple miyelom hücrelerinin in vitro hayatta kalma, apoptoz ve eksozom fonksiyonlarında rol oynar (Cheng vd. 2017). Ek olarak, nSMase inhibisyonunun, intralüminal veziküllerin (ILV) seramide bağımlı tomurcuklanmasını MVB'lerin lümenine bloke ederek eksozom salınımını azalttığı gösterilmiştir (Trajkovic vd. 2008).

Sisplatine dirençli mide kanseri hücreleri, eksozomal miR-769-5p'yi GW4869 ile hedeflemenin, sisplatin direncini azalttığı ve hücreleri apoptoza sürüklediği belirlendi (Jing vd. 2022). Eksozomal miR-19b'nin GW4869 tarafından salgılanmasının baskılanması, kolorektal kanserde oksaliptatin duyarlılığını düzenleyebildiği ortaya çıkarıldı. Ayrıca eksozom sekresyonunun GW4869 tarafından inhibisyonu, sisplatin ve gefitinib birlikte uygulandığında bir sinerjistik etki ile sonuçlandığını ortaya koymuştur (Xiao-Qiu vd. 2016). Yapılan çalışmalardan yola çıkarak, eksozom salınımının inhibisyonunun, çeşitli kemoterapötik ajanlar ile birlikte uygulanmasının birçok kanserin tedavisinde yararlı bir strateji olabileceğini düşündürmektedir.

## 2.14 Nexinhib20

Ras ile ilgili protein RAB27A, insanda RAB27A geni tarafından kodlanan bir proteindir. Bu protein, GTPaz üst ailesi olan RAB ailesine aittir. RAB27A, zara bağlıdır ve protein taşınması, GTPaz aracılı sinyal iletimi ve eksozom üretimi veya salgılanmasında önemli bir rol oynar. RAB proteinlerinin (RAB27A ve RAB27B) yıkılmasının, eksozom salgılanmasını inhibe ettiği belirlenmiştir (Zhang vd. 2020). Son zamanlarda, tümörjenezde eksozom salınımının rolleri nedeniyle, kanser hücreleri tarafından salınan eksozomların salınımını inhibe etmek için RAB27A'nın işlevine müdahale edebilen yeni bileşikler keşfedilmesi için çaba gösterilmiştir.

2016 yılında Jennifer ve ark. RAB27A ve JFC1 (sinaptotagmin benzeri protein1, Slp1) arasındaki etkileşime müdahale ederek insan nötrofillerinde eksozom salınımını engelleyebilen birkaç bileşik keşfetmiştir (Johnson vd. 2016). Bu çalışmada Nexinhib20'nin, RAB27A-JFC1 kompleksine karşı etkin olduğu kanıtlanmıştır. Nexinhib20 aromatik kısma ve nitril kısma sahiptir ve triazol bazlıdır. Ayrıca, Nexinhib20'nin aktivitesinin keşfedilen diğer bileşiklerden 4 kat daha aktif olduğu belirlenmiştir (Johnson vd. 2016).



**Şekil 5.1.** Nexinhib20'nin RAB27A-JFC1 mekanizması (Zhang vd. 2020).

Nexinhib20'nin eksozom salınımını inhibe eden potansiyel mekanizması, RAB27A ceplerindeki Tyr122 kalıntısının, Nexinhib20 ile pi-pi etkileşimlerine aracılık edebilmesidir. Bu şekilde, Tyr-122'nin nokta mutasyonu, Slp1'e (JFC1) oldukça benzer bir Rab bağlama alanı içeren Rab27a ve Slp2a arasındaki kompleksi bozar. Böylece,

Nexinhib20, RAB27A'nın işlevine müdahale edebilir ve eksozom salınımını engelleyebilir (Johnson vd. 2016).

### **2.15 Hipotez**

Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) hücre hatlarında eksozom salınımını baskılanması kanser progresyonunu etkiler ve eksozom salınımının GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri ile baskılanması mevcut tedaviye alternatif ya da destek bir tedavi stratejisidir. GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin hedef aldığı RAB27A ve nSMase genleri kanser tedavisinde terapötik bir hedefdir.

### 3 GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1 Gereçler

**Tablo 4.1.** Çalışmada kullanılan Cihazlar

Cihaz	Marka/Model
Florasın Özellikli Mikroskop	Olympus CKX-41
Florasın, Absorbans ve Luminometrik Ölçüm Cihazı	Promega Glomax
Real Time PCR Cihazı	BIO-RAD
Termal Cyclus PCR Cihazı	Sensequest
NanoDrop2000c	Thermo
Hücre Sayım Cihazı	Cell countess Thermo

**Tablo 4.2.** Çalışmada kullanılan kitleler

KİT	FİRMA
Cell Proliferation (MTT) Kiti (11465007001)	Roche
miRCURY Exosome Cell/Urine/CSF Kit (LOT:172021644)	Qiagen
EXOCET Exosome Quantitation Assay (Cat#EXOCET96A-1)	System-bio
In Situ Cell Death Detection Kit, AP (REF: 11684809910)	Roche
cDNA Revers Transkripsiyon Kiti	Thermo
QuantiTect SYBR Green PCR Kits	Qiagen

**Tablo 4.3.** Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanılan primerler

<b>Oligonükleotit Adı</b>	<b>Baz Dizisi (5'-3')</b>
Beta Aktin Forward	5'-CGCGAGAAGATGACCCAGGA-3'
Beta Aktin Reverse	5'-GATAGCACAGCCTGGATAGCAAC-3'
CDK-6 Forward	5'-TTGTGACAGACATCGACGAG-3'
CDK-6 Reverse	5'-GACAGGTGAGAATGCAGGTT-3'
Cylin-D1 Forward	5'-CAGACCAGCCTAACAGATTTTC-3'
Cylin-D1 Reverse	5'-TGACCCACAGCAGAAGAAG-3'
CD9 Forward	5'-GGGGGCGTGGAACAGTTTAT-3'
CD9 Reverse	5'-GCGCCGATGATGTGGAATTT-3'
CD63 Forward	5'- ATGATCACGTTTGCCATCTT-3'
CD63 Reverse	5'-AGGGATTTTCTCCAATCTG-3'
TSG101 Forward	5'-CTCTCATCTCTGCGGTCAGT-3'
TSG101 Reverse	5'-TCAACCTCGGCTACTTCTTG-3'
RAB27A Forward	5'-GTTGATGGAGCGAACTGCTT-3'
RAB27A Reverse	5'-CTACGAAACCTCTCCTGCC-3'

**Tablo 4.4.** Deneyde kullanılan inhibitörler

<b>Kullanılan İnhibitörler/İlaçlar</b>	<b>Temin Edilen Firma</b>
Sisplatin	Cayman (13119)
Etoposid	Adooq Bioscience (A10373)
Nexinhib20	Sigma (1919-5mg)
GW4869	Adooq Bioscience (A11974)



## **3.2 Yöntemler**

### **3.2.1 Hücre Kültürü**

H524 hücreleri, TÜBİTAK 220S104 numaralı projeden temin edilmiştir. Süspanse hücre dizisidir. c-MYC amplifikasyonu bulunur. Sınırlı evre (limited stage) küçük hücreli akciğer kanseri hücresidir. H524 hücreleri, ısı ile inaktive edilmiş %10 Fetal Sığır Serum (FBS, Gibco, Amerika) ve %1 Penisilin/Streptomisin (10000U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin, Gibco) ile desteklenmiş RPMI 1640 (SEROX) besiyeri ortamında, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava içeren 37°C'deki inkübatörde kültürlenerek çoğaltıldı.

N417 hücreleri, TÜBİTAK 220S104 numaralı proje hücrelerinden temin edilmiştir. Süspanse hücre dizisidir. c-MYC amplifikasyonu bulunur. Yaygın evre akciğer kanseri hücresidir. N417 hücreleri, ısı ile inaktive edilmiş %10 Fetal Sığır Serum (FBS, Gibco, Amerika), ve %1 Penisilin/Streptomisin solüsyonu (Gibco) eklenmiş RPMI 1640 (SEROX) besiyerinde %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C ortamda kültüre edildi.

#### **3.2.1.1 Hücre Dondurma Prosedürü**

Hücreler, 15 ml'lik falkonlara alınarak 125xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra falkon içerisine dondurmak amacı ile %10 dimetilsülfoksit (DMSO, Bioshop) içeren RPMI 1640 besiyeri eklendi. Daha sonra pelet, pipetaj yapılarak homojen hale getirilerek hücre kültüründe kullanılan özel cryo tüplere aktarıldı. Dondurulan hücreler -80°C'de muhafaza edildi.

### 3.2.1.2 Hücreleri Çözme

–80°C'den alınan cryo tüpler 50 ml'lik falkona koyularak 37 °C'deki su banyosu içerisinde çözüldü. Çözünen hücreler sonra 15 ml'lik falkon içerisine alınıp üzerlerine 5 ml besiyeri eklendi. Ardından hücreler 125xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atıldı. Kalan pellet üzerine besiyeri eklenip hücreler homojen hale getirildi. Hücreler, T25 flasklara alınarak kültüre edildi.

### 3.2.1.3 Hücre Ekimi

Hücrelerin her biri pipet yardımı ile 15 ml'lik falkonlara koyularak 125xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra pelet RPMI 1640 besiyeri ile çözüldü. Daha sonra hücre, pipet yardımıyla yavaşça homojen hale getirildi. Bir ependorf içerisine 50 µl tripan mavisini eklendi ve üzerine 50 µl hücre eklenerek homojen hale getirildi. (1:1 oranında) Karışım thoma lamı üzerine koyularak lam üzerindeki canlı hücreler sayıldı. Hücreler 10.000 sabit sayısı ile çarpılarak hesaplandı. Her kuyuda istenen miktarda hücre olacak şekilde hücreler ekilir ve üzeri besiyeri ile tamamlanır.

$$\frac{\text{Toplam hücre sayısı}}{\text{Sayılan Alan}} \times 2 \times 10.000 \times 2$$

Dilüsyon Faktörü

Çözücü miktarı (ml)

Sabit sayı

### 3.2.2 Deneyde Kullanılacak İnhibitörlerin Çözülmesi

Sisplatin (Cayman), 300.1g/mol moleküler ağırlığına sahip toz halinde bir bileşiktir. Ana stoğun hazırlanması için 10,9 gram sisplatin tartılarak 1 ml distile su ile çözüldü. Daha sonra ana stok 1/10 ve 1/2 oranında dilüe edilerek ara stoklar hazırlandı.

Etoposid (Adooq Bioscience), 588.6 g/mol moleküler ağırlığına sahip bir bileşiktir. 1 mM ana stok için 5 mg etoposid tartılıp 8,49 ml DMSO'da çözüldü. Daha sonra ana stok 1/10 oranında seyreltilerek ara stok hazırlandı.

GW4869 (Adooq Bioscience) ise, 577,5 g/mol moleküler ağırlığa inhibitördür. 1 mM stok hazırlamak için 1mg GW4869 tartılarak 2 ml DMSO'da çözüldü. Oluşan ana stok 1/10 oranında seyreltilerek ara stok hazırlandı.

Nexinhib20 (Sigma) 300.31 g/mol'dür. Ana stok için 2 mg tartılıp 100 µl DMSO çözeltisinde çözüldü. Ara stokların hepsi 1/10 oranlarında RPMI 1640 besiyeri yardımı ile seyreltilir. İnhibitörlerin stokları taze hazırlanarak kullanılır.

### 3.2.3 Sitotoksisite ve Proliferasyon

Çalışmaya başlamadan önce kullanılacak inhibitörler/ilaçlar, kataloglarında belirtilen çözücü reaktifleri ile kataloglarında belirlenen konsantrasyonlarda çözüldü. Literatürdeki in vitro çalışmalara dayanarak çeşitli konsantrasyonlarda ilaç/inhibitör dozları belirlendi. Bu deney uygulanan inhibitörlerin hücresel proliferasyon, canlılık ve sitotoksisite miktarını belirler ve canlı hücreleri analiz eder.

- H524 ve N417 hücreleri, RPMI 1640 besiyeri ile  $1 \times 10^4$  hücre/ml olacak şekilde iki ayrı 96 well plate ekildi.
- Ertesi gün H524 ve N417 hücrelerine belirlenen konsantrasyonlarda sırası ile sisplatin ve etoposid ilaçları, GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri uygulandı. Ardından 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava içeren ortamda 0-48 saat inkübe edildi.
- 48 saat sonra her kuyuya Roche Cell Proliferation (MTT) Kiti (11465007001) içerisindeki ilk reagentten 10µl eklendi. Daha sonra 4 saat 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava içeren inkübatörde inkübe edildi. Sonra ikinci solüsyondan 100µl eklenerek gece boyunca (overnight) inkübe edildi.
- Daha sonra Glomax Multi Detection System (Promega) cihazı ile 560 nm aralığında ölçüm yapıldı. Daha sonra ölçüm sonuçlarına bağlı olarak her ilacın IC50 değerleri belirlendi.

#### 3.2.3.1 Proliferasyon

N417 ve H524 hücre hatları  $1 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde 24 well-platelere ekildi. Ertesi gün belirlenen IC50 değerlerine göre uygulanacak konsantrasyonlar belirlendi ve hücrelere belirlenen konsantrasyonlarda inhibitörler uygulandı. (Sırasıyla sisplatin, etoposid, GW4869, Nexinhib20 ve sisplatin-etoposid tedavisine ek olarak

sisplatin+etoposid+GW4869 ve sislpatin+etoposid+Nexinhib20) 48 saat inkübasyona bırakıldı. 48 saat sonunda her kuyudaki hücreler thoma lamı ile sayılarak hücrelerin proliferasyonu analiz edildi.

### 3.2.4 Eksozomların Toplanması

N417 ve H524 hücreleri, eksozomlarının toplanması için 6 well-platelere 2 ml'ye  $7,5 \times 10^5$  hücre/ml olacak şekilde %10 eksozom içermeyen (exo-depleted FBS) RPMI 1640 besiyerine (Capricorn) ekildi. Ardından üzerlerine sırasıyla GW4869, Nexinhib20, sislpatin+etoposid, sislpatin+etoposid+GW4869, sislpatin+etoposid+Nexinhib20 şeklinde inhibitörler uygulandı. Eksozomlarının salınımı için 2 gün boyunca 37°C'de %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nemli hava ortamında inkübe edildi. İki gün sonra besiyerleri 15'lik falkonlara alınarak eksozom izolasyonu için ayrıldı.

### 3.2.5 Eksozom İzolasyonu

N417 ve H524 hücreleri, sırasıyla GW4869, Nexinhib20, sislpatin+etoposid, sislpatin+etoposid+GW4869, sislpatin+etoposid+Nexinhib20 şeklinde inhibitörlerin uygulanması sonucu hücrelerden salınan eksozomlar, miCURY Exosome Cell/Urine/CSF Kit ile izole edildi.

- Eksozom izolasyonundan önce 15'lik falkona toplanan besiyerleri hücre artığından arındırılmak için 3000xg'de 5-10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında süpernatantlar 0.22'lik filtreden geçirilerek yeni falkon tüplere alındı.
- Falkon tüplerin her birinin içerisine total hacmin dörtte biri kadar Precipitation Buffer B yavaşça eklendi ve 5 sn vorteks yapıldı. Ardından +4°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.
- Ertesi gün 20°C'de 30 dakika 3200xg'de santrifüj edildikten sonrası süpernatant kısım ayrılarak +4°C'de saklandı.
- Pellet 5 saniye 3200xg'de santrifüjlendikten sonra pellet 100 µl Resuspension Buffer tamponu ile çözüldü ve 15 sn vortekslendi.
- Saflaştırılmış eksozom örneği -20°C'de saklandı.

### 3.2.6 Eksozom Kantitasyonu

İzole edilen eksozomların miktarlarını belirlemek için, Eksozom Quantitation Kiti (EXOCET Exosome Quantitation Assay) kullanıldı.

- Eksozom peletinden her örnek için toplam 100 µl Lizis Tamponu eklendi (20 µl eksozom ve 80 µl Lysis Buffer).
- Eksozom proteinleri elde etmek için 37°C'de 5 dakika inkübe edildi ve 15 saniye vortekslenerek, 1500xg'de 5 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatantı buz üzerinde yeni bir ependorf tüpe aktarıldı.
- Reaksiyon başına her örnek için 50 µL Tampon A ve 0,5 µL Tampon B oluşan Reaksiyon Buffer hazırlandı.
- 96 well plate her örnek için üçer tekrar olacak şekilde 50 µL Reaksiyon Tamponu (A+B tamponu), 50 µL exosome örnekleri eklendi.
- Daha sonra oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilip 405 nm'de Glomax Multi Detection System (Promega) cihazı ile ölçüm yapıldı.

### 3.2.7 Total RNA İzolasyonu

N417 ve H524 hücrelerine, sırasıyla GW4869, Nexinhib20, sisplatin+etoposid, sisplatin+etoposid+GW4869, sisplatin+etoposid+Nexinhib20 şeklinde inhibitörlerin uygulanması sonucunda, hücre siklusunda rol oynayan genlerin (Cyclin D1 ve CDK6) ifade düzeylerinde ve eksozom salınımlarında rol oynayan CD9, CD63, TSG101 ve RAB27A genlerinin ifadesinde meydana gelen değişimleri incelemek için hücrelerden total RNA örnekleri trizol ile toplandı.

- 6 well-plate'den toplanan hücreler, 150xg'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra pellet üzerine 500 µl trizol eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Ardından 100 µl kloroform eklenerek vortex yapıldı ve +4°C'de 12000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında en üst fazda oluşan RNA, ayrı bir ependorf tüpe alındı.
- RNA örneklerinin üzerine 50µl izopropanol eklenerek alt üst edildi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra +4°C'de 12000 rpm de 10dk santrifüj yapıldı.
- Pellet üzerine 700 µl %70 etanol eklenerek tekrar vortekslendi ve 7500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra alkolü uzaklaştırmak için ependorf tüplerin ağzı

açık bir şekilde RNA'lar kurumaya bırakıldı. Pelet miktarına bağlı olarak 20-25 µl RNaz-free su ile çözülerek RNA elde edildi.

➤ İzolasyonu yapılan RNA'ların saflık seviyelerini tespit etmek için 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbanları alınıp çıkan A260/A280 değerlerine göre RNA konsantrasyonları Nanodrop cihazı kullanılarak ölçüldü.

### 3.2.8 Total RNA'nın cDNA'ya Dönüşümü

RNA örnekleri Thermo cDNA Sentez Kit'i kullanılarak cDNA'ya dönüştürüldü. Thermo cDNA Sentez Kit'i iki basamaktan oluşmaktadır.

➤ RNA örneklerinin konsantrasyonları 1µl olacak şekilde hesaplandı ve cDNA kitine koyulacak olan RNA miktarı belirlendi.

➤ İlk basamakta her örnek için 1 µl random primer ve toplam hacmi 12 µl'ye tamamlayacak şekilde dH<sub>2</sub>O ve RNA örnekleri bir PCR tüpüne eklendi. Daha sonra bu tüpteki örnekler 65°C'de 5 dakika inkübe edildi.

➤ İnkübasyon işleminin ardından karışı buzda 1 dakika bekletildi.

➤ İkinci basamakta her örnek için 4 µl 5X Reaction Buffer, 1 µl Ribolock RNase İnhibitor, 2 µL dinükleotidtrifosfat (dNTP) mix ve 1 µl RevertAid Reverse Transcriptase bir PCR tüpüne eklendi (Toplam hacim 8 µl).

➤ Sonra her örnek için birinci ve ikinci basamaktaki tüplerin içindeki örnekler birleştirildi.

➤ Reaksiyon için hazırlanan karışım 25°C'de 5 dakika, 42°C'de 60 dakika, 70°C'de 5 dakika olacak şekilde reaksiyona bırakıldı.

➤ cDNA'ya dönüştürülen örnekler -20°C'de saklandı.

### 3.2.9 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PZR)

Eksozom salınımı baskılanmış hücrelerden izolasyonu yapılan ve cDNA'ya dönüştürülen RNA örnekleri QuantiTect SYBR Green PCR Kit kullanılarak BIO-RAD Real Time PCR cihazı kullanılarak analiz edildi. Reaksiyondan önce kullanılacak cDNA'lar 1/3 oranında nükleaz içermeyen su ile seyreltildi.

Her bir örnek için reaksiyon karışımı; 5 µl QuantiTect SYBR Green master mix, 0,5 µl forward ve 0,5 µl reverse ve 1 µl cDNA ile son hacim 10 µl olacak şekilde nükleaz

içermeyen su ile tamamlandı. Reaksiyon her bir örnek için 3 tekrarlı olarak yapıldı. Reaksiyonda kontrol primeri olarak  $\beta$ -aktin kullanıldı.

**Tablo 5.1.** qRT-PZR Koşulları

Basamak	Zaman	Sıcaklık
İlk Aktivasyon	15 dakika	95°C
Denatürasyon	15 dakika	94°C
Annealing (Yeniden Birleşme)	30 dakika	50-60°C
Uzama	30 dakika	72°C
Döngü Sayısı	40	

### 3.2.10 Apoptoz Tespiti

KHAK tedavisinde, ekzozom salınımının baskılanmasının hücre döngüsü ve hücre ölümü üzerindeki etkilerini yerinde saptamak için bir hücre ölümü saptama kiti (TUNEL) kullanıldı ve ardından floresan mikroskopu kullanılarak analiz edildi. DNA'da meydana gelen kırıklıklar in situ olarak tanımlandı. Bu deney için, Roche İn Situ Cell Death Detection Kit, AP kullanıldı.

- H524 ve N417 hücreleri yaklaşık  $3 \times 10^4$  hücre olacak şekilde 6 well-plate ekildi.
- Ertesi gün her hücre hattı için sisplatin+etoposid, sisplatin+etoposid+Nexinhib20 ve sisplatin+etoposid+GW4869 şeklinde inhibitörler hücrelere uygulandı. 24 saat %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C inkübatörde inkübe edildi.
- Ertesi gün hücreler toplanarak 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve bütün hücrelerin çökmesi sağlandı.
- 50 ml'lik bir falkon tüp içerisine 0,05 gram Sodium Citrate tartılıp 50 ml distile su ile çözüldü. Üzerine %0,1 Triton X-100 solüsyonu eklenerek çözüldü.
- Ayrı bir 50 ml'lik falkon tüpe 0,4 gram paraformaldehit tartılıp 10 ml PBS ile çözüldü ve 10M NaOH eklenerek vortekslendi. Sonra 60°C'deki su banyosu içerisinde çözüldü (pH: 7,4 olacak şekilde ayarlandı).

- Daha sonra hücre peletleri üzerine 100 µL paraformaldehit çözeltisi eklenerek pelet çözüldü ve 5 dakika inkübe edildi.
- Pozitif lam üzerine hücre örnekleri pipet yardımı ile yayıldı ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Lam üzerindeki örnekler PBS solüsyonu ile 2 defa yıkandıktan sonra kurumaya bırakıldı.
- Sonra lamların üzerine 100 µL Triton X-100 solüsyonu (Permeabilisation Solüsyonu) eklendi ve pipet yardımı ile yüzeyi kaplayacak şekilde yayıldı. Daha sonra örnekler, +4°C'de 2 dakika inkübe edildi (Örnekler kuruyuncaya kadar inkübe edilebilir).
- Daha sonra TUNEL solüsyonu hazırlandı. Tunel solüsyonunda, sekiz örnek için 40 µl enzim solüsyonu ve 360 µl Label Solüsyonu bir ependorfa eklenerek oluşturuldu.
- Her bir örnek 50µL lam üzerine yayılarak 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Daha sonra lamlar 3 defa PBS ile yıkarak kurutuldu. Sonra örnekler karanlık ortamda floresan mikroskobu ile görüntü alındı.

### 3.2.11 İstatistiksel Analiz

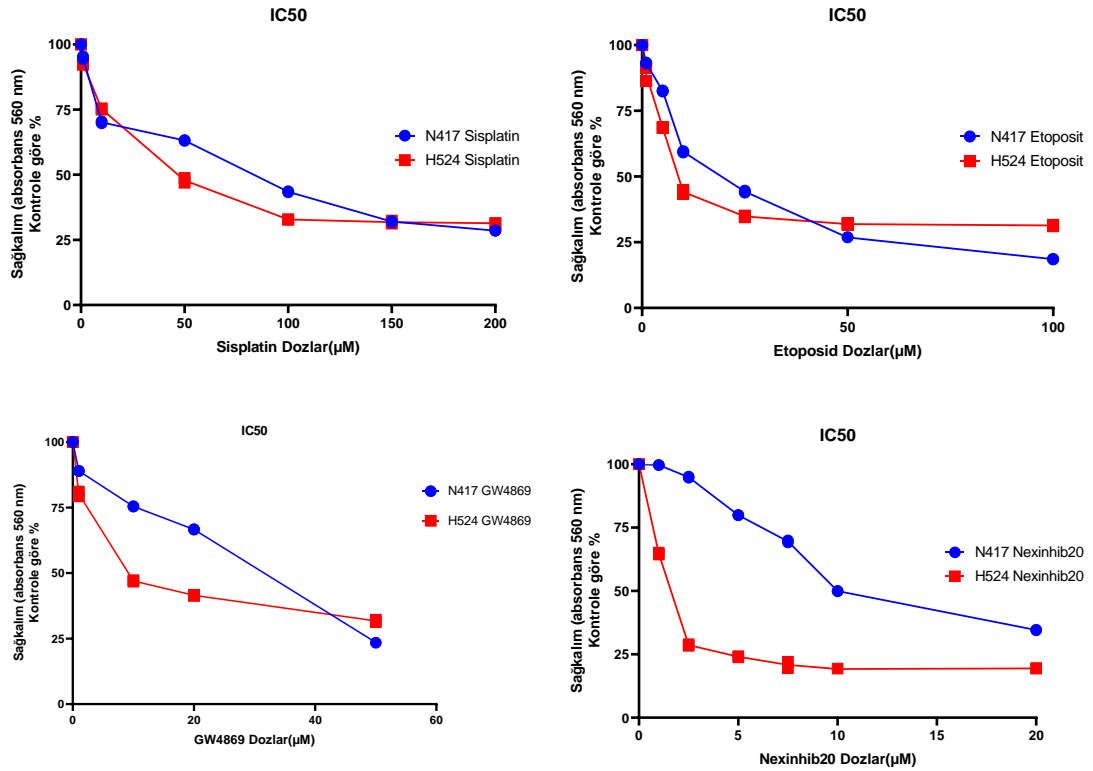
Hücre gruplarındaki ekspresyonel değişim, qRT-PZR verileri kullanılarak, karşılaştırmalı Ct yöntemi olan  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  yöntemi ile istatistiksel olarak analiz edildi. Analizler GraphPad Prism 8. 0. 2. Programı kullanılarak yapıldı. İki grup arasındaki karşılaştırmalar bağımsız t testi ile analiz edildi, gruplar içindeki karşılaştırmalar eşleştirilmiş t testi ile analiz edildi, çoklu gruplar arasındaki karşılaştırmalar Two-way ANOVA kullanılarak analiz edildi.



## 4 BULGULAR

### 4.1 KHAK Hücre Hatlarına Uygulanan İnhibitörlerin IC50 Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmaya başlamadan önce, Sisplatin, Etoposid, GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri kataloglarında belirtilen konsantrasyonlarda DMSO (Dimetilsülfoksit, Bioshop) ile çözüldü. KHAK hücre hatları olan, H524 ve N417 hücrelerine çeşitli konsantrasyonlarda inhibitörler uygulandı.



Şekil 6.1. KHAK hücre hatlarına uygulanan inhibitörlerin IC50 değerlerinin belirlenmesi.

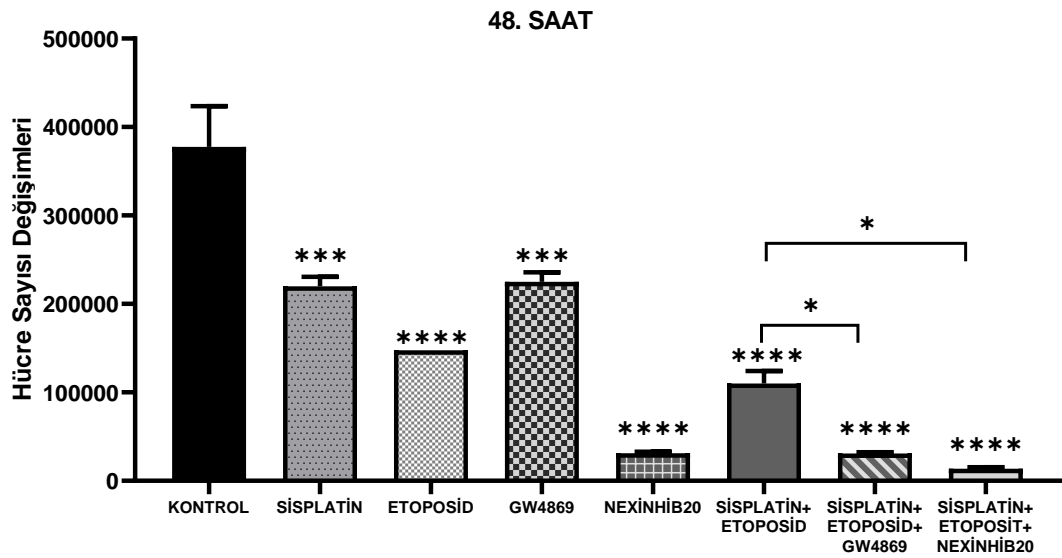
H524 ve N417 hücrelerine sisplatin, etoposid, GW4869, Nexinhib20 uygulandıktan sonra 48 saat inkübe edildi ve Florasan, Absorbans ve Luminometrik Ölçüm Cihazı ile absorbansları ölçülerek inhibitörlerin IC50 değerleri belirlendi.

**Tablo 6.1.** KHAK hücre hatlarına uygulanan inhibitörlerin IC50 değerleri.

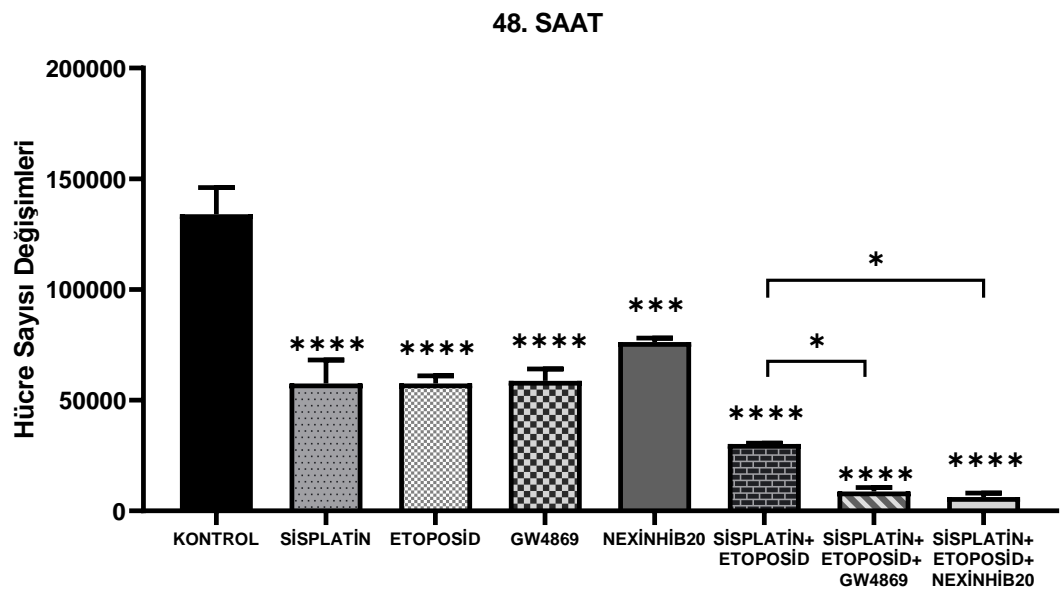
<b>İnhibitörler</b>	<b>N417 Hücresi</b>	<b>H524 Hücresi</b>
Sisplatin	76,19 $\mu$ M	46,03 $\mu$ M
Etoposid	21,21 $\mu$ M	13,02 $\mu$ M
GW4869	27,97 $\mu$ M	10,72 $\mu$ M
Nexinhib20	12,19 $\mu$ M	1,55 $\mu$ M

#### **4.2 KHAK Hücre Hatlarına Uygulanan İnhibitörler, Hücre Proliferasyonu ve Hücre Morfolojisine Etkisi**

KHAK hücre hatlarına sırasıyla GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri uygulanması ile eksozom salınımı baskılanması amaçlanmıştır. Uygulama sonrası, kontrol gruplarına kıyasla, hücre proliferasyonunda azalma meydana geldiği gözlemlendi. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında N417 hücre hatlarının hücre proliferasyonunun GW4869 uygulanmasından sonra 1,7 kat, Nexinhib20 uygulanmasından sonra ise 12 kat azaldığı gözlemlendi ( $p < 0.0001$ ). H524 hücre hatlarına GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri uygulandığında, hücre proliferasyonunun kontrol gruplarına kıyasla sırasıyla 2,3 kat ve 1,75 kat azaldığı belirlendi ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 6). Ayrıca KHAK hücre hatlarında, kombine tedaviye ek olarak GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri uygulandığında, hücre proliferasyon hızında istatistiksel olarak anlamlı seviyede bir düşüş olduğu gözlemlendi ( $p < 0.0001$ ) (Şekil 6.1). Ek olarak, N417 ve H524 hücreleri süspanse bir şekilde kolonizasyon gözlenirken, GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri ile muamele edildiğinde hücre morfolojisi ve koloni formasyonunda değişiklikler meydana gelmiştir (Şekil 6.2). Özellikle N417 hücre hatlarına GW4869 inhibitörü uygulanmasının ardından hücrelerde adherent kolonilerin oluştuğu ve hücre koloni formlarının dağıldığı gözlemlendi. Hücrelere Nexinhib20 uygulamasının ardından ise hücre koloni formasyonlarında dağılmalar meydana geldiği gözlemlendi.



**N417**

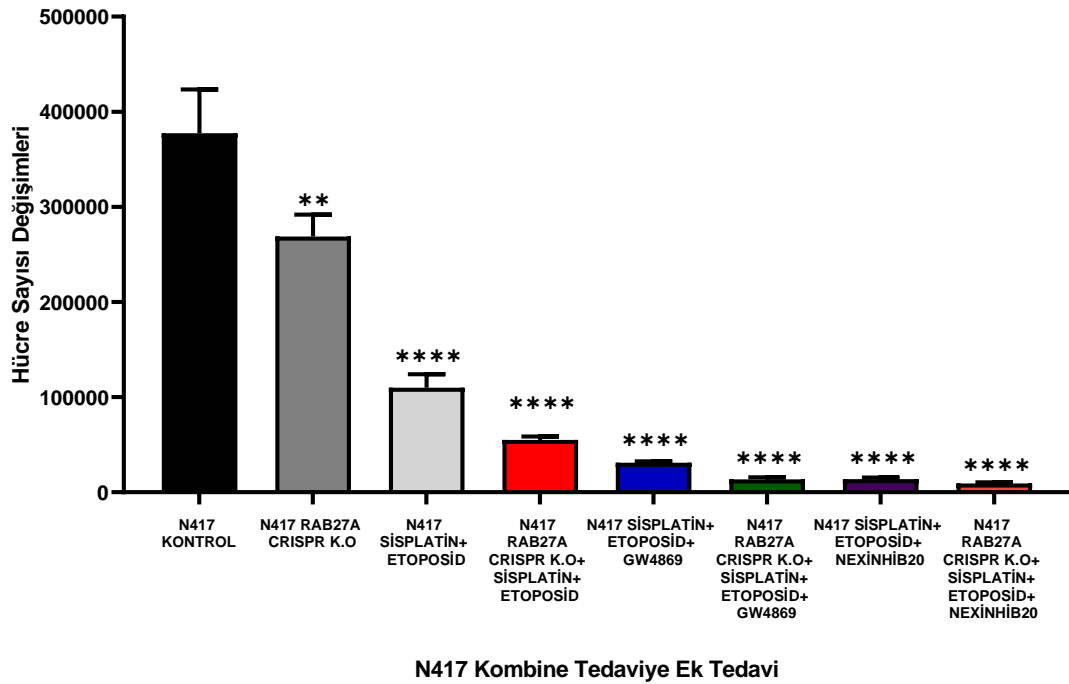


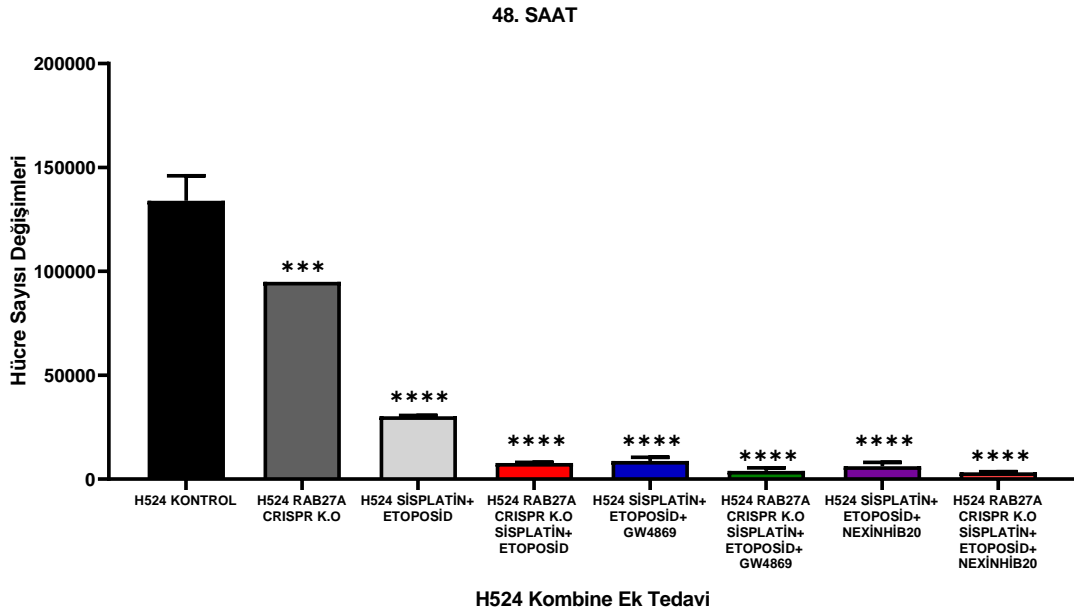
**H524**

**Şekil 7.1** KHAK hücre hatlarına inhibitörlerin uygulanması sonucu hücre proliferasyon hızı.

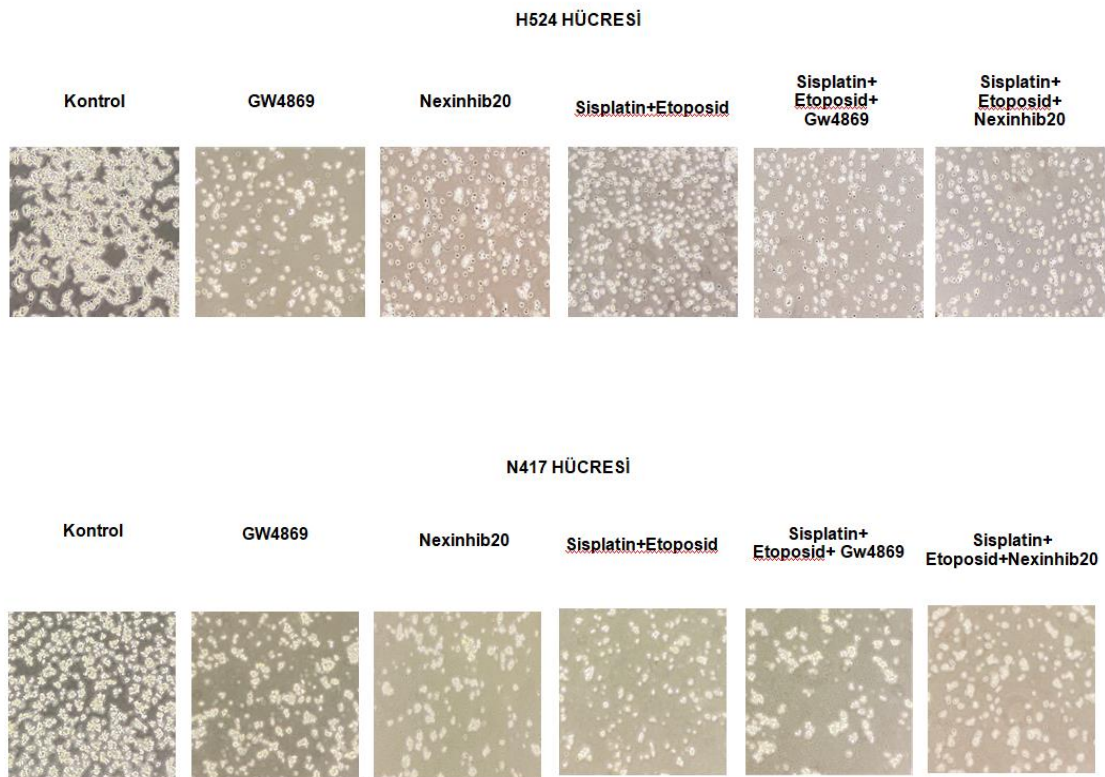
Çalışmamıza ek olarak TÜBİTAK 220S104 numaralı proje kapsamında uygulanan CRISPR/ Cas9 yöntemi aracılığı ile KHAK hücre hatlarında Rab27A susturulmuştur. CRISPR/ Cas9 aracılığı ile Rab27A ifadesi susturulan KHAK hücre hatlarının, GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri uygulanan KHAK hücre hatlarına kıyasla hücre proliferasyonunda azalmaya neden olduğu belirlendi. N417 ve H524 hücrelerine mevcut tedavi stratejisi olan sisplatin-etoposid uygulanmasının hücre proliferasyonunu etkilediği gösterildi. Ancak mevcut tedaviye ek olarak Rab27A ifadesi susturulduğunda hücre proliferasyonlarında istatistiksel bir azalış gözlemlendi ( $p < 0.0001$ ). Bu durum, Rab27A ifadesinin susturulmasının kanser hücrelerinin proliferasyonunu önemli bir oranda etkilediğini göstermektedir. Gen ifadesi susturulmuş KHAK hücre hatlarına geleneksel tedaviye ek olarak GW4869 ve Nexinhib20 uygulanmasının hücre proliferasyonunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalış meydana getirdiği tespit edildi ( $p < 0.0001$ ).

#### 48. SAAT





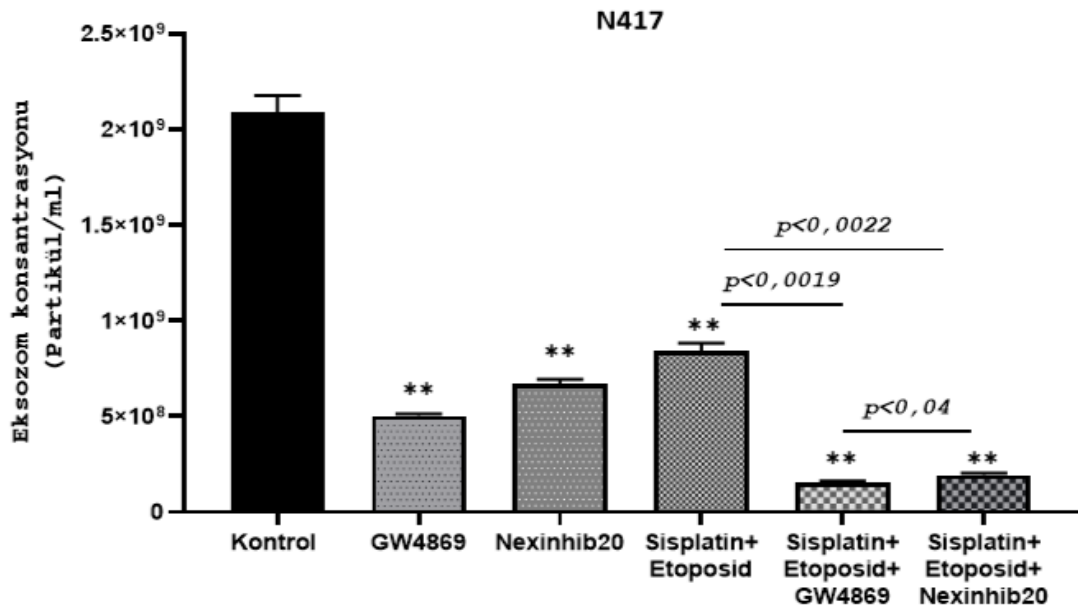
**Şekil 7.2** KHAK tedavisine ek GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri uygulanması sonucu hücre proliferasyon hızı.



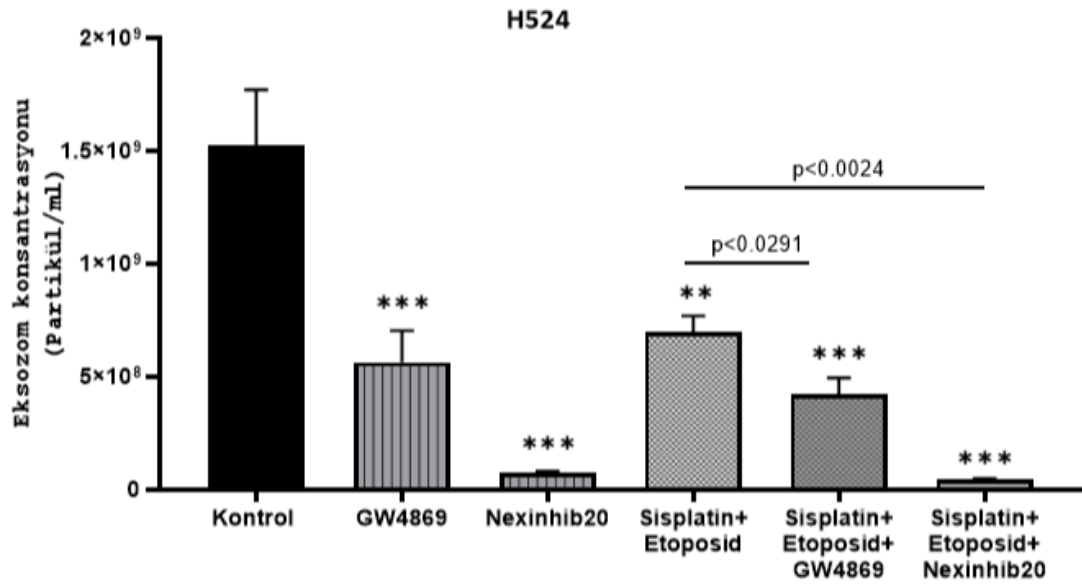
**Şekil 7.3** KHAK hücre hatlarında ekzozom salınımı baskılanması sonucu koloni morfolojisinin değişimi.

### 4.3 KHAK Hücre Hatlarına GW4869 ve Nexinhib20 İnhibitörlerinin Uygulandığında Eksozom Salınım Miktarlarının Belirlenmesi

Hücre gruplarına inhibitörlerin uygulanması ile Rab27A ve nSMase genlerinin baskılanması ve bunun sonucu olarak eksozom salınım miktarının azalması amaçlanmıştır. Bu nedenle GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri uygulanması sonucunda hücrelerden salgılanan eksozom miktarları, kantitatif eksozom miktar tayini ile analiz edildi. KHAK hücre hatlarına GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri uygulandığında, kontrol gruplarına kıyasla hücrelerin eksozom miktarlarında önemli bir azalma tespit edildi. N417 hücrelerinde kombine tedaviye ek GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri uygulandığında, sırasıyla  $p < 0,0019$ ,  $p < 0,0022$  seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlenirken, H524 hücrelerinde kombine tedaviye ek GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri uygulandığında, sırasıyla  $p < 0,0291$ ,  $p < 0,0024$  seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edildi.



Sisplatin	-	-	-	+	+	+
Etoposid	-	-	-	+	+	+
GW4869	-	+	-	-	+	-
Nexinhib20	-	-	+	-	-	+



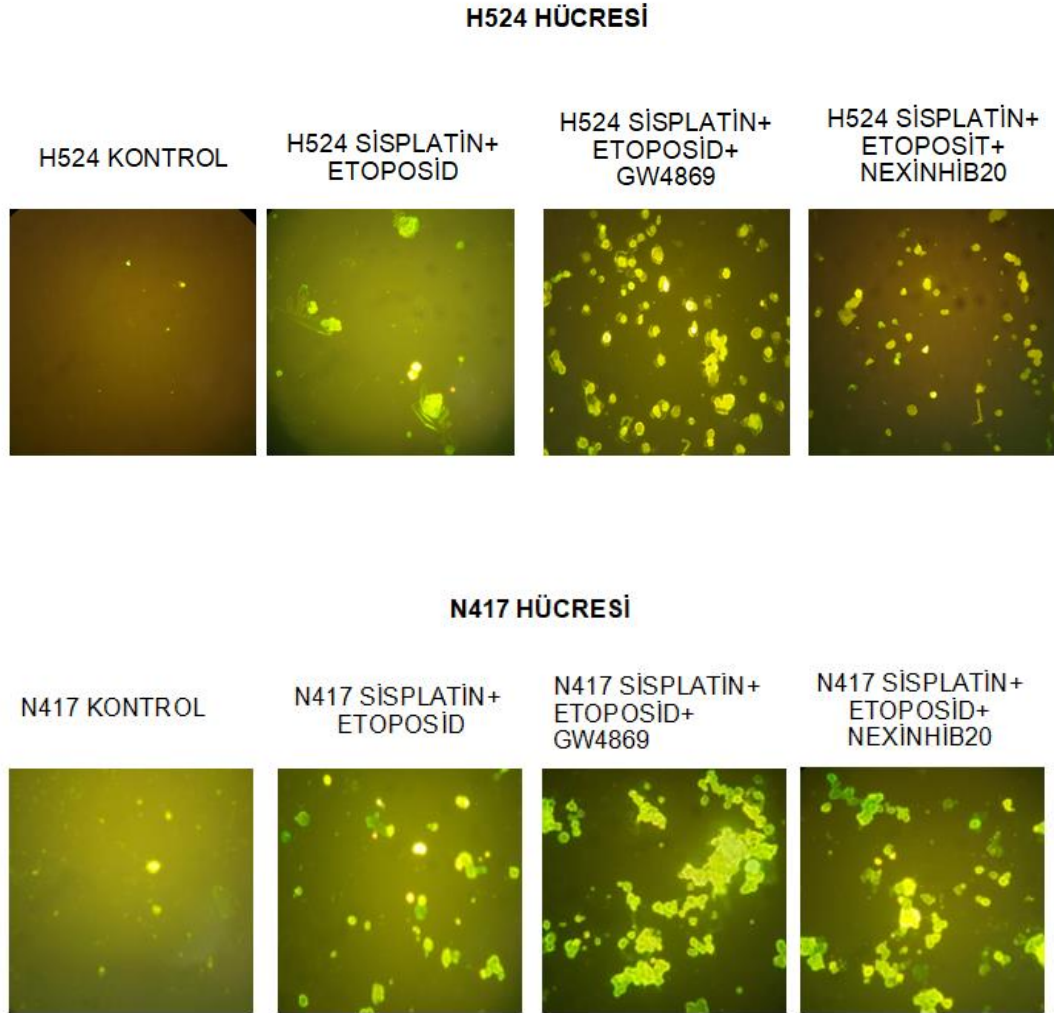
Sisplatin	-	-	-	+	+	+
Etoposid	-	-	-	+	+	+
GW4869	-	+	-	-	+	-
Nexinhib20	-	-	+	-	-	+

**Şekil 8.1.** KHAK hücre hatlarında kantitatif eksozom miktar tayini. **A)** N417 hücre hattı. **B)** H524 hücre hattı

#### 4.4 Mevcut Tedaviye Ek GW4869 ve Nexinhib20 İnhibitörlerinin Uygulanmasının Apoptoza Yönlendirmesi

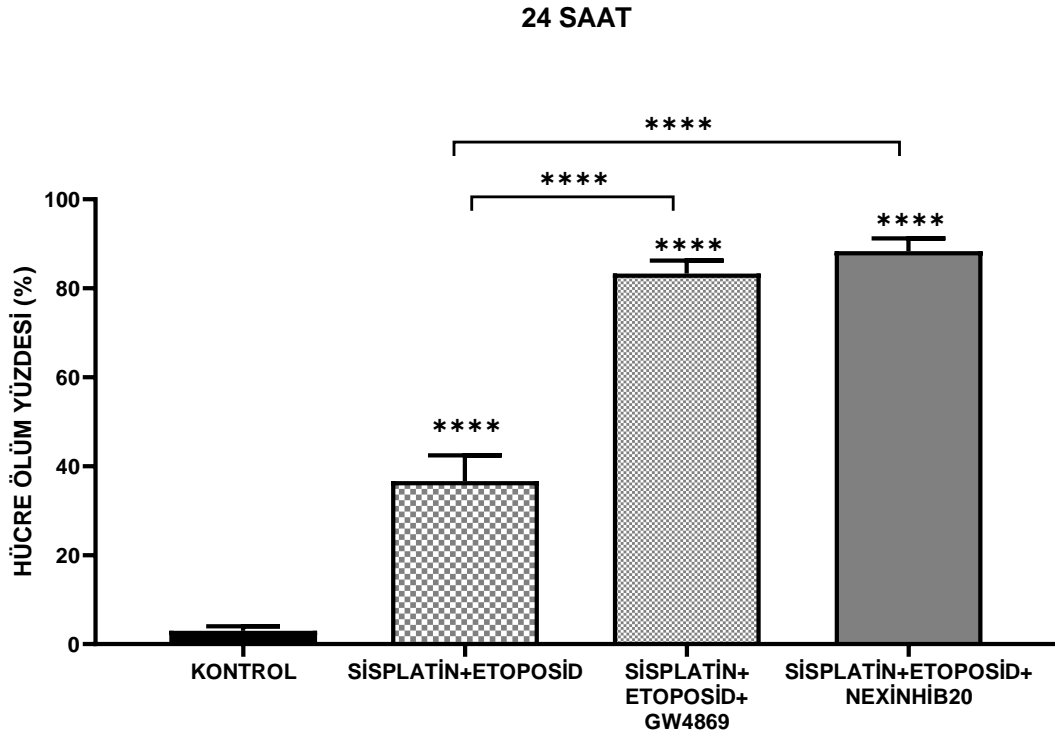
KHAK hücre hatlarında sisplatin+etoposid tedavisine ek olarak uygulanan GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin, KHAK hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve hücreleri apoptoza yönlendirdiği in vitro olarak tespit edildi. Daha sonra, hücre grupları floresan mikroskopu kullanılarak analiz edildi. Mevcut tedaviye ek olarak Gw4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri ile nSMase ve Rab27A'nın baskılanması, eksozom salınımını baskılamıştır. Ayrıca KHAK hücrelerinin progresyonunu etkileyerek, N417 ve H524 hücrelerinin apoptoz seviyesini artırmıştır. N417 hücre hatlarında sisplatin-etoposid tedavisinin

%46,6 oranında hücreleri apoptoza yönlendirdiği görülürken, H524 hücre hatlarında sisplatin-etoposid tedavisinin %36,6 oranında hücreleri apoptoza yönlendirdiği tespit edildi. Ayrıca inhibitörlerin mevcut tedaviye ek olarak kullanımı mevcut tedaviye kıyasla %80-85 daha fazla hücreleri apoptoza yönlendirdi.

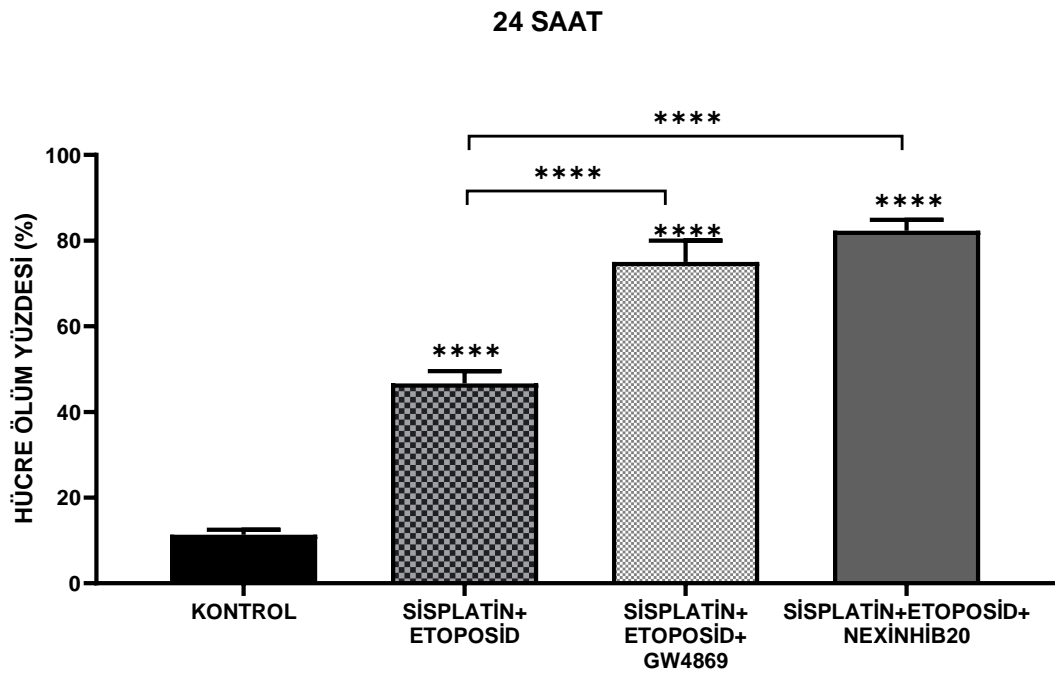


**Şekil 9.1.** KHAK hücre hatlarında tedaviye ek GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin uygulanması sonucu apoptotik hücreler.





H524 HÜCRESİ

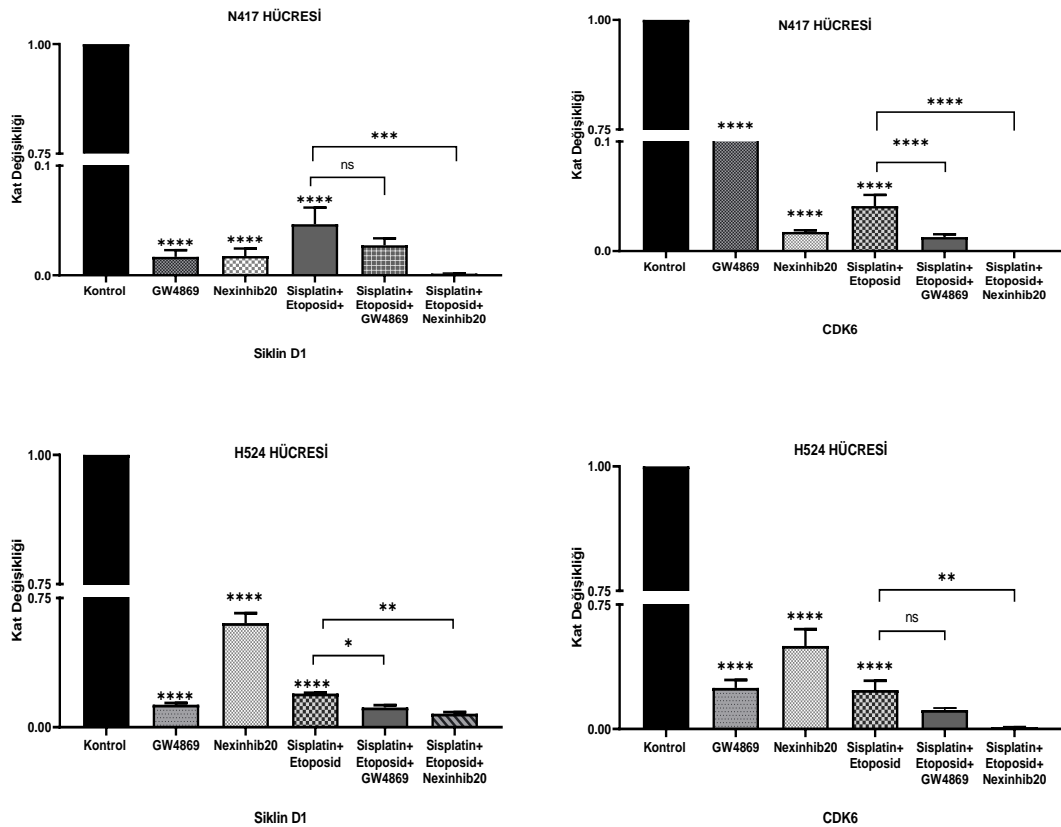


N417 HÜCRESİ

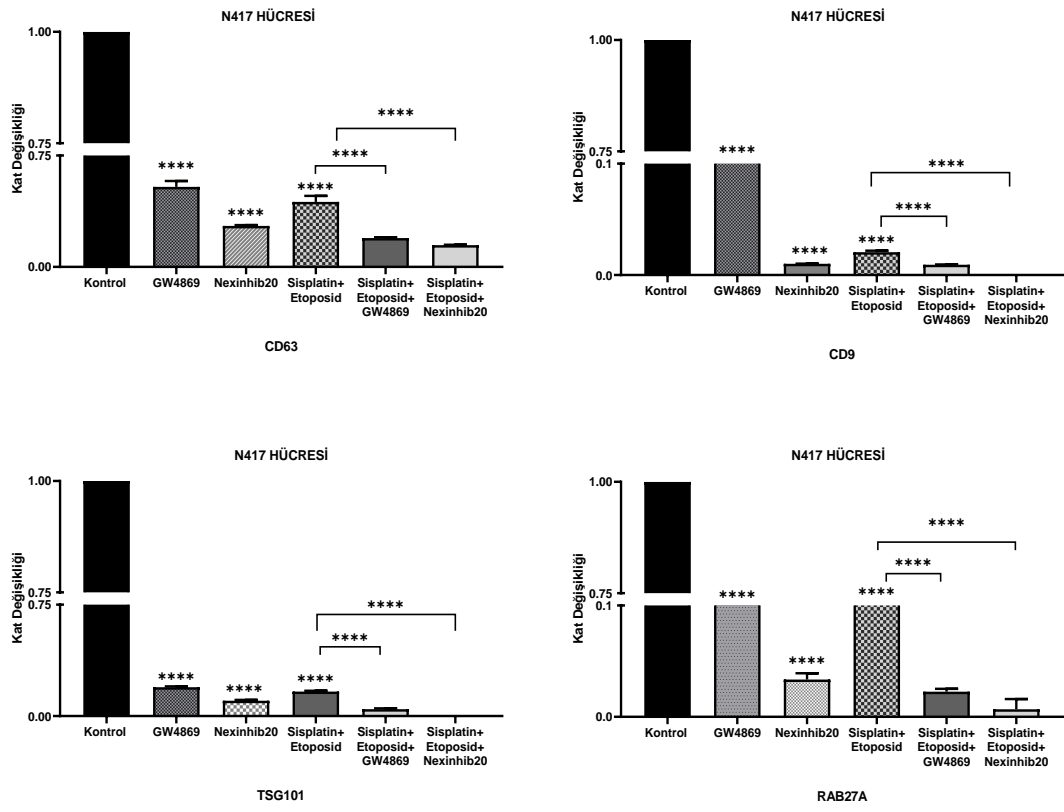
**Şekil 9.2.** KHAK tedavisine ek hücre ölüm oranı (%).

#### 4.5 GW4869 ve Nexinhib20 İnhibitörlerinin Uygulanması Sonucu, Hücre Siklusu Genlerinin ve Ekzozom Marker Genlerinin İfade Düzeylerinin Real-Time PCR Aracılığıyla Belirlenmesi

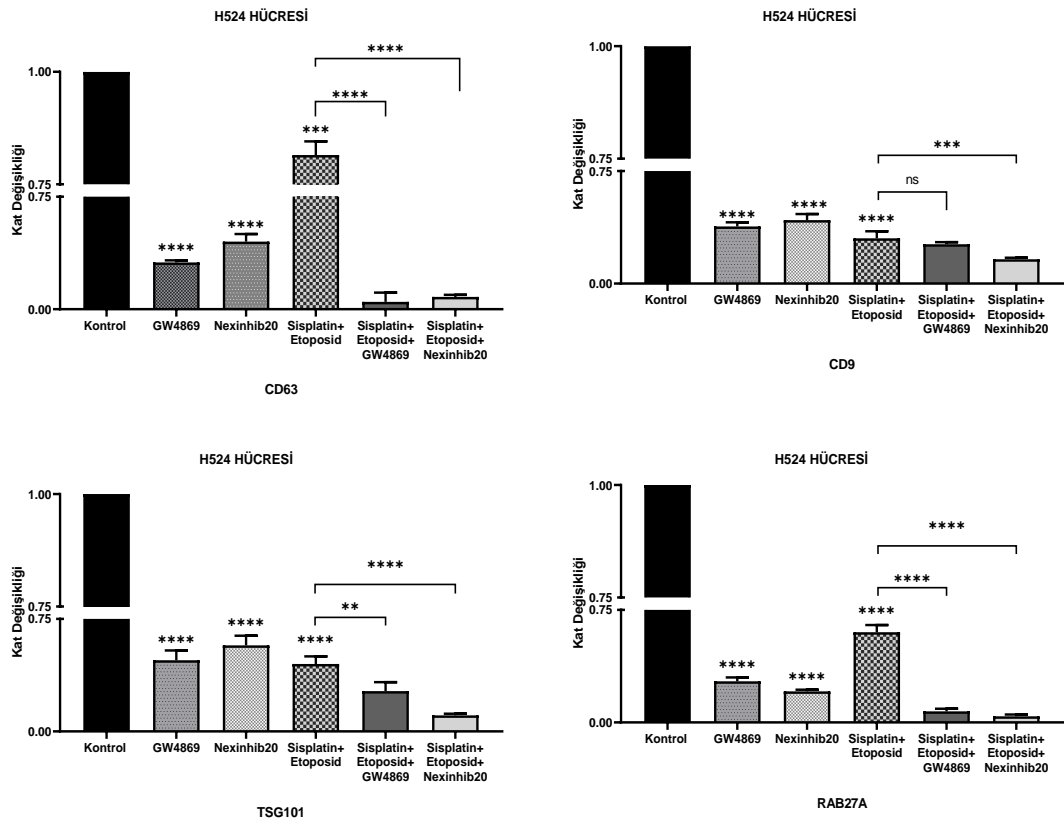
Ekzozom biyogenezinde önemli bir role sahip olan marker genlerin (CD63, CD9 ve Tsg101) mRNA ifade düzeylerinde değişiklikler meydana geldiği ve KHAK hücre hatlarında RAB27A ve nsmase2 genleri susturulmuş olduğu doğrulandı. KHAK hücre hatlarında, CD63, CD9 ve Tsg101 genlerinin ifade düzeylerinde önemli bir azalış tespit edildi ( $p < 0,0001$ ). Ayrıca, KHAK hücre hatlarına GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin uygulanmasının kanser progresyonunu etkileyerek, hücre siklusu genlerinin ifade düzeylerinde değişiklik meydana getirdiği belirlendi ( $p < 0,0001$ ).



**Şekil 10.1.** KHAK hücre hatlarında hücre siklusu genlerinin ifade düzeyleri.



**Şekil 10.2.** N417 hücre hattında ekzozom marker genlerinin ifade düzeyleri.



**Şekil 10.3.** H524 hücre hattında ekzozom marker genlerinin ifade düzeyleri.

## 5 TARTIŞMA

Akciğer kanseri, dünya çapında kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenidir. Akciğer kanserlerinin bir alt türü olan KHAK, akciğer kanserlerinin %15-20'sini oluşturmaktadır. KHAK, yüksek proliferatif hızı, yüksek metastaz yeteneği ve kötü prognozu ile ilgi çeken nöroendokrin kökenli tümörlerdir. KHAK'ın 5 yıllık sağkalım oranı %7'in altındadır ve herhangi bir tedavi uygulanmadığında genel sağkalım oranı sadece 2-4 aydır (Stinchcombe 2010; Demedts vd. 2010). Son yıllarda KHAK'nin moleküler özelliklerinin aydınlatılmasında ve KHAK gelişiminin karakterize edilmesinde ilerleme kaydedilmesine rağmen, KHAK tedavisi bir sorun olmaya devam etmektedir. Mevcut KHAK teşhis yöntemlerinin yetersizliği, erken teşhis edilememesi, yüksek mortalite oranları ve çeşitli terapötik girişimlerin başarısız olması etkin bir tedavi stratejisinin belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, KHAK'nin erken tespiti ve tedavi etkinliğinin belirlenmesi için daha fazla biyobelirtecin keşfedilmesi oldukça önemlidir.

Kombinasyon halinde kullanılan etoposid ve sisplatin, KHAK için en yaygın tedavi rejimidir. Bu rejim 1980'li yıllardan itibaren birçok kanser türünün tedavisinde in vitro, in vivo ve klinik çalışmalarında kullanılmış ve birçok kanser türünün tedavisinde çeşitli tedavi stratejilerinin geliştirilmesine öncü olmuştur. Sisplatin-etoposid, çoğu KHAK vakasının tedavisinde yaklaşık %70 oranında yanıt vermektedir. Ancak bu vakaların neredeyse tamamı nüks etmekte ve kemoterapiye direnç geliştirmektedir. Ayrıca, sisplatin ve etoposid tedavisi sonrası birçok yan etki de ortaya çıkmaktadır. KHAK olumsuz etkilerini azaltmak için, araştırmacılar farklı terapötik ajanlar veya kombine tedavi stratejileri kullanmayı denemişlerdir. Ancak KHAK kötü prognoz olmaya devam etmektedir ve KHAK için etkin bir tedavi henüz belirlenmemiştir.

Literatürdeki son çalışmalarda, eksozom adı verilen veziküllerin akciğer kanseri dahil olmak üzere birçok kanser hücresi tarafından salgılandığı bilinmektedir. Eksozomlar akciğer kanseri hücrelerinin metastazı, tümör büyümesinin teşvik edilmesi, epitelyal-mezenkimal geçişin (EMT) şekillendirilmesi, anjiyogenezin uyarılması, kemodirenç, tümör migrasyonu ve immünsüpresyonunda önemli bir rol oynamaktadır (Frydrychowicz

vd. 2015). Çok sayıda çalışma, eksozomların akciğer kanserinde tümör gelişimini teşvik ettiğini ve tümör mikro çevresine aracılık edebileceğini bildirmiştir. Örneğin melanom kaynaklı eksozomların akciğer endotelial geçirgenliğini arttırdığı ve farelerde akciğer metastazlarını arttırdığı belirlenmiştir (Peinado vd. 2012). Xiao ve ark. DDP maruziyeti sırasında A549 hücrelerinin DDP'ye direnci etkileyebileceğini öne sürmüştür. Ayrıntılı mekanizmaları belirsiz kalsa da eksozom oluşumu ve salınımının inhibisyonunun, akciğer kanserinin gelecekteki tedavisi için yeni bir strateji sunabileceğine inanılmaktadır (Xiao vd. 2014). Ayrıca Fabbri ve arkadaşları, akciğer kanseri taşıyan fareler eksozom salınım inhibitörü olan GW4869 ile tedavi edildiğinde, önemli ölçüde daha düşük akciğer metastazı sergilediğini belirttiler (Fabbri vd. 2012). Ancak eksozomların KHAK karsinogenezindeki rolleri ve eksozom salınımının hedeflenmesi özelinde oldukça sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.

Eksozomlar; kan, idrar, amniyotik sıvı, omurilik sıvısı, anne sütü, serum, plazma gibi birçok vücut sıvısında saptanan ve hem normal hem de kanserli hücreler tarafından sürekli olarak salınan veziküllerdir. Bununla birlikte, hücre-hücre etkileşimi, sinyal iletimi, haberleşme ve hücrelerel moleküllerin taşınması gibi birçok biyolojik süreçte kritik bir rol oynamaktadır. Ayrıca eksozomlar yoluyla hücreler arası iletişim, kanserin ilerlemesi ve patogenezinde oldukça önemlidir. Tümörjenez sırasında, eksozomlar tümör mikro çevresinin değiştirilmesini kolaylaştırabilir ve tümörün ilerlemesini sağlamak için bağışıklığı düzenleyebilir. Ayrıca anjiyogenez, metastaz ve ilaç direncini teşvik ederek tümör hücresinin hayatta kalmasını indükleyebilir. Biyogenez ve eksozomların salınması, kanserin ilerlemesi sırasında düzenlenir. Bu nedenle, normal hücrelerden ve kanser hücrelerinden salınan eksozomlar, niceliksel ve niteliksel olarak birbirinden farklıdır.

Eksozom biyogenez/salınımı sırasında hücrede çok sayıda protein ağı rol oynamaktadır. Rab GTPaz proteinleri, ESCRT bağımlı ve bağımsız olarak eksozom salınımını kontrol eder (Blanc ve Vidal, 2018) ve endosomal taşıma kompleksleri (ESCRT), ILV oluşumunu düzenler (Juan ve Furthauer, 2018). Ayrıca transmembran proteinler olarak adlandırılan tetraspaninler (Andreu ve Yanez, 2014), vezikül oluşumu için zar eğilimini indükler ve çeşitli enzimlerin (seramidleri oluşturan sfingomiyelinaz gibi) varlığına bağlı olarak ESCRT'den bağımsız vezikül oluşumunu destekler. TSG101 (tümör duyarlılık geni 101), ALIX (apoptoz bağlantılı gen 2- etkileşimli protein X), Syntenin, sindekan kompleksi, fosfolipitler, Flotillin, ARF6 ve SNARE kompleks proteinleri de eksozom biyogenez sürecinde yer alır (Skotland vd. 2017). Bu faktörler doğrudan eksozomal yüklerle etkileşime girer ve eksozom salgılanması için hedeflenen substratlarla birleşir.

Eksozomların tümör hücreleri tarafından salgılandığı ve kanserde yüksek dolaşım seviyelerine sahip olduğu bilinmektedir. Eksozomların kanser oluşumundaki önemli rolleri göz önüne alındığında, kanser tedavisi için yeni adjuvanlar olarak eksozom biyogenezini, salınımını ve/veya alımını hedeflemede çok az ilerleme kaydedilmiştir. Bu nedenle, eksozomal içerikler ve mekanizmalar yıllardır detaylı olarak araştırılmaktadır. Bununla birlikte, kanser ilerlemesi ve kötü prognostik sonuçların önlenmesi için patolojide yer alan eksozomların biyogenezini, salınımını ve/veya alımını potansiyel olarak inhibe eden farmakolojik ajanların tanımlanması gerekmektedir. Son yıllarda, kanser hücrelerinden eksozom salınımı veya bunların alıcı hücreler tarafından alımını azaltmak için yeni ajanlar geliştirilmeye başlanmıştır. Bu bileşikler, eksozom biyogenezi ve salınımının farklı aşamalarını hedeflemektedir.

Literatürler, nötral sfingomyelinaz ailesi (nSMases) ve küçük GTPazların Rab ailesi dahil olmak üzere, birkaç anahtar proteinin ve sinyal yolunun eksozom biyogenezinin ilerlemesini ve salınımını çarpıcı bir şekilde etkileyebileceğini bildirmiştir (Schimmöller vd. 1998, Clarke vd. 2006, Trajkovic vd. 2008). Bu nedenle, son yıllarda eksozom salınımında oldukça önemli olan nSMase ve Rab ailesini hedef alan yeni ajanların geliştirilmesinin üzerinde durulmaktadır.

GW4869'ün, eksozom salınımını azaltmak için kullanılan spesifik bir nSMase inhibitörü olduğu keşfedilmiştir. Bu nedenle GW4869, son yıllarda dikkat çeken bir araştırma konusu haline gelmiştir. Hu ve ark. kanserle ilişkili fibroblastlardan (CAF) türetilen eksozomların, kolorektal kanserde kanser kök hücrelerinin (CSC'ler) kemorezistansı arttırdığı ve eksozom salınımı 10 µM GW4869 uygulaması ile inhibe edildiğinde CSC'lerin yüzdesini, kolonizasyonu ve tümör büyümesini azalttığını belirledi (Hu vd. 2015). CAF'ler ve ASPC1 hücreleri taşıyan NOD/SCID farelerinde gemsitabin ve GW4869 (100 mg/Kg vücut ağırlığı) ile birlikte tedavi, gemsitabin ile tedavi edilenlere kıyasla tedaviden 10 gün sonra tümörün büyüme hızında önemli ölçüde azalma gösterdiği belirtilmiştir (Richards vd. 2017). Matsumoto ve ark. GW4869'un (5 µg/mL) B16BL6 hücrelerinin büyümesini, önemli ölçüde azalttığını bildirdi (Matsumoto vd. 2017). Benzer şekilde RAW264.7 makrofaj hücreleri 10-20 µM GW4869 yardımı ile tedavi edildiğinde salınan eksozomların ve proinflamatuvar sitokinlerin miktarının önemli ölçüde azaldığı tespit edildi (Essandoh vd. 2015). Literatürde bu tür yapılan çalışmalar, GW4869'ün eksozom salınımı ve kanser hücrelerinin hayatta kalmasında eksozomların

rolünü destekler niteliktedir. Ancak GW4869 çalışmalarında hala daha eksiklikler mevcuttur.

Eksozomların üretiminde veya salgılanmasında önemli bir rol oynayan bir diğer protein ailesi RAB proteinleridir. Eksozomların tümör gelişimindeki rolleri göz önüne alındığında, son yıllarda RAB proteinlerinin inhibisyonuna müdahale edebilecek yeni bileşiklerin keşfedilmesi önem arz etmektedir. 2016 yılında Jennifer ve ark. RAB27A ve JFC114 arasındaki etkileşime müdahale ederek insan nötrofillerinde eksozom salınımını engelleyebilen çok sayıdaki bileşik keşfetmiştir. Jennifer ve ark. Nexinhib20'nin keşfettiği diğer inhibitörlerden 4 kat daha aktif olduğunu ve doğrudan Rab217A-JFC114 kompleksinde etkin olduğunu göstermiştir. Böylece Nexinhib20'nin, RAB27A'nın işlevine müdahale edebildiği ve eksozom salınımını engelleyebildiği kanıtlandı. Ayrıca Nexinhib20, RAB27A'nın JFC1'e bağlanması üzerinde hesaplanmış bir IC50 = 2.6 µM ile doza bağımlı bir önleyici aktivite de gösterdi. Ancak Nexinhib20 inhibitörünün kanser progresyonu üzerine etkisi belirlenememiş ve mekanizması aydınlatılamamıştır.

Nexinhib20 ve GW4869 inhibitörleri, tek veya kombine tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde hem in vitro hem de in vivo modeller ile daha kapsamlı olarak araştırılmalıdır. Ayrıca, literatürde Nexinhib20 ve GW4869 inhibitörlerinin kullanıldığı klinik çalışmalar mevcut değildir. Bu inhibitörlerin klinikte kullanılmaması literatürde önemli bir eksikliklerdir. Ek olarak bu inhibitörlerin türevleri geliştirilebilir. Geliştirilen Nexinhib20 ve GW4869 türevleri klinik çalışmalarda kanser tedavisi için umut vaat edebilecek niteliktedir. KHAK agresif yapılı nöroendokrin kökenli kanserler olduğundan, KHAK tedavisinde eksozom salınımını hedefleyen eksozomal inhibitörlerin kullanılması, KHAK'inde eksozomların terapötik hedefler haline getirilmesinde ve KHAK tedavisinde eksozomları hedefleyen yeni stratejilerin geliştirilmesinde önemli hale gelecektir. Ayrıca Nexinhib20 ve GW4869 inhibitörlerinin diğer nöroendokrin kökenli kanserlerin tedavisinde de umut vaat edebileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada, ilk kez KHAK tedavisinde eksozom salınımının inhibisyonu hedeflenmiştir.

Tez çalışmamızda, KHAK hücre hatlarında Rab27A ve nSMase genlerini hedefleyerek eksozom salınımının baskılanmasının karsinojeniz sürecine ve KHAK tedavisi üzerindeki olası etkilerini gösterdik. Bu çalışmada, eksozom salınımının KHAK tedavisi üzerindeki olası etkileri araştırmak amacı ile Nexinhib20 ve GW4869 inhibitörlerini kullandık. GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin KHAK hücre hattı olan N417 ve H524'e uygulanması sonucunda eksozom salınımının karsinojeniz süreci üzerine etkileri, hücre proliferasyon deneyi ile gözlemlendi. Daha sonra KHAK



tedavisinde klinik çalışmalarda ve hem in vitro hem de in vivo deneylerde kullanılan sisplatin-etoposid tedavisine ek olarak GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin uygulanmasının, KHAK tedavisine olası etkilerini gözlemlemek amacı ile hücre proliferasyonları karşılaştırıldı. KHAK hücre hatlarında, yalnız ve kombine tedaviye ek olarak GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri uygulandığında, hücre proliferasyon hızında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş gözlemlendi ( $p < 0.0001$ ). Bu durum, Cheng ve ark. yaptığı çalışma ile benzer şekilde, eksozom salınımının hedeflenmesinin, hücre çoğalma hızında anlamlı bir azalış meydana getirdiğini gösterdi (Cheng vd. 2017). Bu düşüş, agresif yapıya sahip KHAK hücre hatlarının tedavisinde umut vaat etmiştir.

Literatürde, Rab27A'nın eksozom biyogenezinde rol oynayan ESCRT bağımlı ve ESCRT'den bağımsız yollarda eksozomların hücre zarına hedeflenmesinde rol oynadığı bilinmektedir. Ayrıca kanser hücrelerinde Rab27A, pre-metastatik aktivite göstermektedir. Rab27A'nın eksozom salınımının düzenlenmesindeki rolleri göz önüne alındığında, kanser araştırmalarında önemli bir hedeftir. Literatürde de eksozom salınımını Rab27A'yı hedef alarak baskılayan pek çok çalışma bulunmaktadır. Çalışmamıza ek olarak TÜBİTAK 220S104 numaralı proje kapsamında CRISPR/ Cas9 aracılığı ile KHAK hücre hatlarında RAB27A susturulmuştur. KHAK hücrelerinde eksozom salgılayan ve salgılamayan hücre kolonileri oluşturulmuştur.

CRISPR/ Cas9 aracılığı ile Rab27A ifadesi susturulmuş KHAK hücre hatlarının GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri uygulanmamış KHAK hücre hatlarına kıyasla hücre proliferasyonunda 2 kat azalma meydana geldiği belirlendi ( $p < 0.0001$ ). N417 ve H524 hücrelerine mevcut tedavi olan sisplatin-etoposid tedavisi uygulanmasının da hücre proliferasyonunu etkilediği gösterildi. Ancak mevcut tedaviye ek olarak Rab27A ifadesi susturulduğunda hücre proliferasyonlarında yaklaşık 7 kat azaldığı saptandı ( $p < 0.0001$ ). Bu durum, Rab27A ifadesinin susturulmasının kanser hücrelerinin proliferasyonunu önemli oranda etkilediğini göstermektedir. Geleneksel tedaviye ek olarak GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin kullanılması hücre proliferasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edildi ( $p < 0.0001$ ). Gen ifadesi susturulmuş KHAK hücre hatlarına geleneksel tedaviye ek GW4869 ve Nexinhib20 uygulanmasının hücre büyümesini inhibe ettiği ve hücre proliferasyonunda 27 kattan daha fazla bir azalış meydana getirdiği belirlendi ( $p < 0.0001$ ). Bu durum, KHAK tedavi etkinliğinin artırılmasında oldukça önemlidir.

N417 hücreleri, 27,97  $\mu$ M GW4869 ve 12,19  $\mu$ M Nexinhib20 ile inhibisyonu ve H524 hücrelerinin, 10,72  $\mu$ M GW4869 ve 1,55  $\mu$ M Nexinhib20 ile inhibe edilmesi sonucu,

hücrelerinden salınan eksozomlar izole edildi. İzole edilen eksozomlar ile N417 ve H524 hücrelerinden salınan eksozom miktarları, kantitatif eksozom miktar tayini ile analiz edildi. Böylece, hücre gruplarına inhibitörlerin uygulanması ile Rab27A ve nSMase genlerinin baskılandığı ve bunun sonucu olarak N417 ve H524 hücre hatlarında eksozom salınım miktarının azaldığı gözlemlendi. Bu durum GW4869 ve Nexinhib20'in eksozom salınımını azalttığı gösteren önceki çalışmalar ile tutarlıdır (Trajkovic vd. 2008; Johnson vd. 2016). Eksozomların çeşitli kanser türlerinin progresyonundaki rolleri göz önüne alındığında, KHAK tedavisinde tek başına ve mevcut tedaviye ek olarak GW4869 ve Nexinhib20 uygulanmasının eksozom salınımında istatistiksel olarak anlamlı bir azalış meydana getirdiğini tespit ettik.

N417 ve H524 hücreleri mevcut tedaviye ek olarak 24 saat boyunca GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri ile inhibe edildi. KHAK hücre hatlarında sispaltin+etoposid tedavisine ek olarak uygulanan GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin, KHAK hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve apoptozu desteklediği in vitro olarak tespit edildi. Daha sonra, hücre grupları floresan mikroskopu kullanılarak analiz edildi. Mevcut tedaviye ek olarak Gw4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri ile nSMase ve Rab27A'nın hedeflenmesi, eksozom salınımını baskıladı. Bu durum, KHAK hücrelerinin progresyonunu etkileyerek, N417 ve H524 hücrelerini apoptoza yönlendirdi. KHAK tedavisinde mevcut tedaviye ek olarak GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin kullanımının sispaltin-etoposid tedavisine kıyasla apoptozu %80-85 oranında arttırdığı belirlendi.

Çalışmamızın devamında, kombine tedaviye ek olarak ve tek başına Gw4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri uygulanarak N417 ve H524 hücrelerinin kültürasyonları gerçekleştirildi. Daha sonra eksozom biyogenezinde önemli bir role sahip olan Rab27A, CD63, CD9 ve Tsg101 marker genlerinin mRNA ifade düzeylerinde değişikliklerin meydana gelmiş olduğu görüldü. KHAK hücre hatlarında, CD63, CD9 ve Tsg101 genlerinin ifade düzeylerinde anlamlı bir azalış tespit edildi ( $p < 0,0001$ ). Ayrıca, KHAK hücre hatlarına GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin uygulanmasının kanser progresyonunu etkileyerek, CDK-6 ve Siklin D1 gibi hücre siklusu genlerinin ifade düzeyleri de anlamlı bir azalış gösterdi ( $p < 0,0001$ ). Bu durum, RAB27A ve nSMase2'nin hedeflenmesinin KHAK tedavisinde gelecek vaat eden bir hedef olduğunu doğrulamaktadır.

Literatürde eksozom ve KHAK özelinde yapılan çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle, eksozomlar KHAK'de önemli bir araştırma konusu olma potansiyeline sahiptir. KHAK özelinde yapılan çalışmalarda eksozom salınımı daha önce hedeflenmemiştir.

Çalışmamızda, eksozom salınımında önemli bir role sahip olan Rab27A ve nSMase'in GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörleri yardımı ile hedeflenmesinin KHAK tedavisinde oldukça önemli olduğunu ilk defa ortaya koyuldu. Fakat eksozom salınımının hedeflenmesinin kanser progresyonuna etkileri ve KHAK tedavisindeki olası etkilerinin ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılmalıdır. Ayrıca, ilerleyen çalışmalarda deney hayvanları ve KHAK hastaları ile KHAK tedavi etkinliğinin aydınlatılmalıdır.

## 6 SONUÇ

Eksozomlar, KHAK tedavisi için bir biyobelirteç niteliği taşımaktadır. Çalışmamızda, eksozom salınımında önemli bir rol oynayan Rab27A ve nSMase' in hedeflenmesinin KHAK tedavisinde alternatif bir hedef olabileceği in vitro olarak belirlendi. Ayrıca eksozom salınımının hedeflenmesinin KHAK'de tümör gelişimini inhibe ettiği gözlemlendi. Rab27a ve nSMase'i hedefleyen Nexinhib20 ve GW4869 inhibitörlerinin yalnız veya kombinasyon şeklinde KHAK hücre hattı olan N417 ve H524 hücre hatlarına uygulanması sonucunda hücre proliferasyon hızında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş meydana getirdiği hücre proliferasyon deneyi ile belirlendi ( $p < 0,0001$ ). Ayrıca CRISPR/Cas9 aracılığı ile Rab27a ifadesinin susturulduğu hücre hatlarının tedavi sürecine etkisi belirlendi. Rab27a ifadesi susturulmuş olan hücre hatlarına ek olarak geleneksel tedavi ile birlikte GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin uygulanmasının hücre proliferasyon hızında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana getirdiği gözlemlendi ( $p < 0,0001$ ).

Nexinhib20 ve GW4869 inhibitörlerinin yalnız ve tedaviye ek uygulanması sonrasında kültürasyonları gerçekleştirilen hücrelerden salınan eksozom miktarları tespit edildi. İnhibitörlerin tek başına ve mevcut tedaviye ek olarak kullanımlarının, KHAK hücrelerinden salınan eksozom miktarlarında önemli bir azalış meydana getirdiği tespit edildi. Ayrıca GW4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin mevcut tedaviye ek olarak uygulanmasının hücre proliferasyonunu etkilediği ve hücreleri apoptoza yönlendirdiği görüldü. Mevcut tedaviye ek olarak uygulanan Gw4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin sisplatin-etoposid tedavisine kıyasla apoptozu daha fazla indüklediği belirlendi. Gw4869 ve Nexinhib20 inhibitörlerinin uygulanması sonucu eksozom salınımında rol oynayan CD9, CD63, TSG101 ve Rab27a genlerinin ifade düzeylerinde anlamlı bir azalış tespit edildi ( $p < 0,0001$ ). Bunun yanı sıra hücre siklusu genleri olan CDK6 ve Siklin D1 ifadesinin de anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi ( $p < 0,0001$ ).

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, KHAK tedavisinde yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi, KHAK'nin önlenmesine ve tedavisine yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz. Sonuçlarımız, eksozomların in vitro olarak KHAK patogenezinde önemli

rollere sahip olduğunu ve KHAK hücre hatlarında RAB27A ve nSMase genlerinin hedeflenmesinin ekzozomal yolun aktivitesini önemli ölçüde azalttığını ortaya koydu. Bu nedenle, mevcut tedavi stratejilerine ek olarak, RAB27A ve nSMase genlerinin KHAK tedavisinde potansiyel terapötik hedef olabileceğini düşünmekteyiz.

## 7 KAYNAKÇA

Abels Erik R. and Breakefield Xandra O., *Cell Mol Neurobiol* (2016) 36:301–312 DOI 10.1007/s10571-016-0366-z.

Akavia Uri David , Litvin Oren et al. An integrated approach to uncover drivers of cancer. *Cell*. 2010; 143:1005–17.

Andreu Zoraida, Yáñez-Mó María. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Front Immunol*. 2014; 5:442.

Babst M., Katzmann D.J., Estepa-Sabal E.J, et al (2002) ESCRT-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Dev Cell* 3:271–282. doi:10.1016/S1534-5807(02)00220-4.

Bishnoi Sarwan, Pittman Kenneth, et al. Small Cell Lung Cancer: Patterns of care and their influence on survival – 25 years experience of a single Australian oncology unit Asia–Pacific. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 7: 252–57.

Blanc Lionel, Vidal Michel. New insights into the function of Rab GTPases in the context of exosomal secretion. *Small GTPases*. 2018;9(1-2):95–106.

Bobbie A., Krumeich S., Royal F., Recchi C., et al. RAB27A supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Res*, 72 (2012), pp. 4920-4930.

Buschow Sonja I et al. MHC II in dendritic cells is targeted to lysosomes or T cell-induced exosomes via distinct multivesicular body pathways. *Traffic* 10, 1528–1542 (2009). This study reports that upon interaction with T cells, dendritic cells target MHC II molecules towards exosome secretion by using a multivesicular body pathway distinct from those employed by dendritic cells to target MHC II molecules towards lysosomal degradation.

Büchner Frederike L, Bueno -de-Mesquita H Bas et al. Variety in fruit and vegetable consumption and the risk of lung cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2010; 19(9): 2278–2286. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0489.

Catalano Mariadelva and O’Driscoll Lorraine. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. *JOURNAL OF EXTRACELLULAR VESICLES* 2019, VOL. 9, 1703244 <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1703244>

Cazzoli Riccardo, Buttitta Fiamma, et al. microRNAs derived from circulating exosomes as noninvasive biomarkers for screening and diagnosing lung cancer, *J. Thorac. Oncol*. 8 (9) (2013) 1156–1162.

Chairoungdua Arthit, L Smith Danielle, Pochard Pierre, Hull Michael, Caplan Michael J. Exosome release of beta-catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. **J. Cell Biol.** 190, 1079–1091 (2010).

Cheng Qian, Li Xin, Wang Yue, Dong Min, Zhan Feng-Huang, Liu Jing. The ceramide pathway is involved in the survival, apoptosis, and exosome functions of human multiple myeloma cells in vitro. **Acta Pharmacol Sin.** 2017; 39:561. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.118>.

Christopher J. Clarke et al. The extended family of neutral sphingomyelinases. **Biochemistry.** 2006; 45:11247–11256.

Demedts I.K., Vermaelen KY, Van Meerbeeck JP. Treatment of extensive-stage small cell lung carcinoma: current status and future prospects. **Eur Respir J.** 2010;35 (1):202–215. DOI: 10.1183/09031936.00105009.

Essandoh Kobina, Liwang Yang, Xiaohong Wang, et al. Blockade of exosome generation with GW4869 dampens the sepsis-induced inflammation and cardiac dysfunction. *Biochim Biophys Acta BBA- Mol Basis Dis.* 2015; 1852: 2362–2371.

Fabbri Muller, Paone Alessio, Calore Federica, et al. MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce a prometastatic inflammatory response. **Proc Natl Acad Sci USA** 2012;109: E2110–6.

Frydrychowicz M., Kolecka-Bednarczyk A., Madejczyk M., Yaşar S. & Dworacki G.. **Scandinavian Journal of Immunology**, 2015,81,2-10.

Ghandour Botheina, Dbaibo Ghassan, Darwiche Nadine. The unfolding role of ceramide in coordinating retinoid-based cancer therapy. **Biochem J.** 2021;478(19):3621–42.

Goldstraw Peter, Chansky Kari, Crowley John et al. The IASLC lung cancer staging project: proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM classification for lung cancer. **J Thorac Oncol.** 2016; 11:39–51. doi: 10.1016/j.jtho.2015.09.009.

Govindan Ramaswamy, Page Nathan, Morgensztern Daniel et al. Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. **J Clin Oncol.** 2006; 24: 4539–44.

Green Douglas R., Galluzzi Lorenzo, and Kroemer Goido, “Metabolic control of cell death,” **Science**, vol. 345, no. 6203, article 1250256, 2014.

Hendrix An, Wever Olivier De. Rab27 GTPases distribute extracellular Nanomaps for invasive growth and metastasis: implications for prognosis and treatment. **Int J Mol Sci**, 14 (2013), pp. 9883-9892.

Henne WM, Buchkovich NJ, Emr SD (2011) The ESCRT pathway. **Dev Cell** 21:77–91.

Hoshino Daisuke, Kirkbride Kellye C, Costello Kaitlin, Clark Emily S, et al. (2013) Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. **Cell Rep** 5(5):1159–1168. doi:10.1016/j.celrep.2013.10.050.

Hovanec Jan, Siemiatycki Jack, Conway David I., et al. Lung cancer and socioeconomic status in a pooled analysis of case-control studies. **PLoS One** 2018; 13: e0192999.

Hu Yibing, Yan Chang, Mu Lei, Huang Kaiyu, et al. Fibroblast-derived exosomes contribute to chemoresistance through priming cancer stem cells in colorectal cancer. ***Plos One***. 2015;10: e0125625.

International Agency for Research on Cancer (IARC). *Agents classified by the IARC Monographs volumes 1-123*. 2019

International Agency for Research on Cancer. *Cancer Incidence in Five Continents Volume X* (IARC, 2014).

International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory: cancer today. World Health Organization. <https://gco.iarc.fr/today> (accessed Jan 19, 2020).

Jadli Anshul S., Ballasy Noura, Edalat Pariya, Patel Vaibhav B., ***Molecular and Cellular Biochemistry*** (2020) 467:77–94 <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03703-z>.

Jing Xinming, Xie Mengyan, et al. ***Clin Transl Med***. 2022 May; 12(5): e780. doi: 10.1002/ctm2.780.

Johnson Jennifer L., Ramadass Mahalakshmi, He Jing et al. Identification of neutrophil exocytosis inhibitors (Nexinhibs), small molecule inhibitors of neutrophil exocytosis and inflammation: druggability of the small GTPase Rab27a. ***J. Biol. Chem.*** 291: 25965–25982 (2016).

Juan Thomas, Fürthauer Maximilian. Biogenesis and function of ESCRT-dependent extracellular vesicles. ***Semin Cell Dev Biol***. 2018; 74:66–77.

Kalemkerian Gregory P, Loo Billy W, Akerley Wallace, et al. NCCN guidelines insights: small cell lung cancer, version 2.2018. ***J Natl Compr Cancer Netw***. 2018; 16:1171–82.

Kalemkerian Gregory P. (2011). Staging and imaging of small cell lung cancer. ***Cancer Imaging***, 11(1), 253.

Kalluri Raghu, LeBleu Valerie S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. ***Science***. 2020; 367:6478.

Kaufman Elizabeth L, et al. Effect of breast cancer radiotherapy and cigarette smoking on risk of second primary lung cancer. ***J Clin Oncol***. 2008; 26(3):392-398.

Kosaka Nobuyoshi, Iguchi Haruhisa, Hagiwara Keitaro, et al. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic micrornas regulate cancer cell metastasis. ***J Biol Chem***. 2013; 288: 10849–59. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.446831>.

Kowal J., Tkach M., Thery C. (2014) Biogenesis and secretion of exosomes. ***Curr Opin Cell Biol*** 29:116–125. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.05.004>.

Lally Brian E, Urbanic James J, Blackstock A William, et.al. Small cell lung cancer: have we made any progress over the last 25 years? ***Oncologist*** 2007; 12: 1096–104.

Lam Tram Kim, Ruczinski Ingo, Helzlsouer Kathy, et. al. Cruciferous vegetable intake and lung cancer risk: A nested case-control study matched on cigarette smoking. ***Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention***. 2010; 19(10): 2534–2540. DOI: 10.1158/1055-9965.EPI-10-0475.



Landrigan, 2017 Air pollution and health **Lancet Public Health**, 2 (1) (2017), pp. e4-e5, 10.1016/S2468-2667(16)30023-8.

Li Shilin, Xu Shanshan, Liang Xiaoyu, Xue Yueguang, Mei Jie, et al. Nanotechnology: breaking the current treatment limits of lung cancer. **Adv. Health Mater.**, 10 (12) (2021) <https://doi.org/ARTN 210007810.1002/adhm.202100078>

Li Xiao-Qiu, Liu Jia-Tao, et al. **Oncotarget**. 2016 Apr 26; 7(17): 24585–24595.

Linou Natalia, Beagley Jessica, Huikuri Suvi, Renshaw Nina. Air pollution moves up the global health agenda. **BMJ**, 363 (2018), p. k4933, 10.1136/bmj.k4933

Loehrer P J, Einhorn L H, Greco F A. Cisplatin plus etoposide in small cell lung cancer. **Semin Oncol**. 1988; 15: 2- 8.

Luberto Chiara, Hassler Daniel F., et al. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, Vol. 277, No. 43, Issue of October 25, pp. 41128–41139, 2002.

Madeo Marianna, Colbert Paul L, Vermeer Daniel W, et al. Cancer exosomes induce tumor innervation. **Nat Commun**. 2018;9(1):4284.

Matakidou A, Eisen T., Houlston RS.. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. **Br J Cancer** 2005;93(7):825–33.

Matsumoto Akihiro, Takahashi Yuki, Nishikawa Makiya, et al. Accelerated growth of B16BL6 tumor in mice through efficient uptake of their own exosomes by B16BL6 cells. **Cancer Sci**. 2017; 108:1803–1810.

Metcalf Daniel, Isaacs Adrian M (2010). The role of ESCRT proteins in fusion events involving lysosomes, endosomes and autophagosomes. **Biochem Soc Trans** 38:1469–1473. <https://doi.org/10.1042/BST0381469>.

Minciacchi Valentina R, Freeman Michael R, Vizio Dolores Di. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. **Semin Cell Dev Biol**. 2015; 40:41–51 <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2015.02.010>.

Mott, T. F. (2018). Lung cancer: Management. **FP Essent**, 464, 27–30.

Pawel DJ., Puskin JS. The U.S. Environmental Protection Agency's assessment of risks from indoor radon. **Health Phys** 2004;87(1):68–74.

Peinado Héctor, Alečković Maša, et al. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. **Nat Med** 18(6):883–891.

Poggio Mauro, Hu Tianyi, Pai Chien-Chun, et al. Suppression of Exosomal PD-L1 Induces Systemic Anti-tumor Immunity and Memory. **Cell**. 2019;177(2):414–27 e413.

Rabinowits Guilherme, Gerçel-Taylor Cicek, Day Jamie M, et. al. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer, **Clin. Lung Cancer** 10 (1) (2009) 42–46.

Raiborg C., Stenmark H. (2009) The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. **Nature** 458:445– 452. doi:10.1038/nature07961

Record M. Intercellular communication by exosomes in placenta: a possible role in cell fusion? *Placenta*. 2014;35(5):297–302. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.02.009>.

Richards Katherine, E. Ann E. Zeleniak, Melissa L. Fishel, et al. Cancer-associated fibroblast exosomes regulate survival and proliferation of pancreatic cancer cells. *Oncogene*. 2017; 36: 1770–1778.

Sahu Ranjit, Kaushik Susmita, Clement Cristina C, et al. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell*. 2011;20(1):131–9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.003>.

Schimmöller F, Simon I, Pfeffer S R. Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J. Biol. Chem*. 1998; 273: 22161–22164.

Siegel Rebecca L, Miller Kimberly D, Jemal Ahmedin. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019; 69:7–34.

Singh Ramesh, Pochampally Radhika, et al. Exosome-mediated transfer of miR-10b promotes cell invasion in breast cancer. *Mol Cancer*. 2014; 13:256.

Skotland Tore, Sandvig Kirsten, Llorente Alicia. Lipids in exosomes: Current knowledge and the way forward. *Prog Lipid Res*. 2017; 66:30–41.

Stinchcombe Thomas E, Gore Elizabeth M. Limited-stage small cell lung cancer: current chemoradiotherapy treatment paradigms. *Oncologist*. 2010;15(2):187–195. doi: 10.1634/theoncologist.2009-0298.

Sung Hyuna, Ferlay Jacques et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2021; 71(3):209-49.

Tai Patricia, Tonita Jon, Yu Edward, Skarsgard David. Twenty-year follow-up study of long-term survival of limited-stage small-cell lung cancer and overview of prognostic and treatment factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56:626.

Tallon Carolyn, Hollinger Kristen R., Pal Arindom, Bell Benjamin J., Rais Rana, Tsukamoto Takashi, Witwer Kenneth W., Haughey Norman J., Slusher Barbara S., *Drug Discovery Today*, Volume 26, Number 7 d July 2021.

Tchounwou and Dasari, *Eur J Pharmacol*. Author manuscript; available in PMC 2015 October 05.

Thurston George D., et al., A joint ERS/ATS policy statement: what constitutes an adverse health effect of air pollution? An analytical framework *Eur. Respir. J.*, 49 (1) (2017), 10.1183/13993003.00419-2016.

Trajkovic Katarina, Hsu Chieh, Chiantia Salvatore, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 2008;319(5867):1244–1247.

Travis WD., Brambilla E., et al. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. *IARC Pres*, Lyon, 2004:12, s.342.

Trimmer Elizabeth E., Essigmann John M. Cisplatin Essays **Biochem.**, 34 (1999), pp. 191-211.

Türkiye Kanser İstatistikleri 2017. T.C Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Ankara:2021.

Wang Jin-Song, Wang Fu-Bin, Zhang Qiang-Ge, Shen Zhen-Zhou, Shao Zhi-Ming. Enhanced expression of RAB27A Gene by breast cancer cells promoting invasiveness and the metastasis potential by secretion of insulin-like growth factor-II **Mol Cancer Res**, 6 (2008), pp. 372-382

Wang Peng, Song Jin H, Song Doyoun K, Zhang Jing, Hao Chunhai. Role of death receptor and mitochondrial pathways in conventional chemotherapy drug induction of apoptosis. **Cell Signal**. 2006; 18:1528–1535. doi: 10.1016/j.cellsig.2005.12.004.

Webber J P, Spary L K, Sanders A J *et al.* (2015) Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. **Oncogene** 34(3):290–302 doi:10.1038/onc.2013.560.

Wiklander Oscar P B, Nordin Joel Z *et al.* Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting **J. Extracell. Vesicles**, 4 (1) (2015), p. 26316, 10.3402/jev.v4.26316

Wolf, P. The nature and significance of platelet products in human plasma. **Br. J. Haematol.** 13, 269–288 (1967).

Xiao Xia, Yu Shaorong, Li Shuchun, *et al.* Exosomes: decreased sensitivity of lung cancer A549 cells to cisplatin. **PLoS One** 2014;9: e89534.

Yanaihara Nozomu, Caplen Natasha, Bowman Elise, *et al.* Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis, **Cancer Cell** 9 (3) (2006) 189–198.

Zhanga Huarui, Lua Jun, Liua Jin, Zhanga Ge and Lu Aiping, **JOURNAL OF ENZYME INHIBITION AND MEDICINAL CHEMISTRY** 2020, VOL. 35, NO. 1, 1322–1330 <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1754814>.

Zhang Wenchao, Gou Panhong, Dupret Jean-Marie, Chomienne Christine, Rodrigues-Lima Fernando. Translational **Oncology** 14 (2021) 101169.

Zhang Yuan, Liu Yunfeng, Liu Haiying and Tang Wai Ho. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential **Cell Biosci.** 2019; 9: 19.

Zhao Wei, Cong Ying, *et al.* Challenges and potential for improving the drug ability of podophyllotoxin-derived drugs in cancer chemotherapy. **Nat. Prod. Rep.** 2020;8 doi: 10.1039/d0np00041h.

Web 1: Cancer Today [Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; [Erişim tarihi 13 Mart 2021]. Erişim adresi: [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multibars?v=2020&mode=cancer&mode\\_population=countries&population=900&populations=792&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=10&group\\_cancer=1&include\\_nmsc=0&include\\_nmsc\\_other=1&type\\_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type\\_sort=0&type\\_nb\\_items=%257B%2522top%2](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multibars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=792&key=total&sex=2&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmsc=0&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2)

522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D

Web 2: GBD 2019 Tobacco Collaborators. Spatial, temporal, and demographic patterns in prevalence of smoking tobacco use and attributable disease burden in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 397, 2337–2360 (2021).

Web 3: World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project Expert Report 2018. Diet, Nutrition, Physical Activity and Lung Cancer. Available at [dietandcancerreport.org](http://dietandcancerreport.org).

Web 4: WHO Classification of Tumours Editorial Board. Thoracic Tumours. 5th ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2021.