TÜLAY MUTLU

VETERİNERLİK HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ 2025

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE CAPSAİCİN/CİSPLATİN KOMBİNASYONUNUN IN VITRO VE IN VIVO ZENOGREF TÜMÖR MODELİ ÜZERİNE ETKİLERİ

TÜLAY MUTLU

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2025

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA
BİLİM DALI

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE CAPSAİCİN/CİSPLATİN KOMBİNASYONUNUN IN VITRO VE IN VIVO ZENOGREF TÜMÖR MODELİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Tülay MUTLU

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:
Doç. Dr. Sabire GÜLER

Proje No-BUAP(V)-2020/3

BURSA-2025

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "**Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Capsaicin/Cisplatin Kombinasyonunun *in vitro* ve *in vivo* Zenogref Tümör Modeli Üzerine Etkileri**" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Tülay MUTLU

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

10/01/2025

Adı Soyadı: Tülay MUTLU

Anabilim Dalı: Veterinerlik Histoloji ve Embriyoloji

Tez Konusu: **Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Capsaicin/Cisplatin Kombinasyonunun *in vitro* ve *in vivo* Zenogref Tümör Modeli Üzerine Etkileri**

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

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Doç. Dr. Sabire GÜLER

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN ..... **II**
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU ..... **IV**
İÇİNDEKİLER ..... **V**
TÜRKÇE ÖZET ..... **VI**
İNGİLİZCE ÖZET ..... **VII**
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ ..... **VIII**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. Akciğer Kanseri 3
2.2. Cisplatin 7
2.3. Capsaicin 10
2.3.1. CAP'ın Apoptoz İndüksiyonu 14
3. GEREÇ VE YÖNTEM **16**
3.1. Hücre Kültürü 16
3.1.1. Hücrelere CAP ve Cis Uygulaması 16
3.1.2. Hücre Proliferasyonun Belirlenmesi 16
3.1.2.1. Sulforhodamin B Analizi 17
3.1.2.2. Ki-67 Ekspresyonunun İmmunositokimya Metodu ile Belirlenmesi 17
3.1.2.3. Ki-67 Ekspresyonunun Western Blot Metodu ile Belirlenmesi 17
3.1.3. Apoptozisin Belirlenmesi 19
3.1.3.1. Cleaved Caspase-3 Ekspresyonunun Immunositokimya Metodu ile Belirlenmesi 19
3.2. Fare Akciğer Kanser Modelinde CAP ve Cis'in Test Edilmesi 19
3.2.1. Deney Hayvanlarının Temini, Bakımı ve Zenograf Model Oluşturma 19
3.2.2. Vücut Ağırlık, Tümör Çapı ve Ağırlıklarının Ölçülmesi 21
3.3. Doku Kesitlerinin Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme için Hazırlanması 22
3.3.1. Doku Kesitlerinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi 22
Tümör dokuları, %10 tamponlu-nötr formaldehit tespit solusyonunda tespit edildikten sonra rutin histolojik prosedür uygulanarak genel yapının gözlenmesi ve immunohistokimyasal değerlendirmeler için parafinde bloklandı. Parafine gömülen dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Crosmann'ın modifiye üçlü boyası ile boyanarak Nikon Eclipse 80i mikroskopta incelenerek, fotoğrafları çekildi. 22
3.3.2. Tümör Dokusunda Hücre Proliferasyonun Belirlenmesi 22

3.3.3. Tümör Dokusunda Apoptozisin Belirlenmesi 23
3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiklerinin Yapılması 23
4. BULGULAR 25
4.1. Hücre Proliferasyon Sonuçları 25
4.2. Apoptozis Bulguları 30
4.3. Zenogref Tümör Modelinde Yapılan Uygulamaların Değerlendirilmesi 32
4.3.1 Tümör Dokusunda Histopatolojik Analiz 32
4.3.2. Tümör Dokusunda Proliferasyon ve Apoptozis Bulgularının İmmunhistokimya ile Belirlenmesi 33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 36
6. KAYNAKLAR 43
7. SİMGELER VE KISALTMALAR 50
8. EKLER 51
EK 1: Şekil Listesi 51
EK 2: Tablo Listesi 51
9. TEŞEKKÜR 52
10. ÖZGEÇMİŞ 53

TÜRKÇE ÖZET

Capsaicin (CAP), kırmızı bibere acılık veren başlıca bileşenidir. Anti-inflamatuar, analjezik, antioksidan ve anti-obezite özelliklerinin yanı sıra, son yıllarda çeşitli kanser türlerinde antikanser etkileri de araştırılmaktadır. Cisplatin (Cis) ise Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) tedavisinde yaygın olarak kullanılan, DNA hasarına yol açarak hücre ölümünü indükleyen ve bu yolla tümör büyümesini baskılayan platin bazlı bir kemoterapötik ajandır. Bu tez çalışmasında, CAP ve Cis kombinasyonunun KHDAK hücreleri üzerindeki etkilerini hem *in vitro* hem de *in vivo* zenogref tümör modellerinde değerlendirmek ve bu kombinasyonun antikanser potansiyelini ortaya koymak amaçlanmıştır.

Hipotezimizin testi için model olarak KHDAK hücre hattı A549 kullanıldı. Birincil olarak CAP'ın farklı dozlarının Cis ile kombinasyon halinde kullanımında anti-proliferatif ve apoptotik etkileri *in vitro* olarak araştırıldı. Bunun için, A549 hücreleri 48 saat boyunca DMSO, farklı dozlarda CAP, Cis ve Cis/CAP kombinasyonu ile muamele edildi. Uygulamayı takiben Sulforhodamine B Analizi (SRB) yapıldı, hücrelerde hem immünositokimya hem de Western Blot analizi ile apoptozis ve proliferasyon değerlendirildi. *in vitro* sonuçların doğrulanması için *in vivo* akciğer zenogref fare modeli oluşturuldu. Bu amaçla 20 adet, 4-6 haftalık CD-1 nude ırkı erkek fareler kullanıldı. Deri altı flank bölgelerinde tümör oluşumundan sonra CAP, Cis ve Cis/CAP tedavileri uygulanan farelerin primer tümör odakları deneyin sonlandırıldığında çıkarılarak histopatolojik analiz için formalinle fikse edilip parafine gömüldü. Doku kesitleri hem histopatolojik olarak hem de Ki-67 ve Cleaved Caspase-3 ekspresyonları yönünden değerlendirildi.

Yapılan analizler sonucu, düşük doz CAP'ın hücre proliferasyonunu arttırdığı ($p<0,05$), ayrıca Cis uygulamasının hücre proliferasyonunu önemli oranda azalttığı fakat bu azalmanın CAP kombinasyonu sonrasında artan dozlarda devam ettiği gözlendi. Apoptozis bulguları, Ki-67 sonuçlarını desteklerken *in vitro* bulgulara göre en etkili uygulama 150 µM Cis/CAP olarak belirlenmiştir. *in vivo* bulgular da kombine tedavinin tek tek CAP ve Cis uygulamasına göre daha etkili olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, CAP ve Cis kombinasyonu, KHDAK hücrelerinde ve tümör modelinde proliferasyonu baskılama açısından additif bir etki sergilemiştir. Bu bulgular, CAP'ın kemoterapötik tedavi rejimlerinde tamamlayıcı bir ajan olarak potansiyel kullanımına işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer Kanseri, Apoptozis, Capsaicin, Cisplatin

İNGİLİZCE ÖZET

Effects of Capsaicin/Cisplatin Combination on *in vitro* and *in vivo* Zenograft Tumor Model in Non-Small Cell Lung Cancer

Capsaicin (CAP) is an alkaloid and the main pungent component of red peppers. In addition to its anti-inflammatory, analgesic, antioxidant, and anti-obesity properties, its anticancer effects in various cancer types have been investigated in recent years. Cisplatin (Cis), on the other hand, is a platinum-based chemotherapeutic agent widely used in the treatment of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). It induces cell death by causing DNA damage, thereby suppressing tumor growth. This thesis aims to evaluate the effects of the CAP and Cis combination on NSCLC cells both in *in vitro* and *in vivo* xenograft tumor models and to reveal the anticancer potential of this combination.

The NSCLC cell line A549 was used as a model to test our hypothesis. Primarily, the anti-proliferative and apoptotic effects of different doses of CAP in combination with Cis were investigated *in vitro*. For this purpose, A549 cells were treated with DMSO, varying doses of CAP, Cis, and the Cis/CAP combination for 48 hours. Following the treatment, Sulforhodamine B (SRB) assay was performed, and apoptosis and proliferation were evaluated via immunocytochemistry and Western blot analysis. To validate the *in vitro* findings, an *in vivo* lung xenograft mouse model was established. For this, 20 male CD-1 nude mice, aged 4–6 weeks, were used. After tumor formation in the subcutaneous flank region, CAP, Cis, and Cis/CAP treatments were administered. At the end of the experiment, the primary tumor tissues were excised, fixed in formalin, and embedded in paraffin for histopathological analysis. The tissue sections were evaluated both histopathologically and for Ki-67 and Cleaved Caspase-3 expressions.

The analyses revealed that low-dose CAP increased cell proliferation ($p < 0,05$), while Cis significantly reduced cell proliferation. This reduction persisted with increasing doses of the CAP combination. Apoptotic findings supported the Ki-67 results, and the most effective treatment was identified as 150 µM Cis/CAP based on *in vitro* findings. Similarly*, in vivo* results demonstrated that the combined treatment was more effective than individual CAP or Cis treatments.

In conclusion, the CAP and Cis combination exhibited an additive effect in suppressing proliferation in NSCLC cells and tumor models. These findings suggest that CAP may have potential as an adjunctive agent in chemotherapeutic treatment regimens.

Keywords: Lung Cancer, Apoptosis, Cisplatin, Capsaicin

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ



Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum **"Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Capsaicin/Cisplatin Kombinasyonunun *in vitro* ve *in vivo* Zenograf Tümör Modeli Üzerine Etkileri"** başlıklı tez **3.** Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, ülkemizde ve dünyada kansere bağlı ölüm sebeplerinde ilk sıralarda yer almakta olup günümüzde insidansı artmaya devam etmektedir. Birçok ülkede görülme sıklığı ile birlikte hasta sağkalım oranı da giderek artmaktadır. Ancak bu vakaların önemli bir kısmı geç evrelerde teşhis edilmektedir ve hastaların %52,7'sinde tanı anında uzak metastaz görülmektedir (Bade & Cruz, 2020). Akciğer kanseri tedavisinde cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi, küçük moleküller ya da farklı bitkisel ekstraktlarla birlikte hedeflenen sentetik letal etkileşim ya da sinerjik/additif etkili kombinasyonların kullanımı giderek önem kazanmaktadır.

Cisplatin (Cis), özellikle akciğer kanseri gibi hızlı büyüyen tümörlerde DNA replikasyonunu bozarak hücre ölümüne neden olan bir kemoterapi ajanıdır (Lebwohl & Canetta, 1998). Hem küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) hem de küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)'nde platin bazlı kombinasyon rejimlerinde standart tedavi olarak kullanılmaktadır. KHDAK tedavisinde Cis, genellikle gemsitabin, paklitaksel veya pemetreksed gibi diğer kemoterapötik ajanlarla kombinasyon halinde uygulanır. Bu kombinasyonlar, hastalığın evresine ve hastanın genel durumuna bağlı olarak seçilir. Özellikle ileri evre KHDAK'da, Cis bazlı kemoterapi rejimleri, hastaların genel sağkalımını ve yaşam kalitesini iyileştirmede önemli bir rol oynamaktadır (Scagliotti ve ark., 2023). Bununla birlikte, Cis tedavisi, ototoksisite, nefrotoksisite ve miyelosupresyon gibi ciddi yan etkilere neden olabilir (Rybak, Whitworth, Mukherjea, & Ramkumar, 2007). Bu yan etkiler, tedaviye devam edebilme kapasitesini sınırlayabilir ve hastaların yaşam kalitesini olumsuz etkileyebilir. Ayrıca, bazı hastalarda Cis direnci gelişebilir, bu da tedavinin etkinliğini azaltır (Galluzzi ve ark., 2012).

Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide-C18H27NO3, CAP), homovanilik asit türevi ve dünya çapında birçok kültürde baharat olarak tüketilen kırmızı biberlerin ana acılık bileşeni olan bir alkaloittir. Tıbbi amaçlı olarak kullanımı çok uzun yıllara dayanmakla birlikte son zamanlarda farmakolojik olarak anti-inflamatuar, analjezik, anti-oksidan ve anti-obezite özellikleriyle araştırılmaktadır (Galano & Martinez, 2012; Kang ve ark., 2007; Kim ve ark., 2003). Ayrıca, çeşitli kanser türlerine karşı anti-

kanser etkiler göstermektedir (Blay ve ark., 2012).

CAP, hücre içi sinyal yollarını modüle ederek kanser hücrelerinde apoptozu indükler. Özellikle mitokondriyal yolda rol oynayarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırır ve mitokondriyal membran potansiyelini düşürür. Bu süreç, kaspaz enzimlerinin aktivasyonuna ve sonuç olarak hücre ölümüne yol açar. Ayrıca, CAP, Transient reseptör potansiyel vanilloid 1 (TRPV1) reseptörleri aracılığıyla kalsiyum iyonlarının hücre içine girişini artırarak apoptotik yolları tetikler (Hanahan & Weinberg, 2011).

CAP'ın antikanser etkileri, çeşitli kanser türlerinde incelenmiştir. Prostat kanser hücrelerinde CAP, hücre döngüsünü durdurarak ve apoptozu teşvik ederek tümör büyümesini inhibe eder (Kim ve ark., 2015). Kolorektal kanser hücrelerinde ise β-katenin sinyal yolunu down-regüle ederek hücre proliferasyonunu azaltır (Lee ve ark., 2012). Ayrıca, meme, pankreas ve lösemi gibi diğer kanser türlerinde de benzer anti-kanser etkiler rapor edilmiştir (Clark & Lee, 2016). CAP'ın akciğer kanserindeki etkileri üzerine yapılan araştırmalar, bu bileşiğin hücre proliferasyonunu inhibe edebileceğini ve apoptozu indükleyebileceğini göstermektedir. Özellikle, CAP'ın KHDAK hücrelerinde ROS üretimini artırarak ve mitokondriyal disfonksiyona neden olarak hücre ölümünü tetiklediği bildirilmiştir (Chakraborty ve ark., 2014; Lau ve ark., 2014). Özellikle KHDAK gibi kanser türlerinde CAP'ın terapötik potansiyeli, gelecekteki klinik uygulamalar için umut vaat etmektedir. Sunulan tez çalışmasının amacı, KHDAK'ta Cis/CAP kombinasyonunun KHDAK A549 hücreleri üzerindeki sinerjik/additif etkilerini hem *in vitro* hem de *in vivo* zenogref tümör modellerinde değerlendirmek, bu kombinasyonun anti-kanser potansiyelini ortaya koymak ve elde edilen bulgularla ileri çalışmalar için yeni terapötik stratejiler geliştirilmesine katkı sağlamaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, dünya genelinde kansere bağlı ölümlerin önde gelen nedenlerinden biridir (Siegel ve ark., 2023). GLOBOCAN 2018 verilerine göre 2,09 milyon yeni vaka (toplam kanser vakalarının %11,6'sı) ve 1,76 milyon ölüm (toplam kanser ölümlerinin %18,4'ü) rapor edilmiştir (Bray ve ark., 2018). Farklı çevresel faktörlerin tetiklediği bu kanser türü, her yıl artan insidans oranlarıyla dikkat çekmekte ve hem kadınlarda hem de erkeklerde benzer prevalans ve mortalite oranlarına sahip olduğu belirtilmiştir (Bade & Cruz, 2020). Türkiye'de ise akciğer kanseri, tüm yaş grupları içinde en sık görülen kanser türü olup, kanser ölümlerinde ilk sırada yer almaktadır. Türkiye Kanser İstatistikleri Raporu'na göre, Türkiye'de erkeklerde en sık görülen kanser türü akciğer kanseri iken kadınlarda akciğer kanseri 5. sırada yer almaktadır. Sağlık Bakanlığı'nın 2018 verilerine göre, Türkiye'de 30.078 yeni akciğer kanseri vakası tespit edilmiştir. Bu vakaların önemli bir kısmı geç evrelerde teşhis edilmekte olup, hastaların %52,7'sinde tanı anında uzak metastaz görülmektedir.

Akciğer dokularında başlayan ve kontrolsüz hücre büyümesi ile karakterize olan bu kanser türü, çoğunlukla sigara dumanına maruz kalma ile ilişkilendirilir. Sigara, akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %85'inden sorumlu olduğu için, en önemli risk faktörlerinden biri olarak kabul edilir ve içerdiği çok sayıda kanserojen maddeyle akciğer kanserinin en önemli nedenidir. Hem aktif hem de pasif içicilik akciğer kanseri riskini artırır (Siegel, Miller & Jemal, 2020; Warner & Mendez, 2010). Ayrıca, kentsel alanlarda yüksek düzeyde hava kirliliğine maruz kalmak, akciğer kanseri riskini artırabildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Thandra ve ark., 2021). İnşaat sektörü, madencilik ve kimya endüstrisinde çalışanlar arasında asbest, radon ve benzen gibi zararlı maddelere maruz kalmak, akciğer kanseri insidansını artırmaktadır (Haugen & Mollerup, 2008). Kanserojen maddelere mesleki maruziyetin, küresel akciğer kanseri vakalarının %5-10'unu oluşturduğu tahmin edilmektedir ve bu vakalarda asbest en yaygın etkendir (Devesa ve ark., 2005). Bunlarla birlikte, genetik faktörler, özellikle tütün içmeyenlerde akciğer kanserinin ortaya çıkışında önemli bir rol oynar. Ailede akciğer kanseri öyküsü olan bireyler, artan risk altındadır (Schwartz, 2016). Diyet ve

yaşam tarzı da akciğer kanseri etyolojisinde etkendir. Diyetteki antioksidan eksiklikleri ve obezite de akciğer kanseri risk faktörleri arasında sayılmaktadır. Gnagnarella ve ark. (2018), yaptıkları bir meta-analizde; yüksek kırmızı et tüketiminin (göreceli risk, 1,24) akciğer kanseri riskini önemli ölçüde (%24) artırdığını, ancak diğer et veya balık türlerinin veya heterosiklik aminlerin yüksek tüketiminin kanser riskini artırmadığından bahsedilmektedir.

Akciğer kanserinin prognozu, tanı anındaki evresine bağlı olarak büyük ölçüde değişir. Erken evrelerde tanı alan hastaların prognozu daha iyi olsa da hastaların büyük bir kısmı ileri evrelerde teşhis edilmektedir. Örneğin, KHDAK için 5 yıllık sağkalım oranları evre I hastalarda %70'e kadar çıkabilirken, metastatik hastalıklarda bu oran %5'in altına düşmektedir (Howlader ve ark., 2020). KHAK'ta ise genellikle tanı konulduğunda hastalık ileri evreye ulaşmış olduğundan sağkalım oranları daha düşüktür.

Akciğer kanseri, histolojik ve moleküler özelliklerine göre iki ana başlık altında sınıflandırılır:

a) Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK): Akciğer kanserlerinin yaklaşık %85'ini oluşturur. Adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom, büyük hücreli karsinom ve diğer nadir görülen histolojik alt tipler olmak üzere farklı alt tiplere ayrılır (Travis ve ark., 2015).

Adenokarsinom: KHDAK içinde en sık rastlanan alt tip olup tüm akciğer kanserlerinin %40'ından fazlasını oluşturur. Bu tür, sıklıkla periferik bölgelerde görülür ve glandüler diferansiyasyon veya müsin üretimi ile karakterizedir. DSÖ'nün 2015 sınıflandırmasına göre adenokarsinomlar; lepidik, asinöz, papiller, mikropapiller ve solid adenokarsinom gibi alt gruplara ayrılmıştır. Bu alt gruplar prognostik öneme sahiptir; örneğin lepidik adenokarsinomlar daha iyi bir prognoza sahipken mikropapiller ve solid alt tipler daha kötü bir seyir gösterir (Yanagava ve ark., 2013).

Skuamöz Hücreli Karsinom: Akciğer kanserlerinin yaklaşık %20'sini

oluşturur. Genellikle büyük hava yollarının yakınında merkezi bölgelerde yer alır. Histolojik olarak keratinizasyon, intersellüler köprüler ve solid büyüme paterni ile ayırt edilir. Keratinize ve keratinize olmayan alt tiplere ayrılır, ancak alt tiplerin prognostik açıdan belirgin bir fark yaratmadığı belirtilmiştir. Sigara içiciliği ile güçlü bir ilişkisi vardır (Zappa & Mousa, 2016).

Büyük Hücreli Karsinom: KHDAK alt türleri arasında nadir görülür (%3'ten az). Adenokarsinom veya skuamöz hücreli karsinom diferansiyasyonu göstermeyen, büyük ve poligonal hücrelerden oluşan, solid bir büyüme paterni sergiler. Çoğu büyük hücreli karsinom, immunohistokimyasal incelemelerle adenokarsinom veya skuamöz hücreli karsinom olarak yeniden sınıflandırılabilir (Sholl, 2014).

Nadir Görülen KHDAK Alt Tipleri:

Adenoskuamöz Karsinom: Hem adenokarsinom hem de skuamöz hücreli karsinom özelliklerini barındırır. Bu tümörlerin en az %10'u her iki bileşeni içerir. Prognozu genellikle kötü olup tedaviye yönelik mutasyonlar adenokarsinomlar ile benzerdir (Mordant ve ark., 2013; Travis ve ark., 2015).

Pleomorfik, İğsi Hücreli ve Dev Hücreli Karsinomlar: Bu tümörler, sarkomatöz bir diferansiyasyon gösterir ve düşük epitelyal belirteç ekspresyonu sergiler (Travis ve ark., 2015).

Karsinosarkom: Epitelyal ve mezenkimal bileşenleri içerir. Radyolojik ve patolojik özellikleri diğer alt tiplere göre farklılık gösterir (Travis ve ark., 2015).

Nöroendokrin Tümörler: Bu grup, iyi diferansiye tipik ve atipik karsinoid tümörlerden, kötü diferansiye KHAK ve büyük hücreli nöroendokrin karsinom (LCNEC) gibi yüksek dereceli tümörlere kadar uzanır. Tipik karsinoidler düşük proliferasyon oranına sahipken, atipik karsinoidler daha yüksek mitotik aktivite ve nekroz gösterir. KHAK ve LCNEC, agresif klinik seyir ve kötü prognoz ile karakterizedir (Litzky, 2010).

b) Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK): Akciğer kanserlerinin yaklaşık %10-15'ini oluşturur. KHAK çok hızlı büyüme ve erken metastaz yapma eğiliminde olan agresif bir kanser türüdür. Mikroskopik olarak küçük, hiperkromatik nükleuslara ve az miktarda sitoplazmaya sahip hücrelerden oluşur. Nöroendokrin diferansiyasyonu gösteren KHAK, genellikle metastatik aşamada teşhis edilir ve prognozu kötüdür. (Westcott & To, 2013).

Akciğer kanserinin tedavi stratejileri, kanserin evresine ve tipine bağlı olarak değişiklik gösterir. Akciğer kanseri evrelemesi, hastalığın ne kadar ilerlediğini belirlemek ve uygun tedavi stratejilerini seçmek için kritik bir adımdır. Akciğer kanserinin evresi, tümörün boyutu, komşu dokulara yayılımı, lenf nodu tutulumu ve uzak organlara metastaz yapıp yapmadığına göre belirlenir (Goldstraw ve ark., 2016). Tedavi yaklaşımları arasında cerrahi, kemoterapi, radyoterapi, immünoterapiler, hedefe yönelik tedaviler, küçük moleküller ve bitkisel ekstraktlarla desteklenen sentetik letal etkileşimlerin yanı sıra sinerjik veya additif etkili kombinasyonların uygulanması bulunmaktadır (Auperin ve ark., 2010; Hoy, Lynch, & Beck, 2019). İleri evre akciğer kanserinde kemoterapi, uzun yıllardır standart tedavi yaklaşımı olarak kullanılmakta olup, son dönemde hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapilerle kombine edilerek etkinliği artırılmaya çalışılmaktadır. Bunun yanı sıra, bitki bazlı bileşenlerin kemoterapi ile kombinasyonları da tedavi sonuçlarını iyileştirme ve toksisiteyi azaltma potansiyelleri nedeniyle araştırma konusu olmuştur (Gadgeel ve ark., 2012).

Hedefe yönelik tedaviler, kanser hücrelerinin belirli moleküler yolaklarını inhibe ederek etki göstermekte ve özellikle epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) mutasyonu pozitif KHAK gibi belirli alt gruplarda umut vaat etmektedir. EGFR tirozin kinaz inhibitörlerinin kemoterapi ile kombinasyonu, progresyonsuz sağkalım süresini artırmak ve tedaviye direnç gelişimini geciktirmek amacıyla incelenmiştir. Aumolertinib gibi üçüncü nesil EGFR inhibitörlerinin, geleneksel kemoterapi ile birlikte kullanımında etkili sonuçlar elde edilmiş ve yan etki profillerinin yönetilebilir olduğu gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2023). Benzer şekilde, anjiyogenez inhibitörleri

ve programlanmış hücre ölüm proteini-1 ve programlanmış hücre ölüm ligandı-1 (PD-1/PD-L1) immünoterapileri ile kemoterapinin kombinasyonu, özellikle ileri evre hastalarda sağkalımı anlamlı ölçüde uzatmıştır (Shirley & Keam, 2022).

Kemoterapinin bitkisel bileşenlerle kombinasyonu da son yıllarda yoğun araştırmaların odağı haline gelmiştir. Özellikle, bitki türevli polifenoller, alkaloidler ve flavonoidler gibi doğal bileşikler, antikanser etkileri ve düşük toksisite profilleri nedeniyle dikkat çekmektedir. Bu tür stratejiler, kemoterapinin etkinliğini artırırken, sağlıklı hücrelerdeki toksisiteyi azaltabilir ve yan etki yönetiminde katkı sağlayabilir (Sen ve ark. 2011).

Kemoterapinin hedefe yönelik tedaviler ve bitkisel bileşenlerle kombinasyonlarının etkinliğini değerlendiren klinik ve preklinik çalışmalar, tedavide çok boyutlu bir yaklaşım benimsenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu kombinasyonlar, kemoterapiye bağlı yan etkilerin yönetiminde daha fazla esneklik sağlamakla kalmamakta, aynı zamanda tümör mikroçevresi üzerindeki etkileri optimize ederek tedaviye direnç mekanizmalarını da engellemektedir (Wang, Jiang & Guo, 2020). Gelecekte, kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarının artmasıyla birlikte, bu kombinasyonların bireyselleştirilmiş protokoller kapsamında daha etkin şekilde kullanılabileceği öngörülmektedir. Özellikle farmakogenetik ve farmakodinamik verilerin entegrasyonu ile hasta spesifik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi, akciğer kanseri tedavisinde yeni ufuklar açabilir (Cromie ve ark. 2015; Hu ve ark. 2016).

Sonuç olarak, kemoterapinin hedefe yönelik tedaviler ve bitkisel bileşenlerle kombinasyonu, akciğer kanseri tedavisinde yenilikçi ve umut vaat eden bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir. Bu alanda gerçekleştirilen kapsamlı araştırmalar, tedavi etkinliğini artırma, toksisiteyi azaltma ve hasta yaşam kalitesini iyileştirme hedeflerine ulaşmada önemli katkılar sağlamaktadır.

2.2. Cisplatin

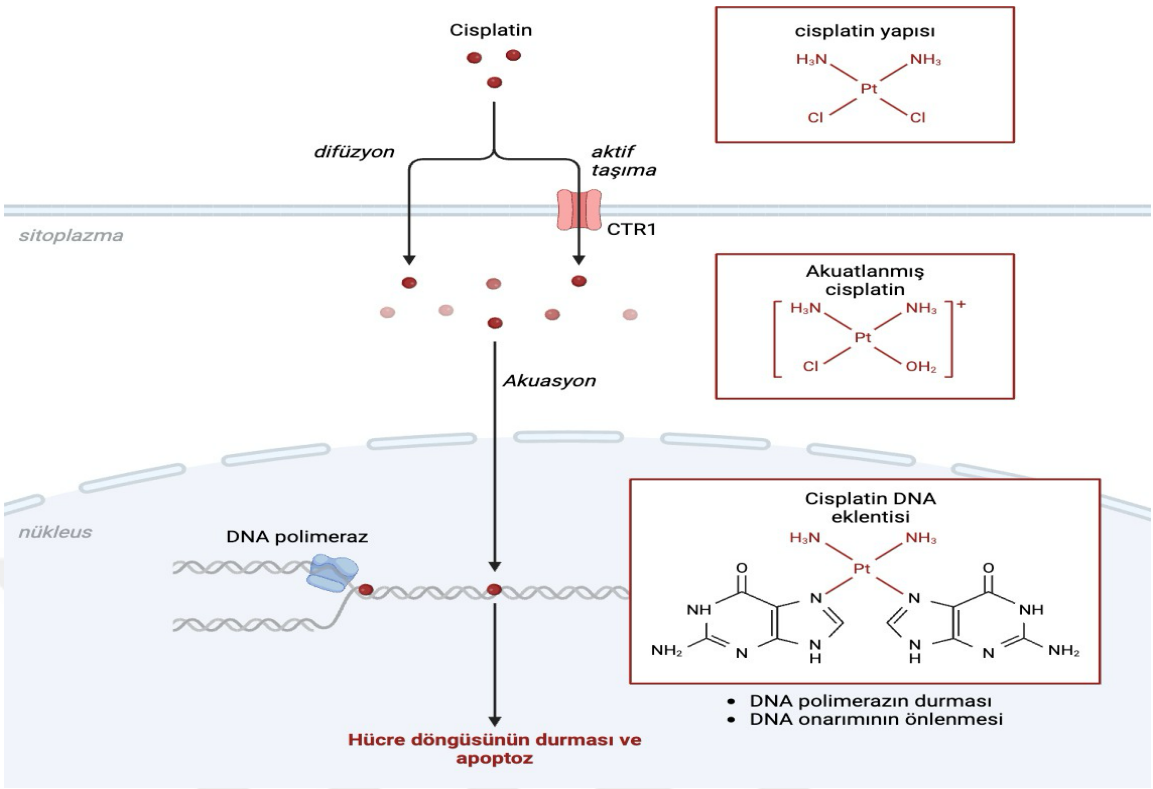
Cisplatin (cis-diaminodichloroplatinum, CDDP, Cis), antineoplastik bir ajan olup platin içeren kemoterapi ilaçları sınıfına aittir. 1960'ların sonlarında keşfedilen ve

1978'de kanser tedavisinde kullanılmak üzere onaylanan Cis, günümüzde geniş bir yelpazedeki solid tümörlerin tedavisinde etkin bir ajan olarak kullanılmaktadır (Lebwohl & Canetta, 1998). Kimyasal yapısı itibariyle, platin metaline bağlı iki amonyak ve iki klor iyonu içerir. Bu yapı, DNA ile etkileşimini mümkün kılar ve hücre döngüsünün durmasına veya hücre ölümüne yol açar.

Cis'in başlıca etki mekanizması, DNA iplikçikleri arasında çapraz bağlar (*cross-linking*) oluşturarak DNA replikasyonunu ve transkripsiyonu inhibe etmesidir (Jamieson & Lippard, 1999). Cis'in kanser hücreleri üzerindeki etkisi, hücre içi ortamda yapısal değişikliklere uğrayarak DNA ile etkileşime girmesine dayanır.

Cis dolaşımda stabildir çünkü kan plazmasındaki yüksek klor iyonu konsantrasyonu (~100 mM) ilacı stabil tutar. Hücre içine girdiğinde, düşük klor iyonu konsantrasyonu (~4-12 mM) nedeniyle, akuasyon adı verilen bir reaksiyonda klor iyonu yerine bir su molekülü bağlanır (Şekil 1.). Bu süreç Cis'i daha reaktif hale getirir (Jung & Lippard, 2007). Reaktif Cis DNA üzerindeki pürin bazlarının (adenin ve guanin) N7 azotu ile bağlanır. Özellikle komşu guanin kalıntıları arasında çapraz bağlar (*interstrand* veya *intrastand* çapraz bağlanma) oluşturur. Bu bağlar DNA'nın replikasyonunu ve transkripsiyonunu engeller ve hücre döngüsünde duraklamalara neden olur (Basu & Krishnamurthy, 2010). DNA hasarının onarılamaması hücre içinde apoptotik yolları aktive eder. Hücre ölümü özellikle p53 gibi genler aracılığıyla gerçekleşir (Amaral ve ark., 2010). Ayrıca Cis oksidatif stresi artırarak mitokondriyal hasara neden olabilir. Bu da glutatyon yoksunluğu ve lipid peroksidasyonu gibi süreçler yoluyla hücre ölümüne katkıda bulunur (Marullo ve ark., 2013).

Cis pasif difüzyon ve aktif taşıma (örn. bakır taşıyıcı protein CTR1) yoluyla hücre içine alınır. Direnç geliştiren hücrelerde CTR1 ekspresyonu azalabilir ve glutatyon gibi moleküller Cis'i bağlayarak etkisini nötralize edebilir (Holzer ve ark., 2006).



Şekil 1. Cisplatin'in yapısı ve etki meknizması (Browning ve ark., 2017'den uyarlanmıştır).

2.2.1. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanserinde Cisplatin Kullanımı

KHDAK tedavisinde Cis genellikle gemsitabin, paklitaksel veya pemetreksed gibi diğer kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanılmaktadır. Bu kombinasyonlar hastalığın evresine ve hastanın genel durumu veya tedaviye yanıt potansiyeline bağlı olarak seçilir (Scagliotti ve ark., 2008). Özellikle ileri evre KHDAK'de, Cis bazlı kemoterapi rejimleri hastaların genel sağkalımını ve yaşam kalitesini iyileştirmede önemli bir rol oynamaktadır (Schiller ve ark., 2002).

Cis'in KHDAK tedavisindeki etkinliği, çok sayıda klinik çalışma ile kanıtlanmıştır. Adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom gibi KHDAK alt tiplerinde, Cis bazlı kemoterapinin sağkalımı artırdığı ve hastalığın progresyonunu yavaşlattığı gösterilmiştir (Schiller ve ark., 2002). Planchard ve ark. (2018) yaptıkları bir faz III çalışmasında, metastatik KHDAK hastalarında Cis ve pemetrexed kombinasyonunun, platin bazlı diğer kombinasyon tedavilerine kıyasla daha üstün sonuçlar verdiği bulunmuştur (Planchard ve ark., 2018).

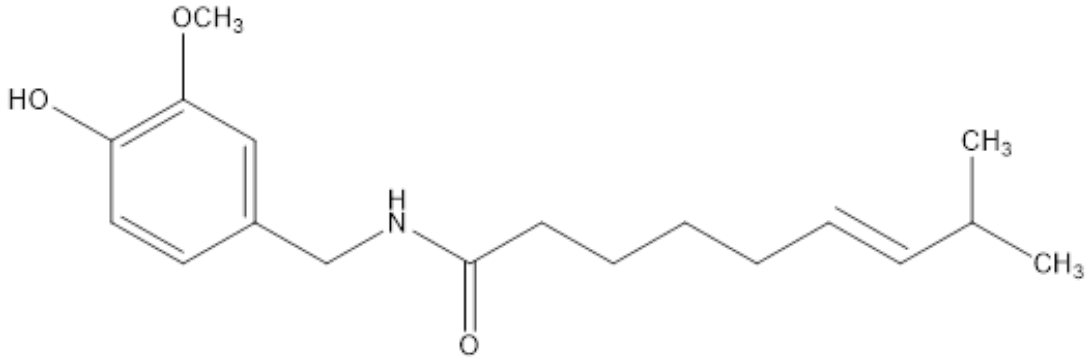
Cis, cerrahi sonrası adjuvan tedavide de önemli bir role sahiptir. Erken evrede cerrahi ile tedavi edilen KHDAK hastalarında, Cis bazlı kemoterapi ile adjuvan tedavi, sağkalım oranlarını artırabilir (Pignon ve ark., 2008).

Cis tedavisinin en büyük zorluklarından biri, ciddi yan etkilerinin bulunmasıdır. Nefrotoksisite, Cis'in en sık karşılaşılan yan etkilerinden biridir. Bu durum, böbrek fonksiyonlarını izleme ihtiyacını doğurur ve doz sınırlaması getirebilir (Pabla & Dong, 2012). Ayrıca ototoksisite, miyelosüpresyon ve gastrointestinal yan etkiler (bulantı, kusma) gibi diğer toksisiteler de sıklıkla rapor edilmiştir (Kelland, 2007). KHDAK hastalarında Cis tedavisi sırasında sıvı dengesi yakından izlenmeli ve böbrek fonksiyonları düzenli olarak kontrol edilmelidir. Bazı hastalarda bu yan etkiler tedaviye devam etmeyi zorlaştırabilir (Oudard ve ark., 2007).

Cis'in KHDAK'deki etkinliği zamanla azalabilir, zira kanser hücreleri ilaca karşı direnç geliştirebilir. Bu direnç, çeşitli mekanizmalarla açıklanabilir: İlacın hücre içine alınımındaki azalma, DNA onarım mekanizmalarının güçlenmesi, apoptoz yolaklarının bozulması ve ilacın inaktivasyonunu sağlayan moleküllerin (glutatyon vb.) artışı gibi faktörler bu direncin başlıca nedenleridir (Ghosh, 2019). Direnç gelişen hastalarda, ikinci basamak tedavi olarak kombinasyon tedavileri, sentetik letal etkileşimli kombinasyonlar, immünoterapiler ve hedefe yönelik tedaviler denenebilir (Westcott & To, 2013).

2.3. Capsaicin

Solanaceae familyasının *Capsicum* cinsinden olan kırmızıbiber, Azteklerin kaynaklarında antimikrobiyal ve antihemolitik bir ilaç olarak geçmektedir (Govindarjan, 1986; Oyagbemi, Saba & Azeez, 2010). Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide-$C_{18}H_{27}NO_3$, CAP), acı biberlerde bulunan ve *Capsicum* cinsi bitkilerden elde edilen biyolojik olarak aktif bir alkaloittir (Şekil 2.).



Şekil 2. CAP'ın kimyasal formülü (Adetunji ve ark., 2022).

CAP, insan vücudundaki çeşitli reseptörler ile etkileşime girerek ağrı algısını, metabolizmayı ve çeşitli biyolojik süreçleri etkiler. Özellikle TRPV1 reseptörüne bağlanarak duyusal nöronları aktive eder ve bu yolla acı hissi ve termal duyarlılık oluşturur. Genellikle CAP reseptörü olarak bilinen TRPV1, vücudun ısıyı veya sıcaklığı algılamak için kullandığı geçici salım potansiyelli (Transient Release Potential, TRP) iyon kanalıdır (Caterina ve ark., 1997; Chinreddy ve ark., 2024). TRPV1 reseptörünün aktivasyonu, hücre içi kalsiyum iyonları artışına yol açar ve bu süreç, CAP'ın çeşitli biyolojik etkilerinin temelini oluşturur.

CAP, saf haldeyken beyaz renkli, kokusuz, oldukça yakıcı ve acı özellikler gösteren bir alkaloid bileşiktir. Bu güçlü alkaloid yapısı, kırmızı bibere yoğun bir acılık kazandırmaktadır. Biber türlerinin acılık düzeyleri ise içerdiği CAP miktarına bağlı olarak farklılık göstermektedir. 1912 yılında Wilbur Scoville, biberlerin acılık derecelerini ölçmek için Scoville Birimi "Scoville heat units (SHU)" adlı bir ölçek geliştirmiştir. Örneğin, bir biberin acılığı 50.000 SHU olarak belirlenmişse, dilin bu acılığı hissedebilmesi için biberin alkolle 1/50.000 oranında seyreltilmesi gereklidir. Dünyanın en acı biberlerinden biri olan "*Mexican habanero*", 350.000 Scoville Birimi seviyesinde bir acılığa sahiptir (Szallasi & Blumberg, 1999).

CAP, klinikte çeşitli fizyolojik sistemleri hedef alarak birçok hastalığın yönetiminde kullanılmaktadır (Sharma, Vij & Sharma, 2013). Kronik ağrı tedavisinde, özellikle nöropatik ağrıların kontrolünde etkili bir ajan olarak dikkat çeker. TRPV1 reseptörlerinin aktivasyonunu takiben gelişen duyusal nöron desensitizasyonu, ağrıyı hafifletmede temel mekanizma olarak kabul edilir (de Novellis ve ark., 2011).

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan %8'lik CAP yamaları, postherpetik nevralji ve HIV ilişkili distal sensörik polinöropati gibi durumlarda uzun süreli ağrı kontrolü sağlayabilir. Daha düşük konsantrasyonlu topikal formlar (%0,025 ve %0,075) ise hafif ağrı durumlarında tercih edilmektedir (Qutenza, 2013). Nörojen mesane tedavisinde, intravezikal CAP uygulamaları detrusor kas kontraksiyonlarını düzenleyerek mesane dolum eşiğini artırabilir ve aşırı aktif mesane semptomlarını hafifletebilir (Cruz ve ark., 1997). Bununla birlikte, bu uygulama sırasında görülebilecek tahriş edici etkiler, kullanımını sınırlamaktadır (Lecci ve ark., 1998). CAP, obezite yönetiminde de önemli bir rol oynamaktadır. Termogenez ve lipid oksidasyonu üzerindeki etkileri enerji harcamasını artırırken, iştahı baskılayarak kilo kontrolüne destek olur (Kang, Teng, Wee, & Chen, 1995). Kardiyovasküler sağlık üzerinde ise vazodilatasyon ve trombosit agregasyonunu azaltma gibi olumlu etkiler gösterir. TRPV1 aktivasyonu ile ilişkili bu etkiler, miyokard iskemisi gibi durumlarda koruyucu olabileceği gibi, kan akışını artırarak genel kardiyovasküler fonksiyona katkı sağlayabilir (Adams ve ark., 2009; Jones ve ark., 2009; Mittelstadt ve ark., 2012; Raghavendra & Naidu, 2009; Yang ve ark., 2010). Gastrointestinal sistemde ise CAP, mide mukozasını koruma ve ince bağırsak absorpsiyon kapasitesini artırır (Popescu ve ark., 2020). Bununla birlikte, yüksek dozların uzun süreli kullanımında gastrointestinal tahriş ve iltihaplanma riskleri bulunabilmektedir (Ericson ve ark., 2009; Prakash & Srinivasan, 2016). Dermatolojik uygulamalarda, sedef hastalığı gibi inflamatuvar deri hastalıklarının tedavisinde kullanımı dikkat çekmektedir. Ayrıca histamin aracılı kaşıntıyı hafifletme etkisi gösterir. Ancak, hemodiyalize bağlı pruritus gibi bazı spesifik durumlarda etkinliği sınırlı kalmıştır (Prakash & Srinivasan, 2016; Yu, 2011). CAP'ın bu çeşitli klinik uygulamaları, çok yönlü farmakolojik özelliklerini ortaya koyarken, yan etkiler ve spesifik kullanımlardaki sınırlamalar, daha fazla araştırma yapılmasını gerekli kılmaktadır.

CAP, geleneksel olarak analjezik ve anti-inflamatuar etkileri nedeniyle kullanılsa da son yıllarda yapılan çalışmalar bu molekülün anti-kanser özelliklerini de ortaya koymuştur (Bode & Dong, 2011). CAP, kanser hücrelerinde apoptoz indüksiyonu, hücre döngüsünün durdurulması, metastazın ve anjiyogenezin inhibisyonu gibi mekanizmalarla etki gösterir (Min ve ark., 2004; Vel ve ark., 2024).

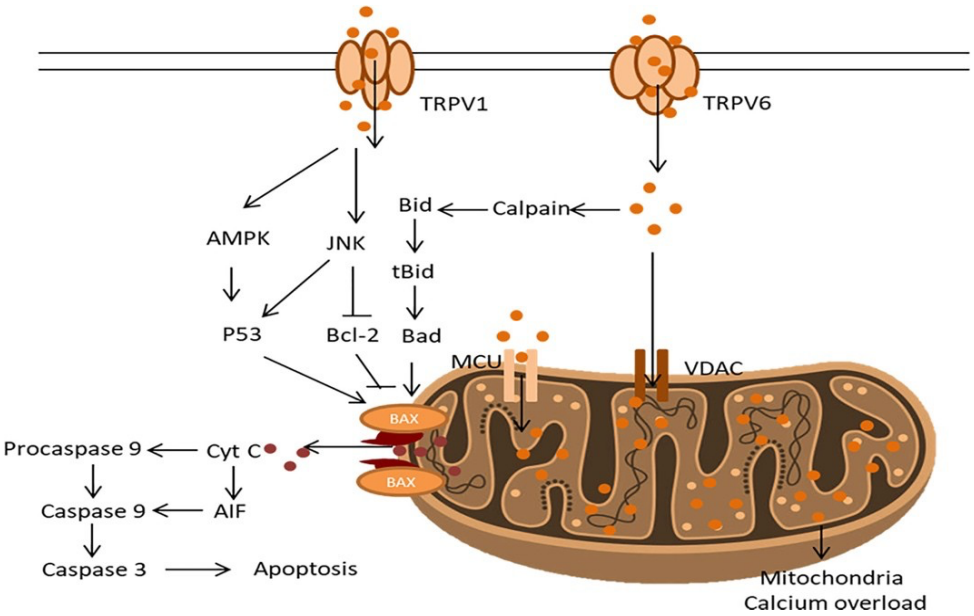
CAP, çeşitli kanser türlerinde anti-kanser etkileri olan bir bileşik olarak öne çıkmaktadır. Akciğer kanserinde, CAP'ın hücre proliferasyonunu baskıladığı, apoptozu indüklediği ve anjiyogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir (Brown ve ark., 2010). KHAK hücrelerinde, CAP'ın antiproliferatif etkisi E2F4 transkripsiyon faktörü yoluyla gerçekleşirken, mutasyonlu p53 proteininin parçalanmasını sağlayarak otofajiyi indüklediği belirlenmiştir (Garufi, Pistritto, Cirone & D'Orazi, 2016). Ayrıca, insan KHAK hücrelerinde (H69) TRPV6 reseptörleri ve kalsiyum-kalpain yolu üzerinden apoptozu tetiklediği saptanmıştır (Lau ve ark., 2014). KHDAK hücrelerinde ise CAP, hipoksik koşullarda vasküler endotelyal büyüme faktörünün (VEGF) aşağı regülasyonunu indükleyerek anti-anjiyogenez aktivitesi göstermiştir. Bu etki, p53-SMAR1 oto-regülatör döngüsünün yeniden aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (Chakraborty ve ark., 2014). Meme kanserinde CAP hücre döngüsünü durdurarak ve apoptozu indükleyerek etkili olmuştur. Yapılan bir araştırmada MCF-7 ve BT-20 meme kanseri hücrelerinde, mitokondriyal yolak üzerinden apoptoz indüklenmiş ve PARP-1'in aktive edilmiş kaspaz-7 ile kesilmesi sağlanmıştır (Chang ve ark., 2011). Bunun yanı sıra, p38 MAPK sinyal yolu aracılığıyla otofaji ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Choi, Jung & Oh, 2010). Kolorektal kanserde CAP, ROS üreterek ve mitokondriyal transmembran potansiyelini bozarak apoptozu indükler (Yang ve ark., 2009). Ayrıca, PPARγ yolu ile apoptoz başlattığı ve AMPK aktivasyonu yoluyla anti-kanser etkiler gösterdiği saptanmıştır (Kim ve ark., 2004; Kim ve ark., 2007). Bunun yanı sıra, p53 stabilizasyonu ve aktivasyonu yoluyla hücre döngüsünü durdurduğu ve apoptozu indüklediği belirlenmiştir (Jin ve ark., 2014). Prostat kanserinde CAP hem TRPV1 reseptörüne bağlı hem de bağımsız mekanizmalarla hücre proliferasyonunu baskılar ve apoptozu tetikler. Özellikle ROS üretimi, mitokondriyal membran potansiyelinin azalması ve kaspaz-3 aktivasyonu bu süreçte rol oynar. Ayrıca, androjen reseptörünün parçalanmasını sağlayarak hücre büyümesini engellediği saptanmıştır (Sanchez ve ark., 2006; Sanchez ve ark., 2007). Mesane kanserinde, CAP, ROS üretimini artırarak ve mitokondriyal membran depolarizasyonunu sağlayarak hücre döngüsünü durdurur ve apoptozu tetikler (Yang ve ark., 2010). Ayrıca, tümörle ilişkili NADH oksidazı (tNOX) inhibe ederek proliferasyonu ve migrasyonu baskılar. Bununla birlikte, kapasitör hücrelerinde immünojenik hücre ölümüyle ilişkili hasar

ilişkili moleküler paternlerin (DAMPs) salınımını indüklediği gösterilmiştir (Qian ve ark., 2016).

CAP'ın hem tek başına hem de kemoterapi ve radyoterapi ile kombinasyon halinde kullanıldığında, kanser tedavisindeki etkinliği çeşitli çalışmalarla anlamlı bir şekilde ortaya konulmuştur (Zhang, Wang, Huang, Hu & Xu 2020).

2.3.1. CAP'ın Apoptoz İndüksiyonu

CAP, kanser hücrelerinde apoptozu tetikleyen birkaç farklı mekanizmayla çalışır (Şekil 3.). Apoptoz, programlanmış hücre ölümü olarak bilinir ve kanser tedavisinde önemli bir strateji olarak kabul edilir. CAP, mitokondriyal yolağı aktive ederek sitokrom c'nin salınmasını sağlar ve hücre içi ROS'u artırarak apoptozu indükler (Surh, 2002). Örneğin, KHDAK hücreleri (A549) üzerinde yapılan bir çalışmada, CAP'ın apoptozu tetiklediği ve bu yolla hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Vel ve ark., 2024).



Şekil 3. CAP'ın apoptotik etkisinde rol oynayan hücre içi sinyal yolu (Adetunji ve ark., 2022).

CAP, hücre döngüsünü durdurma yoluyla da kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebilir. Hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin ekspresyonunu baskılayarak, hücre döngüsünün G1 veya G2/M fazında durmasına yol açar (Bode & Dong, 2011). Prostat kanseri hücrelerinde yapılan çalışmalarda, CAP'ın G0/G1 fazında hücre döngüsünü durdurduğu ve tümör hücrelerinin büyümesini baskıladığı gösterilmiştir (Mori ve ark., 2006). Kamaruddin ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada, CAP'ın ORL-48 oral kanser hücrelerinde G1 fazında hücre döngüsü durmasına aracılık ettiğini gözlemlemişlerdir. Hücre döngüsü protein kinazlarının modülasyonu genellikle hücresel duraklamanın sağlanmasında rol oynar. Örneğin, yapılan bir çalışmada CDK8 ekspresyonunun baskılanması, CAP tarafından meme kanseri hücrelerinde G2/M fazında duraklamaya neden olmuştur (Wu, Jia, Zhang & Li, 2020). Başka bir çalışmada, CDK2, CDK4 ve CDK6'nın inhibisyonunun G0/G1 fazında duraklamadan sorumlu olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2012). Benzer şekilde, CAP'ın insan faringeal skuamöz karsinom hücreleri (FaDu) üzerindeki anti-tümör etkisinin siklin B1 ve D1 düzenleyicilerinin yanı sıra G1/S fazında hücre döngüsünün durmasını sağlayan siklin bağımlı protein kinazlar CDK-1, CDK-2 ve CDK-4'ün ekspresyonunu azaltarak mitokondriyal yolaklarla apoptozu indüklediği bildirilmiştir. (Le ve ark., 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Bu tez çalışması için model olarak küçük hücreli dışı akciğer kanseri A549 hücre hattı kullanılmıştır (ATCC; Kat. No. CCL-185). A549 hücreleri %10 FBS (Fötal Bovine Serum) (ATCC; Kat. No. 30-2020) ve %0,1 penicillin-streptomycin (100 IU/ml, 100 µg/ml) (Gibco™; Kat. No. 15140-122) içeren RPMI-1640 (ATCC; Kat. No. 30-2001) adlı besiyerinde 37 °C ve %5 CO2 içeren nemli inkübatörde çoğaltıldı.

3.1.1. Hücrelere CAP ve Cis Uygulaması

CAP (Sigma; Kat. No. 404-86-4) ve Cis (Sigma; Kat.No. C2210000) etkilerini gözlenmek amacıyla, eşit sayıda hücreler, hücre proliferasyon metodu için 96-kuyucuklu plakaya, immunositokimya metodu için 12 mm yuvarlak lamellerin üzerinde 24 kuyucuklu plakalara ve western blot metodu için 6-kuyucuklu plakalara ekildi. Hücreler %30 yaygınlığa ulaşınca (24 saat sonra) 4 gruba ayrıldı;

1. **Grup-Taşıt Madde (DMSO) Grubu:** CAP'ın içerisinde çözdürüldüğü DMSO (Sigma; Kat. No. D4540), %0,2'den az konsantrasyonda besiyeri içerisinde uygulandı.
2. **Grup-Cis Grubu:** Moleküler saf su içerisinde çözdürülen 1µg/ml Cis besiyeri içerisinde uygulandı.
3. **Grup-CAP Grubu:** %0,2'den az DMSO içinde çözdürülen CAP; 50, 100, 150, 200, 250 ve 300 µM konsantrasyonda besiyeri içerisinde uygulandı.
4. **Grup-Cis/CAP Grubu:** Tüm CAP gruplarına, 1µg/ml Cis eklenerek birlikte besiyeri içerisinde uygulandı.

Tüm gruplara yönelik uygulamalar 48 saatlik bir süre boyunca gerçekleştirildi.

3.1.2. Hücre Proliferasyonun Belirlenmesi

3.1.2.1. Sulforhodamin B Analizi

Sulforhodamin B (SRB) testi, hücre yoğunluğunu ölçmek için kullanılan bir yöntemdir. Hücreler, 96 kuyucuklu plakaya 5000 hücre/kuyucuk hesabı ile ekildi ve ertesi gün 3.1.1.'de açıklanan deney gruplarına uygun tedavi protokolleri uygulandı. 48 saat sonra hücrelerin üzerine soğuk %10 Trikloroasetikasit (TCA) eklenerek 4°C'de 1 saat boyunca fiksasyon yapıldı, ardından musluk suyu ile yıkandı ve kurutuldu. Sabitlenmiş hücrelere %0,4 SRB boyası eklenerek oda sıcaklığında 60 dakika inkübe edildi, fazla boya %1 asetik asit ile yıkanarak uzaklaştırıldı ve plaka tekrar kurutuldu. Bağlı boya, 10 mM Tris tamponu ile çözüldü ve mikrotitre plak okuyucusunda 510 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

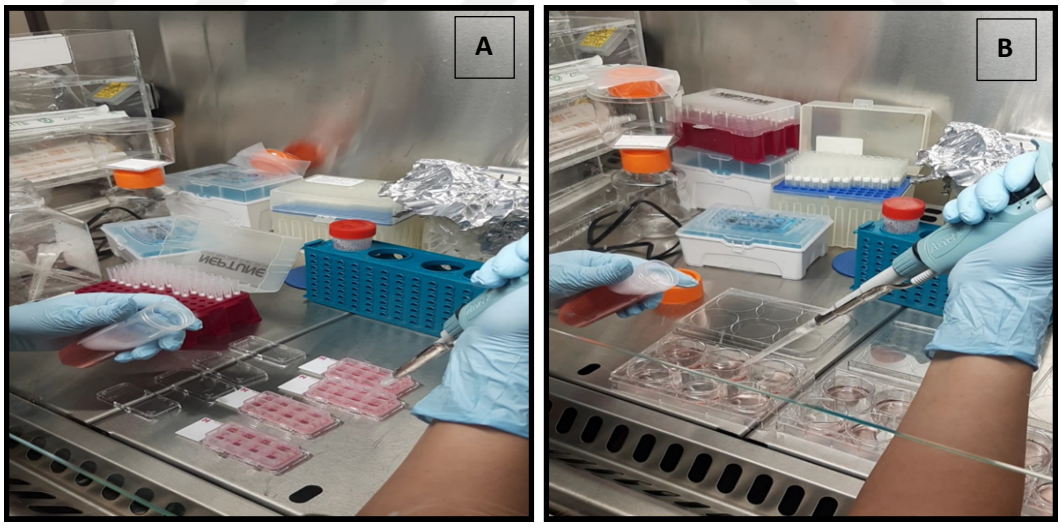
3.1.2.2. Ki-67 Ekspresyonunun İmmunositokimya Metodu ile Belirlenmesi

Prolifere olan (G1, S, G2, M fazlarında olan) hücrelerde gözlenen Ki-67 proteinin hücre içi lokalizasyonu immunositokimya metodu ile ortaya koyuldu. Bu amaçla, hücreler 12 mm yuvarlak lamellerin üzerinde 24 kuyucuklu plakalara $40x10^4$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekilip 3.1.1.2de belirtilen gruplandırmalar ve uygulamalar yapıldı. 48 saat sonra immunositokimya analizleri gerçekleştirildi. Hücreler %4 formaldehit ile 15 dakika fikse edildi. Bloklamanın ardından slaytlar Ki-67 primer antikor (Abcam; Kat. No. ab92742) ile +4°C'de, gece boyu muamele edildi. Ertesi gün sekonder antikor (Anti-Rabbit IgG; ImmPress Vector Lab.; Kat. No. 7401) kit 30 dakika uygulandıktan sonra kromojen boyası DAB uygulandı ve Harris Hematoksilen ile zıt boyama gerçekleştirildi.

3.1.2.3. Ki-67 Ekspresyonunun Western Blot Metodu ile Belirlenmesi

Hücrelerden elde edilecek total protein lizatlarındaki spesifik proteinlerin ekspresyonlarının analizi Western Blot yöntemi ile yapıldı. Kısaca, total lizatların hazırlanması için hücreler önce soğuk PBS ile yıkanıp ve 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 5mM MgCl2, %0,5 NP-40 ve %0,5 TritonX-100, proteaz/fosfataz inhibitörleri içeren bir solüsyon ile muamele edildi. Lizatlar yüksek

devirde (10000 xG) soğutmalı santrifüjde (+4 °C), 5 dakika santrifüj edilerek membran ve erimeyen atıklardan arındırılıp ve süpernatantların protein konsantrasyonu BCA yöntemi (Pierce; Kat. No. 23225) ile spektrofotometrik olarak 562 nm'deki absorbansları ile hesaplandı. Örnekler SDS-PAGE yükleme tamponu ile 1:1 oranında karıştırılıp 95 °C'de, 5 dk inkübe edilip, eşit miktarda protein içeren (25 µg) örnekler SDS-PAGE (%12'lik jel) ile ayrıldı ve proteinler Western Blot ile tespiti için PVDF membranlarına transfer edildi. Membranların bloklanmasında %0,1 Tween-20 içeren tris tamponlu tuz (TBS-T) içinde çözdürülmüş %5 yağsız kuru süt tozu ilave edildi. Membran üzerindeki ilgili proteinler spesifik Ki-67 primer antikor (Abcam; Kat. No. ab92742) +4 °C'de gece boyu ve HRP-konjuge sekonder goat-anti rabbit ile oda ısısında 1 saat inkübe edilip, kemiluminesan ayıraç (GE Healthcare; ECL Prime; Kat. No. RPN2232) ile muamele edildikten sonra görüntüleme cihazında (ChemiDoc MP, Bio-Rad) analiz edildi. Antikor inkübasyonlarından sonra membranların yıkanması TBS-T ile yapıldı. Yükleme kontrolü olarak β-actin (Cell Signalling; Kat No. 3700) kullanıldı.



Şekil 4. Hücrelerin immunohistokimya (A) ve Western Blot (B) için ekilmesi.

3.1.3. Apoptozisin Belirlenmesi

3.1.3.1. Cleaved Caspase-3 Ekspresyonunun İmmunositokimya Metodu ile Belirlenmesi

Hücreler, farklı yolaklardan apoptozise girseler de tüm yolakların ortak kullandıkları son moleküllerden biri olan caspase-3'ün yarıklanmış halini gözlemlemek için immunositokimya metodu ve ile cleaved-caspase-3 (Cell signall. Kat. No. 9661) ekspresyonu ortaya koyuldu. Bu amaçla, hücreler 12 mm yuvarlak lamellerin üzerinde 24 kuyucuklu plakalara $40x10^4$ ekilip, 3.1.2.2.'e uygun şekilde immunositokimya metodu uygulandı.

3.2. Fare Akciğer Kanser Modelinde CAP ve Cis'in Test Edilmesi

3.2.1. Deney Hayvanlarının Temini, Bakımı ve Zenograf Model Oluşturma

Bu tez çalışması için 20 adet, aynı yaş ve genetik yapıya sahip erişkin (4-6 haftalık) Nude CD-1 ırkı erkek fareler Kobay DHL A.Ş.'den temin edilmiştir. Hayvanların bakım ve deneysel uygulamaları, Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (DENHAB)'nde, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK) No:2020-04/02 izniyle gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.).

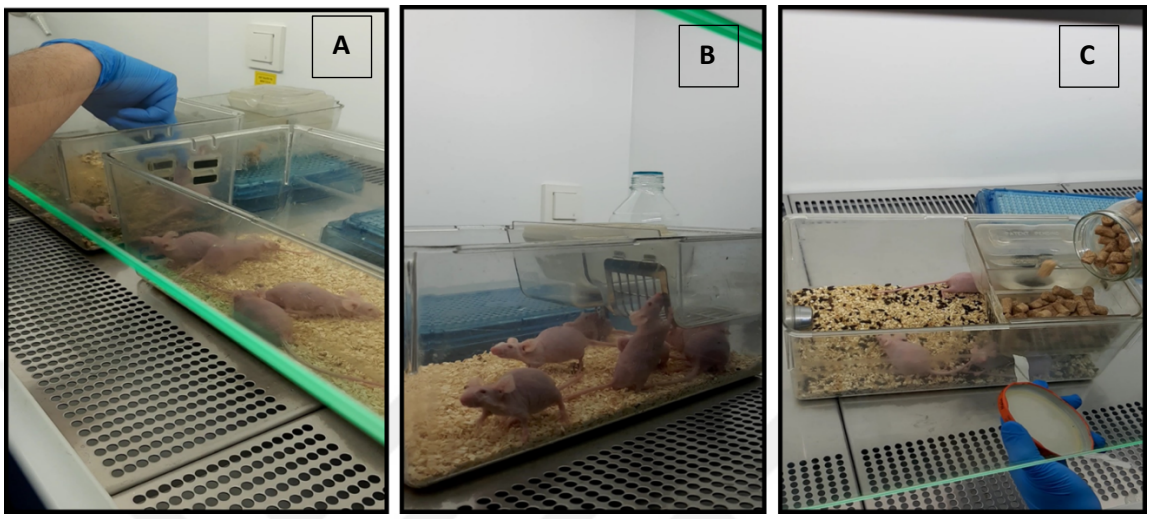
Hayvanların sağ flank bölgelerine, A549 hücreleri ($2x10^6$ hücre) 1:1 Matrigel (Corning; Kat no. 356237) içerisinde 0,2 ml. total hacimde subkutan yolla verildi (Şekil 6.). Tümör hacimleri 150 mm^3'e ulaştığında hayvanlar 5'er hayvandan oluşan 4 alt uygulama grubuna ayrıldı. 4 grup;

1.grup/Taşıt Madde Grubu: CAP'ın içerisinde eritileceği mısır yağı, 0,1 ml PBS içerisinde haftada 3 kez intraperitoneal enjeksiyon yoluyla verildi.

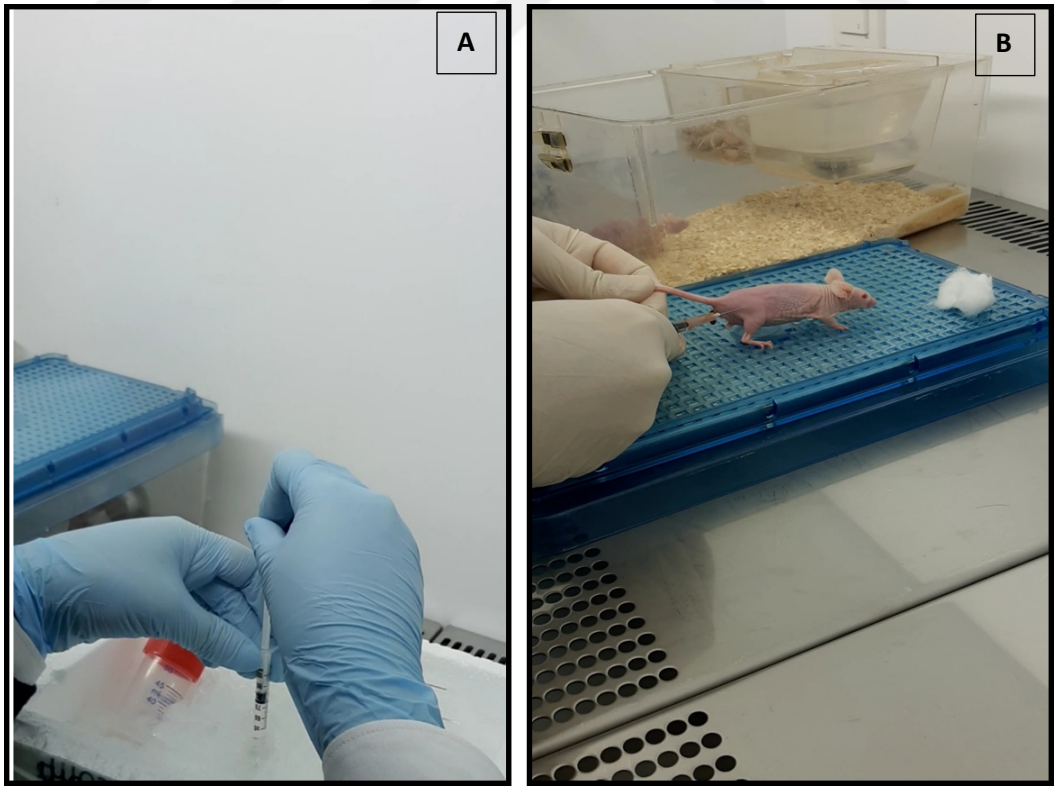
2.grup/CAP Grubu: Mısır yağı içerisinde eritilen 5 mg/kg dozda CAP haftada 3 kez intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulandı.

3.grup/Cis Grubu: 3 mg/kg Cis intraperitoneal enjeksiyon yoluyla haftada 1 kez uygulandı.

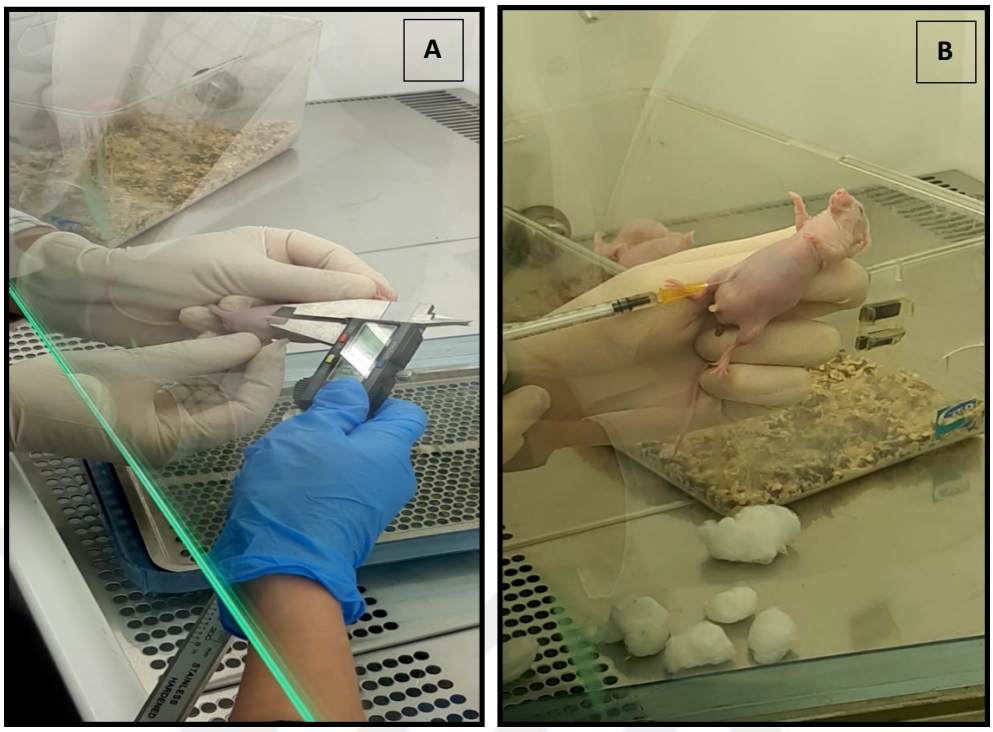
4.grup Cis/CAP Grubu: 3 mg/kg Cis intraperitoneal yolla haftada 1 kez; 5 mg/kg dozda CAP haftada 3 kez intraperitoneal enjeksiyon yoluyla uygulandı (Şekil 7.).



Şekil 5. CD-1 nude farelerin kabin içerisinde altlık değişimi (A ve B) ve bakımlarının (C) yapılması.



Şekil 6. A549 hücrelerinin hazırlanması (A) ve flank bölgesine enjeksiyonları (B).



Şekil 7. Tümör ölçümlerinin yapılması (A) ve intraperitoneal tedavi uygulamaları (B).

3.2.2. Vücut Ağırlık, Tümör Çapı ve Ağırlıklarının Ölçülmesi

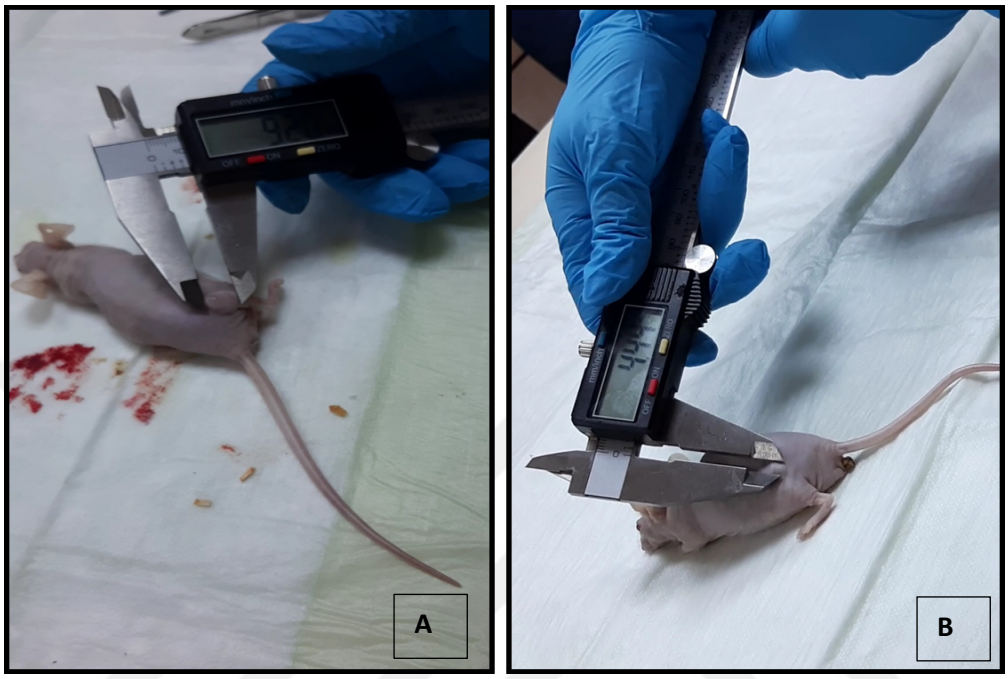
Hayvanlar, ilaç uygulaması sırasında haftada 2 kez vücut ağırlık takibi amacıyla tartıldı. Aynı zamanda, haftada 2 kez ve deney sonlandırıldığında tümör çapı ölçümü yapılarak,

- Tümör hacmi (V) (uzunluk X genişlik^2)/2
- Relatif tümör büyümesi (Vgün n / Vgün 0) (n = deneyin sonlandırıldığı gün)
-Tümör gelişim inhibisyon oranı (1-ΔT/ΔC)x100 (ΔT=Tedavi grubunun ortalama tümör hacmi; ΔC= Kontrol grubunun ortala tümör hacmi) hesaplarına göre belirlendi.

Deney sonlandırıldığında tümör ağırlık ölçümleri tartıldı.

İlaç uygulaması başladıktan 3 hafta sonra deney sonlandırıldı. Farelere, xylazine/ketamine kombinasyonuyla (0,1 mL/100g, ip.) genel anestezi altında,

servikal dislokasyon uygulanarak ve oluşacak tümör çıkartıldıktan sonra, tümör hacmi ölçülerek hesaplandı (Şekil 8.).



Şekil 8. Kontrol (A) ve tedavi (B) grubunda tümör ölçümleri.

3.3. Doku Kesitlerinin Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme için Hazırlanması

3.3.1. Doku Kesitlerinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi

Tümör dokuları, %10 tamponlu-nötr formaldehit tespit solusyonunda tespit edildikten sonra rutin histolojik prosedür uygulanarak genel yapının gözlenmesi ve immunohistokimyasal değerlendirmeler için parafinde bloklandı. Parafine gömülen dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Crosmann'ın modifiye üçlü boyası ile boyanarak Nikon Eclipse 80i mikroskopta incelenerek, fotoğrafları çekildi.

3.3.2. Tümör Dokusunda Hücre Proliferasyonun Belirlenmesi

Dokulardan hazırlanan slaytlara deparafinizasyon ve dehidrasyon aşamalarından sonra, mikrodalgada antijen-retrieval işlemi uygulandı. Endojen peroksidaz aktivitesi

bloklanarak, 20 dakika bloking (ImmPRESS® HRP Anti-Rabbit IgG; Kat No: MP7401) işlemi uygulandı. Gece boyu +4°C'de, Ki-67 primer antikor (Abcam; Kat. No. ab92742) ile muamele edildi ve ertesi gün imalatçının önerdiği şekilde 30 dakika boyunca sekonder antikor ile muamele edildi. DAB (Abcam; Kat. No. ab64238) ile kromojen boyası yapıldı ve Harris Hematoksilen (Sigma; Kat. No. HHS32) ile zıt boyaması tamamlandı.

3.3.3. Tümör Dokusunda Apoptozisin Belirlenmesi

İmmunohistokimya protokolü 3.3.2.'de belirtildiği gibi yapıldı, primer antikor olarak Cleaved Caspase-3 primer antikor (Cell signal. Kat. No. 9661) kullanıldı.

İlaç uygulamaları sonrasında apoptozisin doku kesitlerinde teyidi için Cleaved-Caspase 3 ekspresyonu ile belirlendi. Bunun için dokudan hazırlanan slaytlar, deparafinizasyon ve dehidrasyon aşamalarından sonra, mikrodalgada antijen-retrieval işlemi uygulandı. Endojen peroksidaz aktivitesi bloklanarak, 20 dakika bloking (ImmPRESS® HRP Anti-Rabbit IgG; Kat No: MP7401) işlemi uygulandı. Gece boyu +4°C'de, cleaved-caspase3 (Cell signall: Kat. No. 9661) primer antikorunda bekletildi ve ertesi gün imalatçının önerdiği şekilde 30 dakika boyunca sekonder antikor ile muamele edildi. DAB (Abcam; Kat. No. ab64238) ile kromojen boyası yapıldı ve Harris Hematoksilen (Sigma; Kat. No. HHS32) ile zıt boyaması tamamlandı.

3.4. Sonuçların Değerlendirilmesi ve İstatistiklerinin Yapılması

in vitro immunsitokimya analizlerin değerlendirilirken, uygulanan her antikor için, boyanan her bir lamelde, 5 farklı alanda 100'er hücre sayıldı. Toplamda sayılan hücrelerin içinde, boyanan antikorlara reaksiyon veren hücreler belirlenerek % değerleri hesaplandı.

Tüm *in vitro* analizlerin 3 kez biyolojik tekrarları yapılarak değerlendirmeler yapıldı.

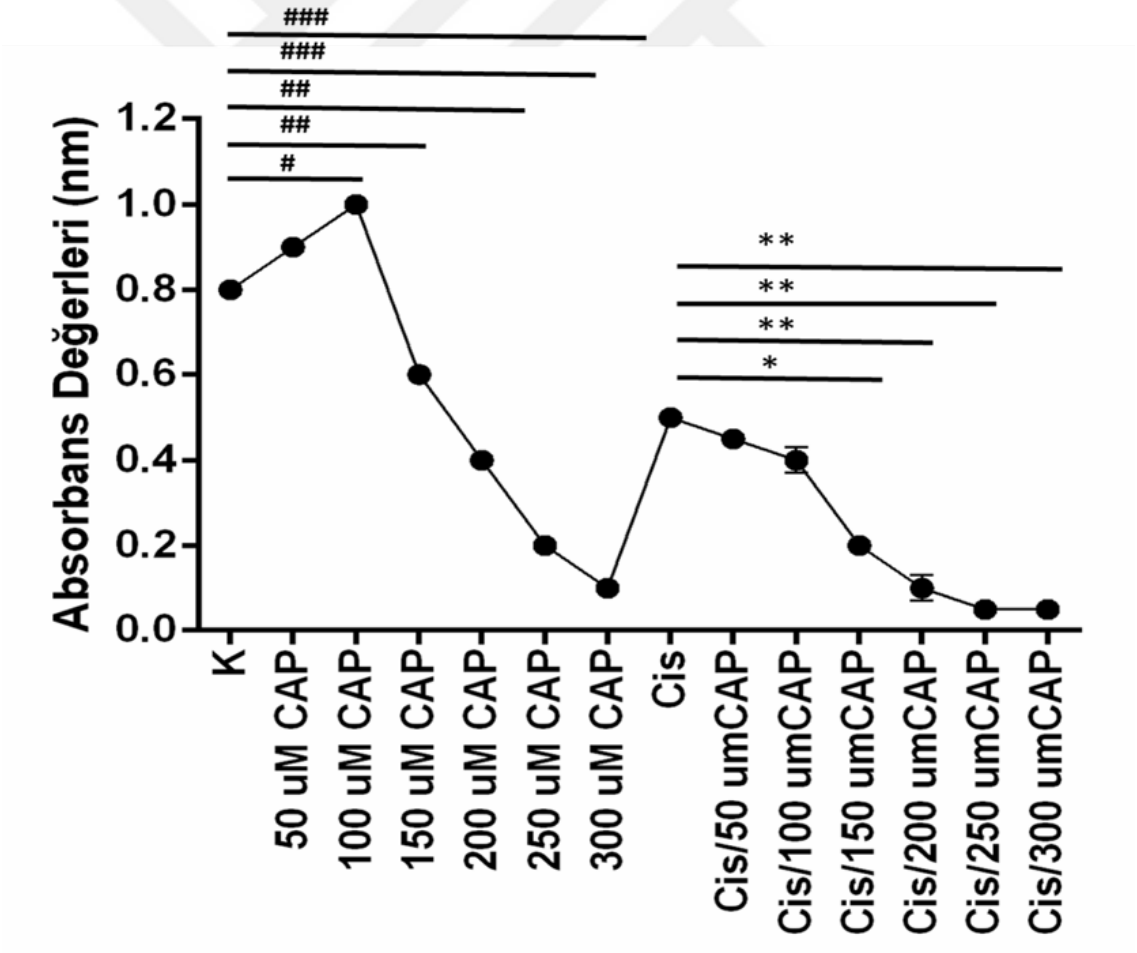
Doku kesitlerinin değerlendirilmesinde ise HSCORE analizi kullanıldı. Buna göre; her slaytta 5 farklı mikroskobik alan değerlendirilerek uygulanan antikorun boyanma şiddetine göre 4 farklı kategoride değerlendirildi. Boyanmama (0); zayıf (+,1); orta (++,2); şiddetli (+++,3) boyanma şekilde tanımlandı ve HSORE= ∑(IxPC) göre hesaplanarak her grubun değerleri bulundu. (Denklemdeki I; boyanma şiddetini, PC; bu şiddette boyanan hücre yüzdesini ifade etmektedir). Tüm değerlendirmeler 2 farklı gözlemci tarafından aynı anda yapıldı.

Yapılan tüm değerlendirmeler IBM Statistics 23 programında %95 güven aralığında değerlendirildi. Yapılacak homojenite testinin sonrasında değerler normal dağılıma uygun olmadığından elde edilen veriler Kruskal –Wallis Testi ile değerlendirildi ve gruplar arasındaki fark Mann –Whitney U Testi ile hesaplandı. Elde edilen değerler (ortalama±standart hata) ve $p \leq 0,05$ anlamlılık düzeyinde hesaplandı.

4. BULGULAR

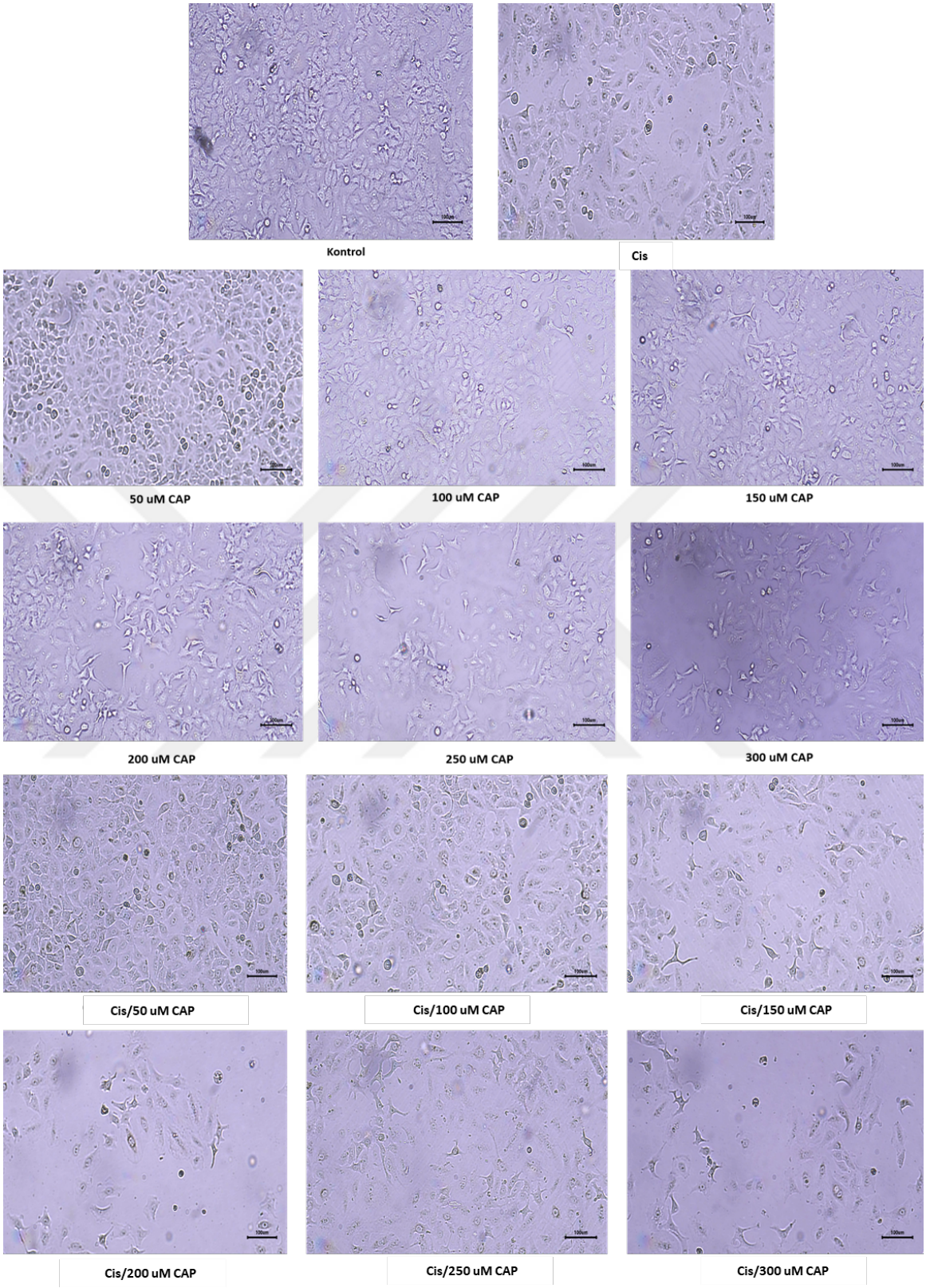
4.1. Hücre Proliferasyon Sonuçları

Hücre proliferasyonunu belirlemek için uygulanan SRB analizi sonuçlarında düşük doz CAP'ın hücre proliferasyonunu arttırdığı, 150 µM CAP dozu ve sonrasında ise hücre proliferasyonunda azalma olduğu gözlemlenmiştir ($p<0,05$). Ayrıca tek başına Cis uygulamasında hücre proliferasyonunun önemli oranda azaldığı fakat bu azalmanın 150 µM CAP kombinasyonunda sonra artan dozlarda devam ettiği gözlenmektedir.



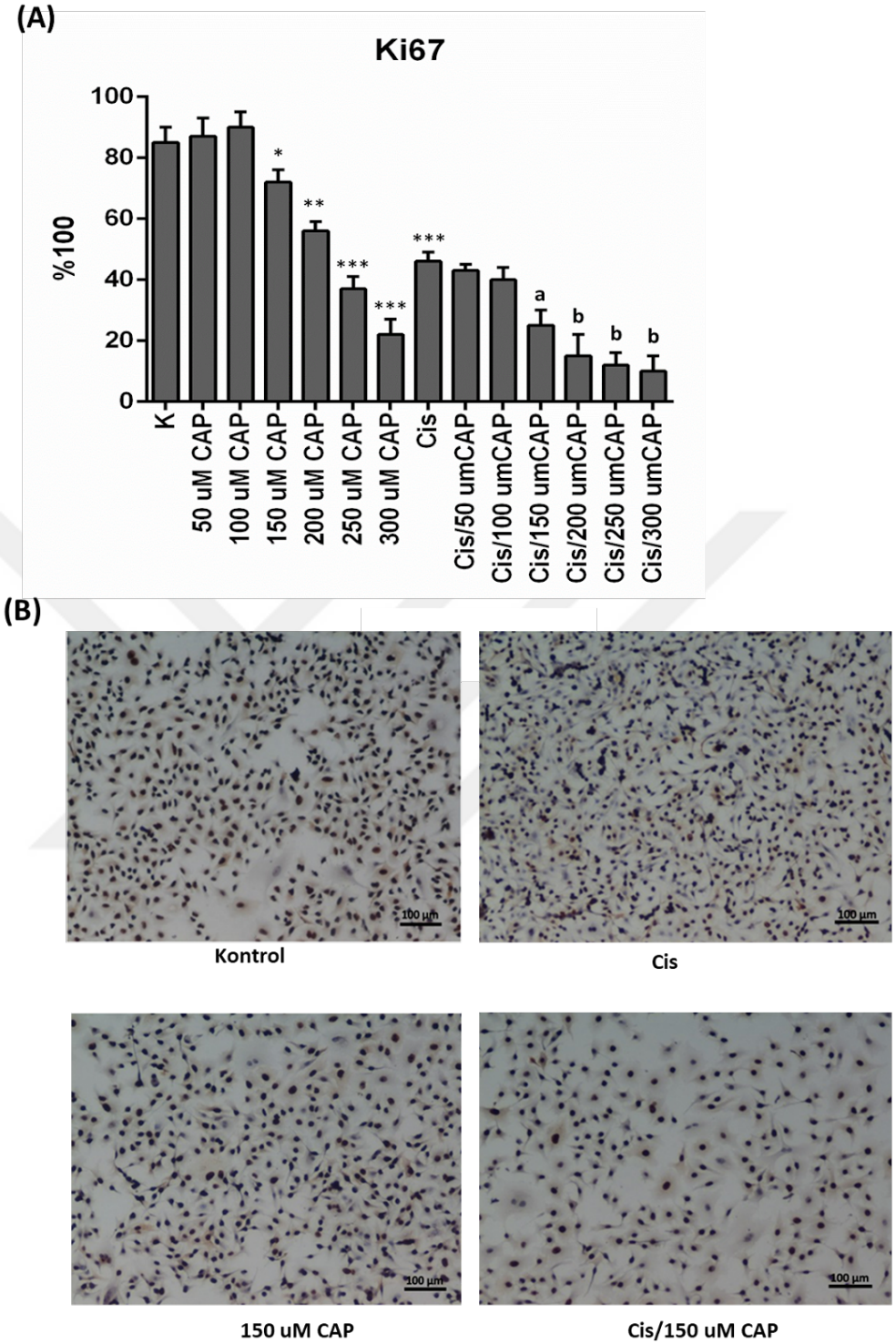
Şekil 9. Hücrelerin SRB analizi sonrasında ölçülen absorbans değerleri (Cis, Cisplatin; CAP, Capsaicin). $^{\#}$, $^{\#\#}$,$^{\#\#\#}$: K grubuna göre istatistiksel farklılık ($p<0,05$); *,** : Cis grubuna göre istatistiksel farklılık ($p<0,05$). (K, Kontrol; Cis, Cisplatin; CAP, Capsaicin).

Hücrelerdeki proliferasyon farkını ayrıca morfolojik olarak incelemek için A549 hücrelerinin Cis ve farklı doz CAP uygulamaları sonrasında ışık mikroskobunda alınan görüntüleri Şekil 10'da verilmiştir. Işık mikroskobundaki özellikle kombinasyon uygulaması sonuçları SRB ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Buna göre, SRB sonuçlarında 250 ve 300 μM CAP dozunun uygulandığı Cis'le kombinasyonda hücre canlılık değerinin en düşük olduğu gözlenmiştir. Fakat hücre morfolojileri değerlendirildiğinde 200 μM CAP uygulaması sonrasında hücre-hücre bağlantılarının bozulduğu, fenotik yapının kaybolduğu, hücre bütünlüğünün zarar gördüğü anlaşılmaktadır. Bu bulgular Ki-67 ve cleaved caspase-3 bulguları ile de desteklenmiştir.



Şekil 10. Hücrelerin Cis ve farklı doz CAP uygulamaları sonrasında ışık mikroskobundaki görüntüleri (Cis, cisplatin; CAP, Capsaicin. Bar=100 µM).

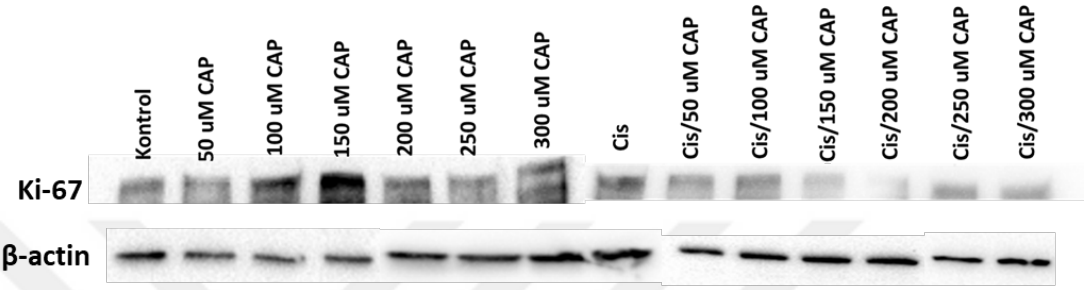
Hücre proliferasyonunun anlaşılması amacı ile hücreler Ki-67 ile boyanmış ve % değerler ve mikrograflar her hücre grubu için sunulmuştur (Şekil 11.). Ki67 proliferasyon SRB sonuçları ile paralel veriler sağlanmıştır. CAP'ın düşük dozlarının (50 µM ve 100 µM) uygulanması ile hücre proliferasyonuda anlamlı olmasa da ($p>0,05$) artış gözlenmiştir. 150 µM CAP dozundan sonra ise Ki67 ekspresyon yüzdesinde azalma başlamıştır. Bu azalma 200 µM CAP ve daha yüksek dozlarda anlamlı olduğu anlaşılmıştır ($p<0,05$). 250 µM ve 300 µM CAP dozlarında ise hücrelerin morfolojik karakterlerini neredeyse tamamen kaybettiği ve bu sebeple Ki67 ekspresyon yüzdesinin oldukça azaldığı anlaşılmıştır. Cis uygulamasında Ki67 bulgusu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azalmıştır ($p<0,05$). CAP ile kombinasyonlarında ise düşük doz CAP'ın kemoterapötik etkiye karşı koruyucu rol oynadığını düşünmekteyiz. Fakat 300 µM CAP dozla kombinasyon sonrasında, CAP'ın Cis etkisini arttırdığı anlaşılmaktadır.



Şekil 11. A549 hücrelerinde Cis ve farklı doz CAP uygulaması sonrasında Ki67 immunsitokimya sonuçlarının % değerleri (A) ve ışık mikroskobundaki görüntüleri (B). *,**,***: K grubuna göre istatistiksel farklılık ($p<0,05$); ^{a}, ^{b} : Cis grubuna göre istatistiksel farklılık ($p<0,05$). (K, Kontrol; Cis, cisplatin; CAP, Capsaicin. Bar=100 µm).

Hücre proliferasyonu bulgularını desteklemek için gerçekleştirdiğimiz Ki67 protein seviyesini ölçmeyi amaçlayan western blot analizi Şekil 12.'de verilmiştir.

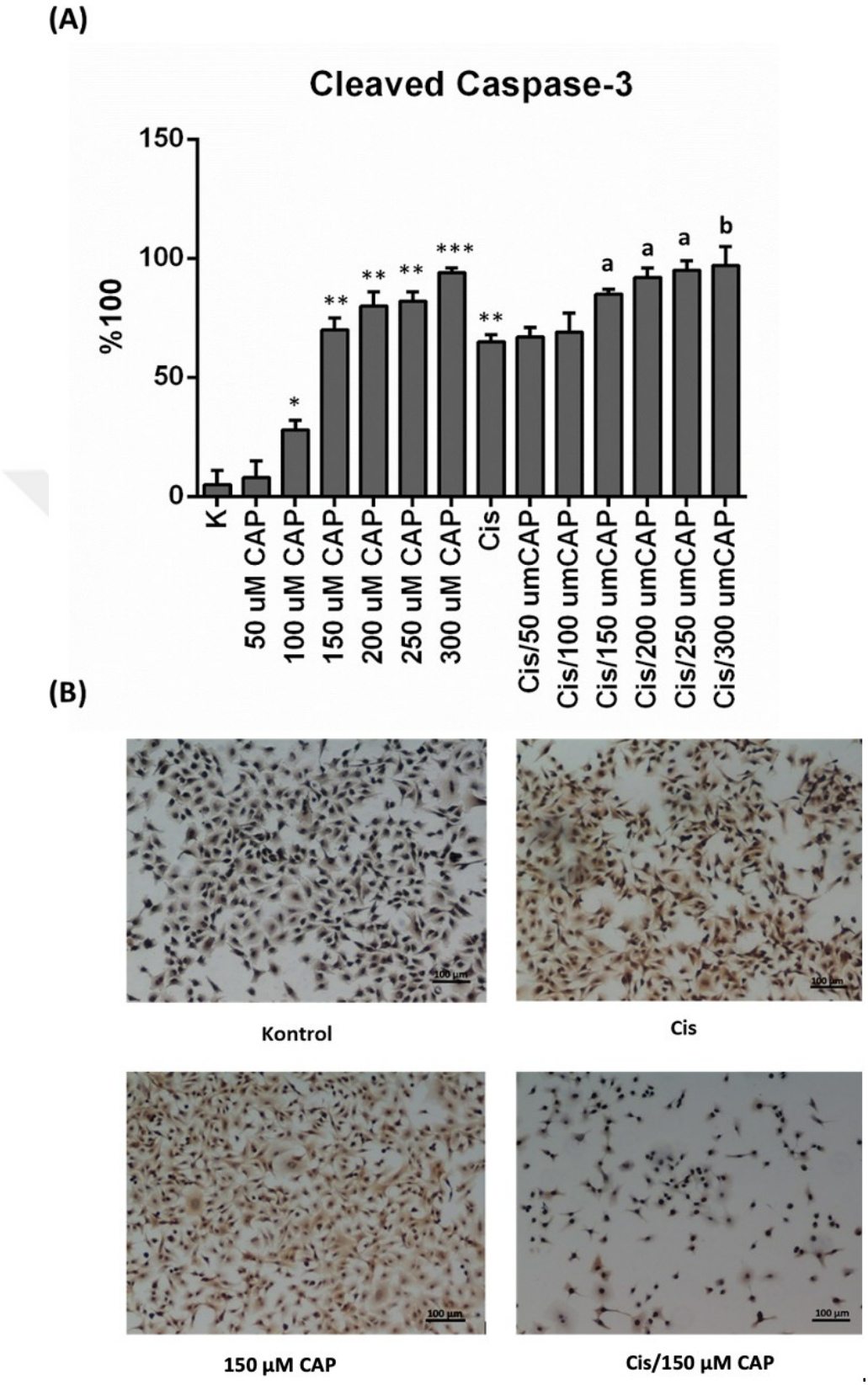
A549 hücrelerine ait protein bantları değerlendirildiğinde CAP uygulanan gruplarda dozun artması ile birlikte Ki-67 protein seviyesinin azalması immunhistokimya ve SRB değerlerini desteklemektedir. CAP'ın Cis kombinasyonu ile birlikte verildiğinde özellikle en çok etki görülmesi beklenen 150 µM doz ve sonrasında Ki67 yani proliferasyonun Cis uygulamasına göre önemli ölçüde azaldığı görülmektedir.



Şekil 12. A549 hücrelerinde Cis ve farklı doz CAP uygulaması sonrasında Ki-67 western blot analiz sonuçları. (K, Kontrol; Cis, cisplatin; CAP, Capsaicin).

4.2. Apoptozis Bulguları

Apoptozisin belirlenebilmesi için uygulanan Cleaved caspase-3 ekspresyon seviyeleri (Şekil 13.), proliferasyon bulguları ile zıt etki gösterdiğinden birbirini doğrulamaktadır. Kontrol grubunda göre, cleaved caspase-3 ekspresyon yüzdesi düşük doz CAP gruplarında anlamlı artış göstermezken ($p>0,05$); 150 µM CAP ve yüksek dozlarında ekspresyon seviyesi artmaktadır ($p<0,05$). Cis uygulamasında cleaved caspase-3 seviyesi anlamlı olarak artarken CAP ile kombinasyonu sonucu anlamlı farklılık Ki67 bulgularına benzer olarak 150 µM CAP kombinasyonu sonrasında gerçekleşmektedir.



Şekil 13. A549 hücrelerinde Cis ve farklı doz CAP uygulaması sonrasında Cleaved-Caspase 3 immunositokimya sonuçlarının % değerleri (A) ve ışık mikroskobundaki görüntüleri (B). *,**,***: K grubuna göre istatistiksel farklılık ($p<0,05$); [a], [b] : Cis grubuna göre istatistiksel farklılık ($p<0,05$). (K, Kontrol; Cis, cisplatin; CAP, Capsaicin. Bar=100 µm).

4.3. Zenogref Tümör Modelinde Yapılan Uygulamaların Değerlendirilmesi

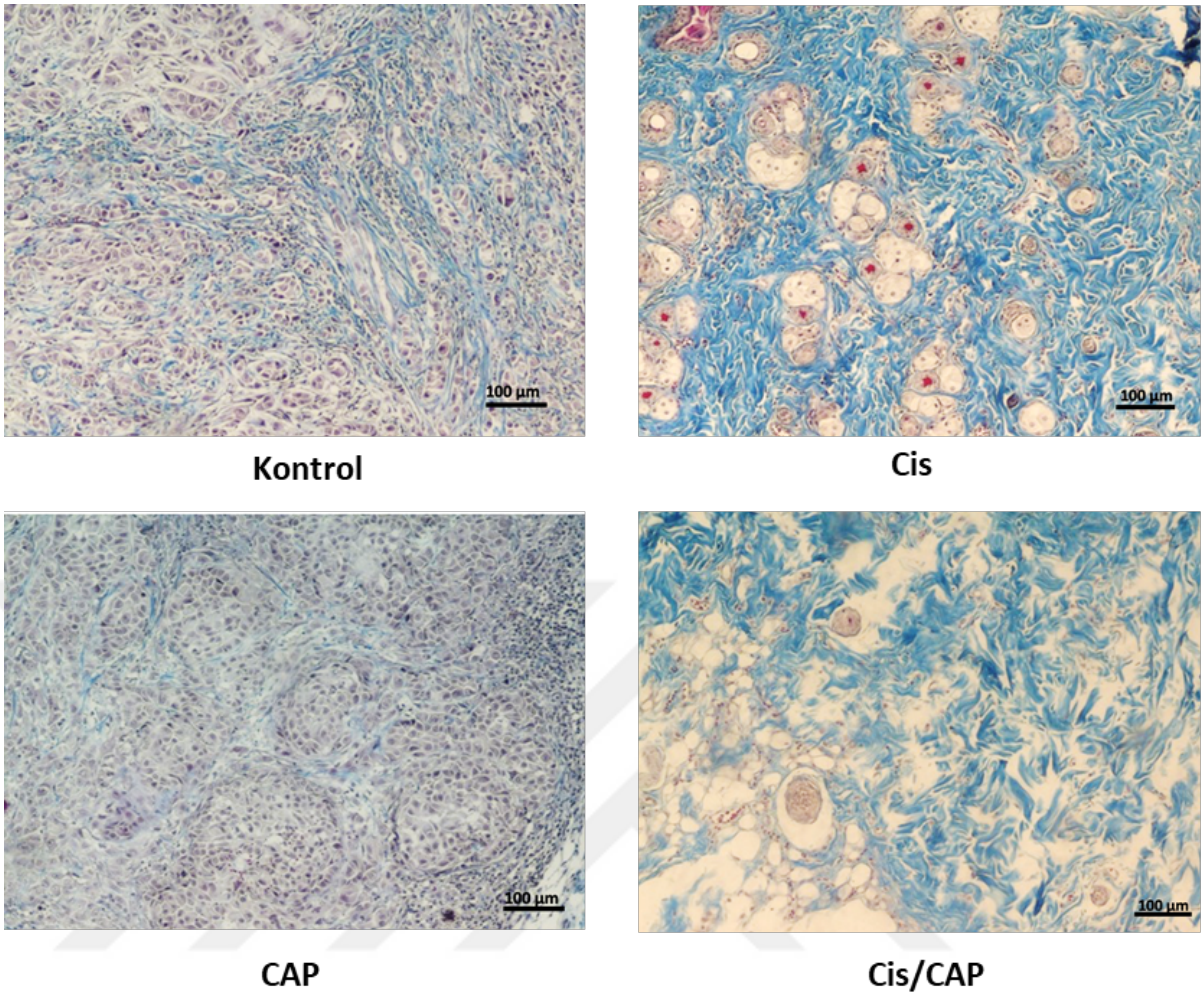
A549 hücreleri ile oluşturulan zenogref tümör modelinde ilaç uygulamalarının başlatılması için hedeflenen 150 mm^3 boyuta ulaşılmış fakat üç hafta sonra kontrol tümör dokusu regrese olmaya başladığından ve dört haftalık CAP tedavisinin etkili olduğu daha önce gösterildiğinden (Lee & Clark, 2016), deney 1000 mm^3 (deney sonlandırma sınırı) ulaşmadan sonlandırılmıştır. Üç haftalık tedavi sonrası bulgular *in vitro* bulguları desteklemektedir. Tümör boyutları değerlendirildiğinde (Tablo 1.) CAP'ın Cis ile kombinasyonu sonrasında tümör boyutları kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür ($p<0,05$).

	Kontrol	CAP	Cis	Cis/CAP
Tümör Hacmi (mm^3)	**190,23±10,2**	**51,58±5,6**	**62,24±5**	**24,37±2,8***
Relatif Tümör Büyümesi	**1**	**3,72**	**3,05**	**7,79***
Tümör Gelişim İnhibisyon Oranı (%)		**73**	**68**	**88**

Tablo 1. A549 zenogref tümör modelinde deney sonlandırıldığında tümör ölçüm analiz sonuçları.
*: Kontrol grubuna göre istatistiksel farklılık ($p<0,05$)

4.3.1 Tümör Dokusunda Histopatolojik Analiz

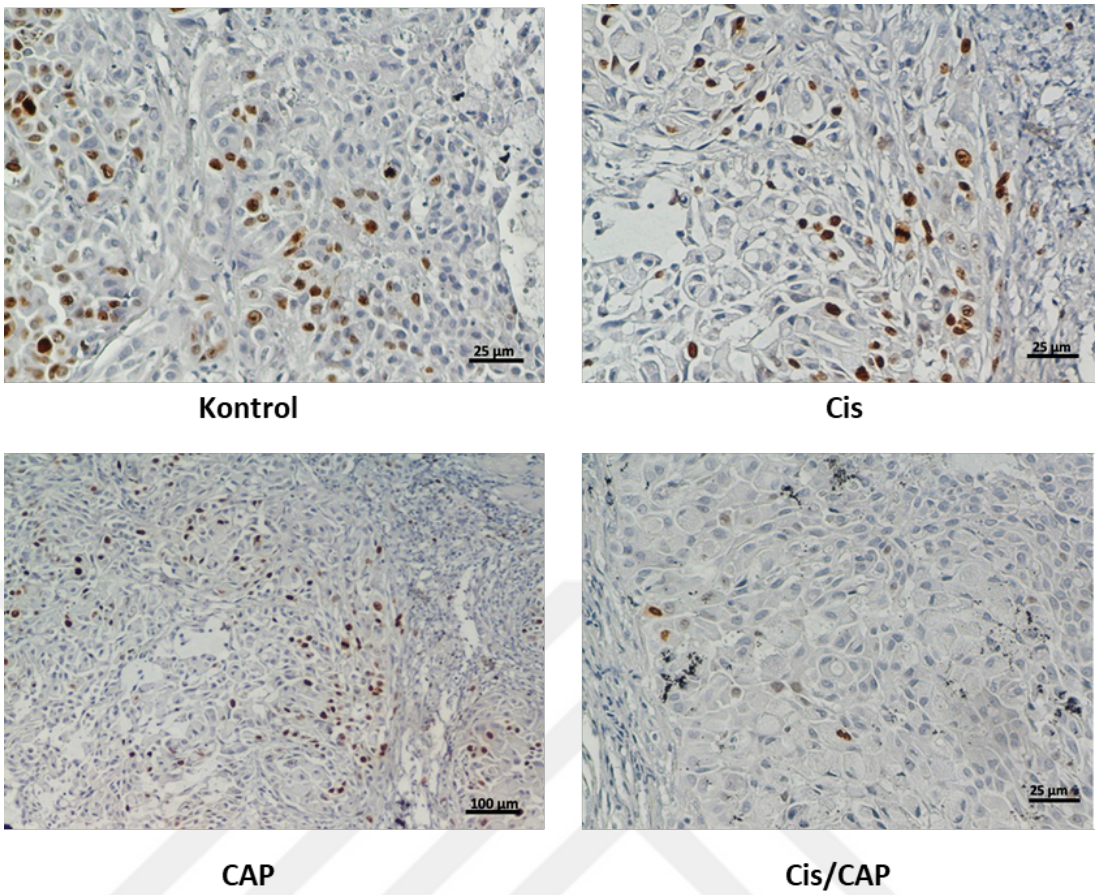
A549 zenogref tümörlerin genel histo-patoloji incelendiğinde, tümör odaklarında hücresel yapı gözlense de tümörün lokalizasyonu incelendiğinde kontrol ve CAP grubunda tek bir odak halinde büyük bir tümör gelişimi varken, kemoterapötik uygulanan gruplarda yoğun bağ doku içerinde vaskularizasyonun arttığı ve tümörlerin birden çok odakta yerleştiği gözlenmiştir (Şekil 14.). Farklı odaklarda oluşması durumu ilaç uygulaması ile bağlantılı olduğu yönünde bir araştırmaya rastlanmadığından bireysel rastlantısal farklılık olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 14. A549 zenogref tümör modelinde morfolojik inceleme. Crossman'ın üçlü boyaması. Kontrol (mısır yağı ve PBS); CAP: Capsaicin; Cis: Cisplatin Bar=100 µm.

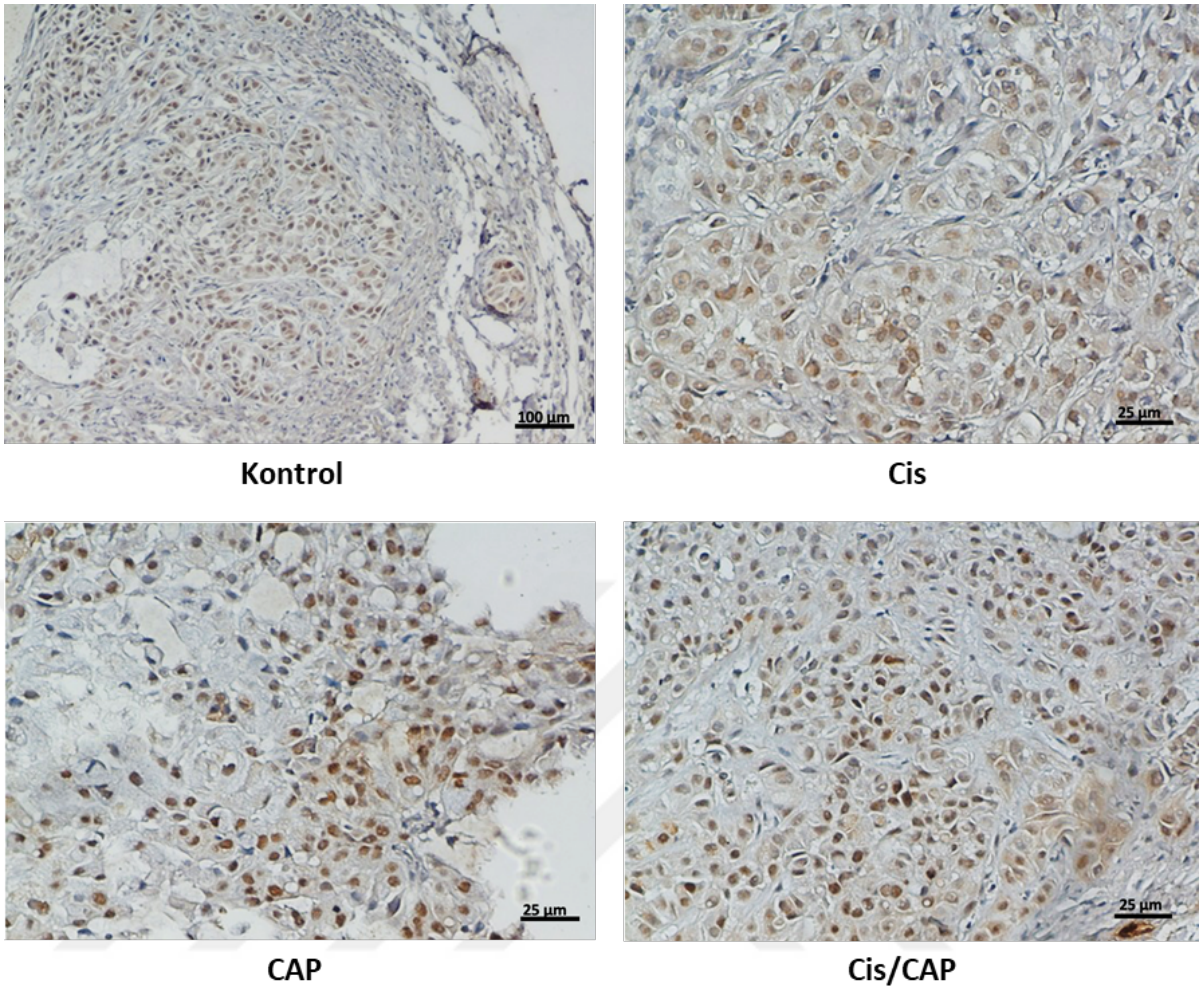
4.3.2. Tümör Dokusunda Proliferasyon ve Apoptozis Bulgularının İmmunhistokimya ile Belirlenmesi

Tümör dokusunda Ki67 lokalizayonu ve ekspresyonunu belirlemek amacı ile yapılan analiz sonrasında lokalizasyonun tüm gruplarda benzer olduğu gözlenmiştir. Fakat Cis/CAP grubunun kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde daha az Ki67 ekspresyonuna sahip olduğu anlaşılmıştır ($p<0,05$) (Şekil 15., Tablo 2.).



Şekil 15: A549 zenogref tümör modelinde Ki67 IHC boyaması. Kromojen boyası, DAB; Zıt boyama, Harris Hematoksilen. Kontrol (mısır yağı ve PBS); CAP: Capsaicin; Cis: Cisplatin Bar=25 ve 100 µm.

Tümör dokusunda Cleaved Capsase-3 lokalizayonu ve ekspresyonunu belirlemek amacı ile yapılan immunhistokimyasal analiz sonrasında lokalizasyonun tüm gruplara kıyasla Cis/CAP grubunda daha yaygın olduğu gözlenmiştir. Ekspresyon seviyeleri incelendiğinde ise Cis grubu ile Cis/CAP grubunun benzer olduğu kontrol ve CAP grubundan farklılık gösterse de ($p<0,05$), cleaved caspase-3 ekspresyonu bakımından CAP'ın kemoterapötik kombinasyonunda anlamlı farklılık oluşturmadığı anlaşılmaktadır ($p>0,05$) (Şekil 16., Tablo 2.).



Şekil 16. A549 zenogref tümör modelinde Cleaved Caspase-3 IHC boyaması. Kromojen boyası, DAB; Zıt boyama, Harris Hematoksilen. Kontrol (mısır yağı ve PBS); CAP: Capsaicin; Cis: Cisplatin Bar=25 ve 100 µm.

Tablo 2. A549 zenogref tümör modelinde Ki67 ve Cleaved Caspase-3 HSCORE analizi.

	Kontrol	**CAP**	**Cis**	**Cis/CAP**
Ki67 HSCORE	32,80±5.12	32,60±4,42	37,40±5,18	3,28±0,12*
Cleaved Caspase-3 HSCORE	44,01±6,22	60,70±8,56	220±13,80*	206,98±14,40*

*: Kontrol grubuna göre istatistiksel farklılık ($p<0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Türkiye'de akciğer kanseri hem erkekler hem de kadınlar arasında kanser kaynaklı ölümlerin en önde gelen nedenlerinden biri olup, erkeklerde en sık görülen kanser türüdür. Sağlık Bakanlığı'nın son istatistiklerine göre, akciğer kanseri vakalarının önemli bir kısmı geç evrelerde teşhis edilmekte ve bu durum, hastaların yaklaşık yarısında tanı sırasında uzak metastazların varlığına işaret etmektedir. Cerrahi müdahale, erken evre akciğer kanserinde etkili bir seçenek olmakla birlikte, ileri evrelerde genellikle uygulanabilir değildir. Bu nedenle, ilaç tedavileri, özellikle platin bazlı kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler, kombine protokollerle birlikte öncelikli tedavi stratejileri arasında yer almaktadır. Akciğer kanseri tedavisi, çeşitli tedavi yaklaşımlarına karşı oldukça dirençlidir. Bu sebeple, bitki bazlı bileşenlerin kemoterapi ile kombinasyonları gibi tedavi yaklaşımları hem etkinliği artırma hem de yan etkileri azaltma potansiyelleri açısından dikkat çekmektedir.

CAP, kırmızı biberlerin aktif bileşeni olup, güçlü antioksidan, anti-enflamatuar ve anti-kanser özelliklere sahip bir fitokimyasal olarak dikkat çekmektedir. Literatürde, CAP'ın çeşitli kanser türlerinde hücresel proliferasyonu inhibe ettiği, apoptozu tetiklediği ve tümör büyümesini baskıladığına dair bulgular yer almaktadır. Özellikle meme kanseri, prostat kanseri, akciğer kanseri, kolorektal kanser ve melanom gibi malignitelerde etkinliğini gösteren çalışmalar rapor edilmiştir. (Shin ve ark., 2008; Lau ve ark., 2014; Chen ve ark., 2015; Sánchez ve ark., 2019; Popescu ve ark., 2020). Bu tez çalışmasında, CAP'ın KHDAK hücreleri üzerindeki anti-kanser etkilerini kapsamlı bir şekilde değerlendirmeyi hedefledik. Çalışmamız, CAP'ın hücre proliferasyonu ve apoptoz üzerindeki etkilerini hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde araştırarak, özellikle kemoterapötik ajan Cis ile kombinasyonunun terapötik potansiyelini belirlemeyi amaçlamıştır. Bu doğrultuda, CAP ve Cis kombinasyonunun tümör büyümesi üzerindeki etkileri, hücresel düzeyde proliferasyon ve apoptoz belirteçleri kullanılarak analiz edilmiştir.

CAP'ın KHDAK'daki belirgin potansiyeli, akciğer kanserinin oluşumunda kemo-modülatör ve anti-kanser bir rol oynayan ekstraselüler matriks bileşenlerini ve proteazları modüle etmesi ve apoptozis gibi hücre ölüm mekanizmalarını aktive etmesi

ile ilişkili olduğu farklı çalışmalarla gösterilmiştir (Jaganathan, Purushotham, Radhakrishnan, & Swamy, 2020). CAP, normal p53'ü geri kazandırırken mutasyona uğramış p53'ü hedefleyerek KHDAK hücrelerinde antikanser etkinlik göstermektedir (Cho ve ark. 2017). KHDAK hücrelerinde CAP'ın neden olduğu oksidatif hasar, p53 aktivasyonu ve miR-34a ekspresyonunun artmasına yol açmaktadır. Eksprese edilen miR-34a, Bcl-2 protein ekspresyonunu inhibe ederek KHDAK hücrelerinin hayatta kalma şansını azaltmaktadır. p53 aktivasyonunun ardından Bax aktivasyonu, mitokondriyal ölüm reseptörü yoluyla apoptozu indüklemektedir (Chakraborty ve ark. 2014a, b). CAP ile muamele edilen akciğer epitelyal hücrelerinde, normal hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinin büyümesinde belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. İnsan akciğer kanseri hücre hattı A549'da CAP'ın, silent mating-type information regulation-1 (SIRT1) aktivasyonu ve tNOX ekspresyonunun azalması yoluyla p53 aktivasyonunu tetiklediği belirlenmiştir. Ayrıca, CAP'ın SIRT1 deasetilaz aktivitesini uyararak otofajiyi indüklediği ve p53 asetilasyonunu azalttığı tanımlanmıştır (Lee, Chen, Su & Chueh, 2015). Tiltay ve ark., (2022) yaptıkları çalışmada CAP'ın A549 hücre hattı üzerinde yüksek anti-proliferatif etkiye sahip olduğu, bu etkinin doz bağımlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, CAP'ın A549 hücrelerinde apoptotik hücre ölümüne yol açtığı gözlemlenmiştir. Bu etkinin, apoptotik mekanizmada aktif bir rol oynayan kaspaz-3 yolakları üzerinden gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu çalışma ile CAP'ın tümör üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir (Tiltay, Hüseynli, Çiftçi & Alataş, 2022). Çalışmamızda, CAP'ın A549 hücre hattında doz bağımlı anti-proliferatif etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. SRB analizleri ve Ki-67 ekspresyonu sonuçları, düşük doz CAP uygulamalarının hücre proliferasyonunda hafif bir artışa yol açtığını, ancak 150 µM ve üzeri dozlarda proliferasyonun anlamlı düzeyde baskılandığını ortaya koymuştur. Özellikle, 250 µM ve 300 µM dozlarında, hücrelerin morfolojik bütünlüklerini büyük ölçüde kaybettiği ve proliferasyon seviyelerinin minimal düzeye indiği gözlenmiştir. Bu bulgular, CAP'ın hücre çoğalmasını inhibe edici etkilerinin doz bağımlı olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Apoptoz mekanizmalarının incelenmesi kapsamında, cleaved caspase-3 ekspresyonu, proliferasyon verileriyle uyumlu bir şekilde doz bağımlı bir artış göstermiştir. Düşük doz uygulamalarında anlamlı bir farklılık gözlenmezken, 150 µM ve üzeri dozlarda apoptozun önemli ölçüde indüklendiği saptanmıştır. Bu bulgu, CAP'ın apoptotik hücre

ölümüne aracılık eden moleküler mekanizmaları aktive ettiğini ve bu yolla tümör hücrelerinin hayatta kalmasını engellediğini göstermektedir. Elde edilen veriler, CAP'ın A549 hücre hattında hem hücre proliferasyonunu baskılama hem de apoptozu indükleme yeteneğine sahip olduğunu göstermekte ve bu bileşiğin akciğer kanseri tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilmesi gerektiğine işaret etmektedir. Liu ve ark. (2022) çalışması, CAP'ın KHDAK hücre hatlarında (A549 ve NCI-H23) anti-proliferatif etkiler gösterdiğini, ancak bu etkinin apoptozdan ziyade ferroptozis yoluyla gerçekleştiğini ortaya koymaktadır. Çalışmada, apoptoz inhibitörü Z-VAD-FMK'nin CAP'ın hücre canlılığını azaltıcı etkilerini engellemediği, buna karşın ferroptozis inhibitörü Ferrostatin-1'in bu etkileri belirgin şekilde geri döndürdüğü bildirilmiştir. Bu bulgular, CAP'ın antikanser mekanizmasının öncelikli olarak ferroptozis ile ilişkili olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir (Liu, Wei & Li, 2022). Tez çalışmamızla birlikte değerlendirildiğinde, CAP'ın hem apoptozis hem de ferroptozis gibi farklı hücresel ölüm yolaklarını hedefleyerek kanser hücrelerinde çoğalmayı baskılayabileceği ve bu mekanizmaların hücresel bağlama göre değişkenlik gösterebileceği anlaşılmaktadır.

CAP'ın *in vitro* kanser hücre hatlarında sergilediği güçlü antiproliferatif etkinliğin, *in vivo* fare kanser modellerinde de tümör büyümesini baskılayarak doğrulandığını ortaya koymaktadır (Lavorgna ve ark., 2019). KHAK'ta tümör büyümesini önemli ölçüde baskıladığını göstermektedir. Fare modellerinde, diyetle CAP'ın uygulanması (10 mg/kg/gün), tümör hacminde belirgin bir azalma sağlamış ve bu etkilerin hücresel proliferasyon belirteçlerinden biri olan PCNA ekspresyonunda azalma ile ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, kaspaz-3 aktivitesindeki sınırlı artış, CAP'ın apoptotik hücre ölümünden çok hücre döngüsü düzenleyici genlerin transkripsiyonel baskılanmasıyla etkili olduğunu düşündürmektedir (Brown ve ark., 2010). Aynı çalışma grubunun farklı bir çalışmasında benzer uygulamalar sonrasında CAP tedavisinin TRPV6 reseptörleri ve downstream calpain yolakları aracılığıyla apoptozu indüklediği belirlenmiştir. TRPV6'nın tümör dokularında yüksek, ancak normal akciğer dokularında düşük ekspresyon seviyelerine sahip olması, CAP' ın seçici etkisinin temel mekanizmalarından biri olarak öne sürülmüştür. Bu bulgular, CAP'ın hedefe yönelik tedavi potansiyelini artırırken, yan

etkilerin en aza indirilebileceğini göstermektedir (Lau ve ark., 2014). Bu tez çalışması, CAP'ın KHDAK hücre hatlarında gösterdiği *in vitro* anti-proliferatif ve apoptotik etkilerinin, *in vivo* zenogref fare modellerinde de doğrulandığını ortaya koymaktadır. Çalışmamızda, CAP uygulanan farelerde tümör hacminde belirgin bir azalma gözlenmiş ve bu etkilerin, kaspaz-3 aktivitesindeki anlamlı artışla ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, CAP tedavisi, tümör dokularında apoptotik hücrelerin yoğunluğunu artırmış ve bu durum histopatolojik analizlerle desteklenmiştir. İn vivo deneysel verilerimiz, CAP'ın tümör büyümesini baskılayıcı etkilerinin yalnızca *in vitro* ortamla sınırlı olmadığını, aynı zamanda canlı modellerde de güçlü antikanser etkiler sergilediğini göstermektedir. Bu bulgular, CAP'ın KHDAK tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak değerlendirilme olasılığını desteklemektedir. Ancak, CAP'ın hedefe yönelik diğer moleküler mekanizmalarının ve uzun vadeli güvenlik profilinin daha kapsamlı çalışmalarla incelenmesi gerekmektedir. CAP'ın anti-karsinojenik etkileri sadece apoptozisi indükleyerek değil, aynı zamanda anjiogenezisi de inhibe ederek gerçekleştiği bildirilmiştir. Chakraborty ve ark. (2014) CAP tedavisinin hipoksik KHDAK koşullarında tümör kaynaklı anjiyogenezi önemli ölçüde baskıladığını göstermişlerdir. Bu etki, p53-SMAR1 pozitif geri besleme döngüsünün aktivasyonu yoluyla VEGF ekspresyonunun baskılanması ile sağlanmıştır (Chakraborty ve ark., 2014).

Cis, KHDAK tedavisinde, özellikle ileri evre hastalarda ve cerrahi müdahale yapılamayan durumlarda platin bazlı kemoterapinin altın standardı olarak kullanılmaktadır. DNA üzerinde oluşturduğu hasar aracılığıyla hücre döngüsünü durdurup apoptozu indükleme kabiliyetine sahiptir. Bu bağlamda, tedavi protokollerinin hastaların genetik ve klinik özelliklerine göre bireyselleştirilmesi, farklı kombinasyonların kullanımı, tedavi sonuçlarını optimize etme açısından kritik öneme sahip olduğu belirtilmiştir. (Kryczka ve ark., 2021). Ye ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada, hem Cis'e duyarlı (A549) hem de Cis'e dirençli (A549/DDP) KHDAK hücre hatlarında 6,25–100 μM konsantrasyonlarında uygulanmış ve Cis'in doz bağımlı olarak hücre proliferasyonunu baskıladığını ve apoptoz oranlarını artırdığını göstermiştir. Bunu pro-apoptotik Bax ve cleaved-caspase 3 protein seviyelerinde artış, anti-apoptotik Bcl-2 protein seviyelerinde ise azalma gözlenmiştir. Ayrıca, Cis'in

PI3K/AKT yolunu baskıladığı ve bu yolla hücresel ölüm mekanizmalarını desteklediği belirlenmiştir. Bununla birlikte, dirençli hücre hatlarında Cis'in etkisinin sınırlı olduğu görülmüş ve bu durum, kemoterapötik direncin mekanizmalarını aşmak için yeni kombinasyon stratejilerinin gerekliliğini vurgulamaktadır (Ye ve ark., 2017).

Bu tez çalışmasında, Cis, A549 hücre hattında hücre proliferasyonunu baskılayan ve apoptotik mekanizmaları aktive eden güçlü bir kemoterapötik ajan olarak etkili bulunmuştur. SRB testi ile Cis'in doz bağımlı antiproliferatif etkileri doğrulanmış ve cleaved caspase-3 ekspresyonundaki artış, apoptotik yolakların aktif hale geldiğini göstermiştir. Hücresel morfolojik değişikliklerin gözlemlenmesi, Cis'in apoptoz indükleyici etkilerini destekleyen önemli bir bulgu olmuştur. Benzer şekilde çalışmamızda Cis, A549 hücreleri ile oluşturulan zenogref fare modelinde tümör büyümesini anlamlı bir şekilde baskılamış ve apoptotik mekanizmaları aktive etmiştir. Cis tedavisinin, tümör dokusunda Ki-67 ekspresyonunu azaltarak hücre proliferasyonunu baskıladığı ve cleaved caspase-3 ekspresyonunu artırarak apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, Cis'in KHDAK tedavisinde etkili bir kemoterapötik ajan olarak rolünü desteklemekte ve apoptotik yolakları hedef alarak tümör gelişimini engellediğini ortaya koymaktadır.

Cis, KHDAK tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajan olsa da yüksek toksisite ve direnç gelişimi gibi sınırlamaları bulunmaktadır. Bu sorunlar, Cis tedavisinin etkinliğini artırmak ve yan etkilerini azaltmak amacıyla kombine tedavi yaklaşımlarını ön plana çıkarmıştır. Özellikle, bitkisel kaynaklı ekstraktlar, düşük toksisite profilleri ve çoklu biyolojik mekanizmaları hedefleyebilme kapasiteleri nedeniyle önemli bir potansiyel taşımaktadır (Ghosh ve ark., 2024). Bu doğrultuda, biz de çalışmamızda kırmızı acı biberin aktif bileşeni olan CAP'ın, Cis ile kombinasyon halinde kullanımını değerlendirerek, bu doğal bileşiğin kemoterapötik etkinlik üzerindeki potansiyel sinerjik etkilerini araştırmayı amaçladık. CAP ve Cis kombinasyonu, özellikle 150 µM CAP dozu ile en güçlü proliferasyon inhibisyonu ve apoptoz indüksiyonu sağlayarak Cis'in etkisine additif etki kazandırmıştır. Daha yüksek CAP dozlarında hücre morfolojinin bozulması ve hücre proliferasyonundaki ani düşüş CAP'ın toksik etkisi olarak değerlendirilmiştir. CAP ve Cis

kombinasyonunun KHDAK zenogref modelindeki etkilerinin incelendiği tez çalışmasının *in vivo* bölümünde kombine tedavi uygulanan farelerde, tümör hacminin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Ayrıca, relatif tümör büyümesi ve tümör gelişim inhibisyon oranları, sadece Cis veya CAP uygulanan gruplardan daha yüksek bulunmuştur, bu da kombinasyon tedavisinin sinerjik etkilerini göstermektedir. Histopatolojik analizler, CAP ve Cis kombinasyonunun hücre proliferasyonunu baskılayarak, Ki-67 ekspresyonunda anlamlı bir azalma sağladığını ortaya koymuştur. Apoptoz analizi ise cleaved caspase-3 ekspresyonunun Cis ve Cis/CAP gruplarında kontrol ve yalnız CAP gruplarına göre belirgin şekilde arttığını, ancak CAP'ın Cis etkisini bu bağlamda daha fazla güçlendirmediğini göstermiştir. Böylece, bu çalışma CAP ve Cis kombinasyonunun KHDAK zenogref modelinde tümör hacmi üzerinde sinerjik bir azalma sağladığını ve hücre proliferasyonunu baskıladığını göstermektedir. Bununla birlikte, apoptozis üzerindeki etkiler, CAP ve Cis kombinasyonunun sinerjik olmadığı, ancak Cis'in apoptotik etkilerinin korunmasına yardımcı olduğu yönünde bir eğilim göstermiştir. Bu bulgular, CAP'ın kemoterapötik kombinasyonlarda tamamlayıcı bir ajan olarak kullanılma potansiyeline işaret etmektedir. Literatürde, CAP ve Cis'in KHDAK üzerinde birlikte kullanıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, bu iki ajanının farklı kanser türlerinde hem *in vitro* hem de *in vivo* modellerde kombinasyon halinde kullanıldığı çalışmalar, elde ettiğimiz sonuçlarla uyumlu bulgular ortaya koymaktadır (Wang ve ark., 2018). Bu durum, CAP ve Cis kombinasyonunun KHDAK'da da potansiyel additif ve/veya sinerjik etkiler gösterebileceğine işaret etmektedir. Yapılan bir çalışmada, CAP ve Cis kombinasyonunun osteosarkom hücreleri üzerinde sinerjik sitotoksik etkiler gösterdiği bulunmuştur (Wang ve ark., 2020). Bu kombinasyon, hücrelerde apoptoz indüksiyonu, hücre döngüsü durdurma ve invazyon inhibisyonu gibi etkiler sağlamıştır. Ayrıca, farelerde yapılan deneylerde tümör büyümesinin baskılandığı gözlemlenmiştir (Wang ve ark., 2018). Nazofarenks karsinomu üzerine yapılan bir başka araştırmada, CAP ve Cis kombinasyonunun hücre göçü ve invazyonunu inhibe ettiği, epitel-mezenkimal geçişi (EMT) ve ERK sinyal yolunu baskıladığı tespit edilmiştir (Xu ve ark., 2024). Dil skuamöz hücreli karsinomu hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, CAP ve Cis kombinasyonunun TGF-β1 ile indüklenen EMT ve hücre göçünü Claudin-1/PI3K/AKT/mTOR sinyal yolu üzerinden

inhibe ettiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2024). Bu bulgular, çalışmamıza benzer olarak CAP ve Cis kombinasyonunun hücre apoptozu üzerindeki etkilerine doğrudan benzerlik göstermemekle birlikte, CAP ve Cis kombinasyonunun belirli kanser türlerinde potansiyel terapötik etkiler sağlayabileceğini ortaya koyan sonuçlarla paralellik göstermektedir. Bu durum, CAP ve Cis'in farklı kanser modellerinde sinerjik ve/veya aditif etkinlik gösterebileceğine işaret etmekte ve bu kombinasyonun klinik uygulamalarda değerlendirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak;

- CAP, *in vitro* modellerde düşük dozlarda (50-100 µM) hücre proliferasyonunu artırabilirken, 150 µM ve üzerindeki dozlarda proliferasyonu baskılayarak apoptozu indüklemiştir. Özellikle yüksek dozlarda hücre morfolojisini bozarak tümör hücrelerinin büyümesini durdurmuştur. *İn vivo* zenogref modelde ise CAP, tek başına uygulandığında tümör hacmini kontrol grubuna göre %73 oranında inhibe etmiş, Ki-67 ekspresyonunu azaltarak proliferasyonu baskılamış ve apoptozu artırmıştır.

- CAP ve Cis kombinasyonu *in vitro* ortamda, özellikle 150 µM CAP dozunda, hücre proliferasyonunu sadece Cis'e kıyasla daha güçlü bir şekilde baskılamış ve cleaved caspase-3 ekspresyonunu artırarak apoptozu anlamlı şekilde indüklemiştir. *İn vivo* zenogref modelde ise kombinasyon tedavisi, tümör hacmini kontrol grubuna göre %88 oranında azaltarak en yüksek tümör inhibisyon oranını sağlamıştır. Ayrıca, Ki-67 ekspresyonunun belirgin şekilde azalması ile proliferasyonun baskılandığı, cleaved caspase-3 ekspresyonunun ise artarak apoptozu desteklediği gösterilmiştir.

6. KAYNAKLAR

Adetunji, T. L., Olawale, F., Olisah, C., Adetunji, A. E., & Aremu, A. O. (2022). Capsaicin: A two-decade systematic review of global research output and recent advances against human cancer. Frontiers in Oncology, 12, 908487. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.908487

Amaral, J. D., Xavier, J. M., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. (2010). The role of p53 in apoptosis. Discovery medicine, 9(45), 145-152.

Auperin, A., Le Pechoux, C., Rolland, E., Curran, W. J., Furuse, K., Fournel, P., … & Belderbos, J. (2010). Meta-analysis of concomitant versus sequential radiochemotherapy in locally advanced non-small-cell lung cancer. Journal of Clinical Oncology, 28(13), 2181-2190. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.2543

Basu, A., & Krishnamurthy, S. (2010). Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. Journal of nucleic acids, 2010(1), 201367. https://doi.org/10.4061/2010/201367

Bode, A. M., & Dong, Z. (2011). The two faces of capsaicin. Cancer Research, 71(8), 2809-2814. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3756

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians, 68(6), 394-424. https://doi.org/10.3322/caac.21492

Brown, K. C., Witte, T. R., Hardman, W. E., Luo, H., Chen, Y. C., Carpenter, A. B., ... & Dasgupta, P. (2010). Capsaicin displays anti-proliferative activity against human small cell lung cancer in cell culture and nude mice models via the E2F pathway. PLoS one, 5(4), e10243. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010243

Browning, R. J., Reardon, P. J. T., Parhizkar, M., Pedley, R. B., Edirisinghe, M., Knowles, J. C., & Stride, E. (2017). Drug delivery strategies for platinum-based chemotherapy. ACS nano, 11(9), 8560-8578. https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04092

Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., & Julius, D. (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature, 389(6653), 816-824. https://doi.org/10.1038/39807

Chakraborty S, Adhikary A, Mazumdar M, Mukherjee S, Bhattacharjee P, Guha D, Choudhuri T, Chattopadhyay S, Sa G, Sen A, Das T (2014a) Capsaicin-induced activation of p53-SMAR1 auto-regulatory loop down-regulates VEGF in non-small cell lung cancer to restrain angiogenesis. PLoS One 9(6):e99743-e99743. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099743

Chakraborty S, Mazumdar M, Mukherjee S, Bhattacharjee P (2014b) Restoration of p53/miR-34a regulatory axis decreases survival advantage and ensures Bax-dependent apoptosis of non-small cell lung carcinoma cells. FEBS Lett 588(4):549-559. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.11.040

Chang, H. C., Chen, S. T., Chien, S. Y., Kuo, S. J., Tsai, H. T., & Chen, D. R. (2011). Capsaicin may induce breast cancer cell death through apoptosis-inducing factor involving mitochondrial dysfunction. Human & experimental toxicology, 30(10), 1657-1665. https://doi.org/10.1177/0960327110396530

Chen, D., Yang, Z., Wang, Y., Zhu, G., & Wang, X. (2012). Capsaicin induces cycle arrest by inhibiting cyclin-dependent-kinase in bladder carcinoma cells.

International journal of urology, 19(7), 662-668. https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2012.02981.x

Chen, K. S., Chen, P. N., Hsieh, Y. S., Lin, C. Y., Lee, Y. H., & Chu, S. C. (2015). Capsaicin protects endothelial cells and macrophage against oxidized low-density lipoprotein-induced injury by direct antioxidant action. Chemico-Biological Interactions, 228, 35-45. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.007

Chinreddy, S. R., Mashozhera, N. T., Rashrash, B., Flores-Iga, G., Nimmakayala, P., Hankins, G. R., ... & Reddy, U. K. (2024). Unraveling TRPV1's Role in Cancer: Expression, Modulation, and Therapeutic Opportunities with Capsaicin. Molecules, 29(19), 4729. https://doi.org/10.3390/molecules29194729

Cho S, Lee H, Choi BY (2017) An updated review on molecular mechanisms underlying the anticancer effects of capsaicin. Food Sci Biotechnol 26(1):1-13. https://doi.org/10.1007/s10068-017-0001-x

Choi, C. H., Jung, Y. K., & Oh, S. H. (2010). Autophagy induction by capsaicin in malignant human breast cells is modulated by p38 and extracellular signal-regulated mitogen-activated protein kinases and retards cell death by suppressing endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis. Molecular pharmacology, 78(1), 114-125. https://doi.org/10.1124/mol.110.063495

Clark, R., & Lee, S.-H. (2016). Anticancer properties of capsaicin against human cancer. Anticancer Research, 36(3), 837-843.

Cromie MM, Gao W. (2015) Epigallocatechin-3-gallate enhances the therapeutic effects of leptomycin B on human lung cancer a549 cells. Oxid Med Cell Longev. 2015;2015: 217304. https://doi.org/10.1155/2015/217304

Devesa, S. S., Bray, F., Vizcaino, A. P., & Parkin, D. M. (2005). International lung cancer trends by histologic type: male: female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. International journal of cancer, 117(2), 294-299. https://doi.org/10.1002/ijc.21183

Gadgeel, S. M., Ramalingam, S. S., & Kalemkerian, G. P. (2012). Treatment of lung cancer. Radiologic Clinics, 50(5), 961-974. https://doi.org/10.1016/j.rcl.2012.06.003

Galano, A., & Martínez, A. (2012). Capsaicin, a tasty free radical scavenger: mechanism of action and kinetics. The journal of physical chemistry B, 116(3), 1200-1208. https://doi.org/10.1021/jp211172f

Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., & Kroemer, G. (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. Oncogene, 31(15), 1869-1883. https://doi.org/10.1038/onc.2011.384

Garufi, A., Pistritto, G., Cirone, M., & D'Orazi, G. (2016). Reactivation of mutant p53 by capsaicin, the major constituent of peppers. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 35, 1-9. https://doi.org/10.1186/s13046-016-0417-9

Ghosh, S. (2019). Cisplatin and cancer: multiple mechanisms of resistance. Current Opinion in Oncology, 31(3), 215-221.

Ghosh, S., Das, S. K., Sinha, K., Ghosh, B., Sen, K., Ghosh, N., & Sil, P. C. (2024). The Emerging Role of Natural Products in Cancer Treatment. Archives of Toxicology, 1-39. https://doi.org/10.1007/s00204-024-03786-3

Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W. E., … & Giroux, D. J. (2016). 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. Journal of Thoracic Oncology, 11(1), 39-51.

https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.09.009
Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. cell, 144(5), 646-674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013
Haugen, A., & Mollerup, S. (2008). Etiology of lung cancer. In Textbook of lung cancer (pp. 17-25). CRC Press. https://doi.org/10.3109/9781439802014-2
Holzer, A. K., Manorek, G. H., & Howell, S. B. (2006). Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. Molecular pharmacology, 70(4), 1390-1394. https://doi.org/10.1124/mol.106.022624
Howlader, N., Forjaz, G., Mooradian, M. J., Meza, R., Kong, C. Y., Cronin, K. A., ... & Feuer, E. J. (2020). The effect of advances in lung-cancer treatment on population mortality. New England Journal of Medicine, 383(7), 640-649.Hoy, https://doi.org/10.1056/NEJMoa1916623
Hoy, H., Lynch, T., & Beck, M. (2019). Surgical treatment of lung cancer. Critical Care Nursing Clinics, 31(3), 303-313. https://doi.org/10.1016/j.cnc.2019.05.002
Hu S, Li X, Xu R, Ye L, Kong H, Zeng X, Wang H, Xie W. (2016). The synergistic effect of resveratrol in combination with cisplatin on apoptosis via modulating autophagy in A549 cells. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai); 48(6):528-35. https://doi.org/10.1093/abbs/gmw026
Jaganathan, R., Purushotham, B., Radhakrishnan, N., & Swamy, M. K. (2020). Capsaicin and its potential anticancer mechanisms of action. Plant-derived Bioactives: Chemistry and Mode of Action, 301-321. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2361-8_14
Jamieson, E. R., & Lippard, S. J. (1999). Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. Chemical Reviews, 99(9), 2467-2498. https://doi.org/10.1021/cr980421n
Jung, Y., & Lippard, S. J. (2007). Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage. Chemical reviews, 107(5), 1387-1407. https://doi.org/10.1021/cr068207j
Kamaruddin, M. F., Hossain, M. Z., Mohamed Alabsi, A., & Mohd Bakri, M. (2019). The antiproliferative and apoptotic effects of capsaicin on an oral squamous cancer cell line of Asian origin, ORL-48. Medicina, 55(7), 322. https://doi.org/10.3390/medicina55070322
Kang, J. H., Kim, C. S., Han, I. S., Kawada, T., & Yu, R. (2007). Capsaicin, a spicy component of hot peppers, modulates adipokine gene expression and protein release from obese-mouse adipose tissues and isolated adipocytes, and suppresses the inflammatory responses of adipose tissue macrophages. FEBS letters, 581(23), 4389-4396. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.07.082
Kang, J. Y., Teng, C. H., Wee, A., & Chen, F. C. (1995). Effect of capsaicin and chilli on ethanol induced gastric mucosal injury in the rat. Gut, 36(5), 664-669. https://doi.org/10.1136/gut.36.5.664
Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. Nature Reviews Cancer, 7(8), 573-584. https://doi.org/10.1038/nrc2167
Kim, C. S., Kawada, T., Kim, B. S., Han, I. S., Choe, S. Y., Kurata, T., & Yu, R. (2003). Capsaicin exhibits anti-inflammatory property by inhibiting IkB-a degradation in LPS-stimulated peritoneal macrophages. Cellular signalling, 15(3), 299-306. https://doi.org/10.1016/S0898-6568(02)00086-4
Kim, C. S., Park, W. H., Park, J. Y., Kang, J. H., Kim, M. O., Kawada, T., & Yu,

R. (2004). Capsaicin, a spicy component of hot pepper, induces apoptosis by activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ in HT-29 human colon cancer cells. Journal of medicinal food, 7(3), 267-273. https://doi.org/10.1089/jmf.2004.7.267

Kim, S. M., Oh, E. Y., Lee, J. H., Nam, D., Lee, S. G., Lee, J., ... & Ahn, K. S. (2015). Brassinin combined with capsaicin enhances apoptotic and anti-metastatic effects in PC-3 human prostate cancer cells. Phytotherapy Research, 29(11), 1828-1836. https://doi.org/10.1002/ptr.5478

Kim, Y. M., HWANG, J. T., Kwak, D. W., Lee, Y. K., & Park, O. J. (2007). Involvement of AMPK signaling cascade in capsaicin-induced apoptosis of HT-29 colon cancer cells. Annals of the New York Academy of Sciences, 1095(1), 496-503. https://doi.org/10.1196/annals.1397.053

Kryczka, J., Kryczka, J., Czarnecka-Chrebelska, K. H., & Brzeziańska-Lasota, E. (2021). Molecular mechanisms of chemoresistance induced by cisplatin in NSCLC cancer therapy. International Journal of Molecular Sciences, 22(16), 8885. https://doi.org/10.3390/ijms22168885

Lau, J. K., Brown, K. C., Dom, A. M., Witte, T. R., Thornhill, B. A., Crabtree, C. M., ... & Dasgupta, P. (2014). Capsaicin induces apoptosis in human small cell lung cancer via the TRPV6 receptor and the calpain pathway. Apoptosis, 19, 1190-1201. https://doi.org/10.1007/s10495-014-1007-y

Lavorgna, M., Orlo, E., Nugnes, R., Piscitelli, C., Russo, C., & Isidori, M. (2019). Capsaicin in hot chili peppers: İn vitro evaluation of its antiradical, antiproliferative and apoptotic activities. Plant Foods for Human Nutrition, 74(2), 164-170. https://doi.org/10.1007/s11130-019-00722-0

Le, T. D., Jin, D. C., Rho, S. R., Kim, M. S., Yu, R., & Yoo, H. (2012). Capsaicin-induced apoptosis of FaDu human pharyngeal squamous carcinoma cells. Yonsei Medical Journal, 53(4), 834. https://doi.org/10.3349/ymj.2012.53.4.834

Lebwohl, D., & Canetta, R. (1998). Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. European journal of cancer, 34(10), 1522-1534. https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00224-X

Lee, S. H., & Clark, R. (2016). Anti-tumorigenic effects of capsaicin in colon cancer. J Food Chem Nanotechnol, 2(4), 162-167. https://doi.org/10.17756/jfcn.2016-025

Lee YH, Chen HY, Su LJ, Chueh PJ (2015) Sirtuin 1 (SIRT1) Deacetylase activity and NAD(+)/NADH ratio are imperative for capsaicin-mediated programmed cell death. J Agric Food Chem 63(33):7361-7370. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02876

Lee, S. H., Richardson, R. L., Dashwood, R. H., & Baek, S. J. (2012). Capsaicin represses transcriptional activity of β-catenin in human colorectal cancer cells. The Journal of nutritional biochemistry, 23(6), 646-655. https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.03.009

Li, Z., Zhao, Q., Liu, X., Zhou, X., Wang, Y., Zhao, M., ... & Guo, X. (2024). Capsaicin combined with cisplatin inhibits TGF-β1-induced EMT and TSCC cells migration via the Claudin-1/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. Cancer Cell International, 24(1), 300. https://doi.org/10.1186/s12935-024-03485-0

Litzky, L. A. (2010). Pulmonary neuroendocrine tumors. Surgical Pathology Clinics, 3(1), 27-59. https://doi.org/10.1016/j.path.2010.03.007

Liu, X. Y., Wei, D. G., & Li, R. S. (2022). Capsaicin induces ferroptosis of NSCLC by regulating SLC7A11/GPX4 signaling in vitro. Scientific reports, 12(1), 11996.

https://doi.org/10.1038/s41598-022-16372-3
Marullo, R., Werner, E., Degtyareva, N., Moore, B., Altavilla, G., Ramalingam, S. S., & Doetsch, P. W. (2013). Cisplatin induces a mitochondrial-ROS response that contributes to cytotoxicity depending on mitochondrial redox status and bioenergetic functions. PloS one, 8(11), e81162. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081162
Min, J. K., Han, K. Y., Kim, E. C., Kim, Y. M., Lee, S. W., Kim, O. H., ... & Kwon, Y. G. (2004). Capsaicin inhibits in vitro and in vivo angiogenesis. Cancer research, 64(2), 644-651. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3250
Mordant, P., Grand, B., Cazes, A., Foucault, C., Dujon, A., Barthes, F. L. P., & Riquet, M. (2013). Adenosquamous carcinoma of the lung: surgical management, pathologic characteristics, and prognostic implications. The Annals of Thoracic Surgery, 95(4), 1189-1195. https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2012.12.037
Mori, A., Lehmann, S., O'Kelly, J., Kumagai, T., Desmond, J. C., Pervan, M., … & Koeffler, H. P. (2006). Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. Cancer Research, 66(6), 3222-3229. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0087
Oyagbemi, A. A., Saba, A. B., & Azeez, O. I. (2010). Capsaicin: a novel chemopreventive molecule and its underlying molecular mechanisms of action. Indian journal of cancer, 47(1), 53-58. https://doi.org/10.4103/0019-509X.58860
Qian, K., Wang, G., Cao, R., Liu, T., Qian, G., Guan, X., ... & Wang, X. (2016). Capsaicin suppresses cell proliferation, induces cell cycle arrest and ROS production in bladder cancer cells through FOXO3a-mediated pathways. Molecules, 21(10), 1406. https://doi.org/10.3390/molecules21101406
Popescu, G. D. A., Scheau, C., Badarau, I. A., Dumitrache, M. D., Caruntu, A., Scheau, A. E., ... & Caruntu, C. (2020). The effects of capsaicin on gastrointestinal cancers. Molecules, 26(1), 94. https://doi.org/10.3390/molecules26010094
Rybak, L. P., Whitworth, C. A., Mukherjea, D., & Ramkumar, V. (2007). Mechanisms of cisplatin-induced ototoxicity and prevention. Hearing research, 226(1-2), 157-167. https://doi.org/10.1016/j.heares.2006.09.015
Sanchez, A. M., Sanchez, M. G., Malagarie-Cazenave, S., Olea, N., & Diaz-Laviada, I. (2007). Induction of apoptosis in prostate tumor PC-3 cells and inhibition of xenograft prostate tumor growth by the vanilloid capsaicin. Apoptosis, 12(12), 2013-2021. https://doi.org/10.1007/s10495-007-0119-z
Sanchez, A. M., Sanchez, M. G., Malagarie-Cazenave, S., Olea, N., & Diaz-Laviada, I. (2006). Induction of apoptosis in prostate tumor PC-3 cells and inhibition of xenograft prostate tumor growth by the vanilloid capsaicin. Apoptosis, 11, 89-99. https://doi.org/10.1007/s10495-005-3275-z
Scagliotti, G. V., Parikh, P., von Pawel, J., Biesma, B., Vansteenkiste, J., Manegold, C., Serwatowski, P., Gatzemeier, U., Digumarti, R., Zukin, M., Lee, J. S., Mellemgaard, A., Park, K., Patil, S., Rolski, J., Goksel, T., de Marinis, F., Simms, L., Gandara, D., & Jassem, J. (2008). Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naive patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. Journal of Clinical Oncology, 26 https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0375
Scagliotti, G. V., Parikh, P., Von Pawel, J., Biesma, B., Vansteenkiste, J., Manegold, C., ... & Gandara, D. (2023). Phase III Study Comparing Cisplatin Plus Gemcitabine With Cisplatin Plus Pemetrexed in Chemotherapy-Naive Patients

With Advanced-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. Journal of Clinical Oncology, 41(14), 2458-2466. https://doi.org/10.1200/JCO.22.02544
Schwartz, A. G. (2016). Epidemiology and Etiology of Lung Cancer. Handb Lung Cancer Other Thorac Malig, 1. https://doi.org/10.1891/9781617052729.0001
Sen GS, Mohanty S, Hossain DMS, Bhattacharyya S, Banerjee S, Chakraborty J, Saha S, Ray P, Bhattacharjee P, Mandal D, Bhattacharya A, Chattopadhyay S, Das T, Sa G. Curcumin enhances the efficacy of chemotherapy by tailoring p65NFκB-p300 cross-talk in favor of p53-p300 in breast cancer. J Biol Chem. 2011 Dec 9;286(49):42232-42247. https://doi.org/10.1074/jbc.M111.262295
Sharma, S. K., Vij, A. S., & Sharma, M. (2013). Mechanisms and clinical uses of capsaicin. European journal of pharmacology, 720(1-3), 55-62. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.10.053
Shirley, M., & Keam, S. J. (2022). Aumolertinib: a review in non-small cell lung cancer. Drugs, 82(5), 577-584. https://doi.org/10.1007/s40265-022-01695-2
Sholl LM. (2014). Large-cell carcinoma of the lung: a diagnostic category redefined by immunohistochemistry and genomics. Curr Opin Pulm Med. 20(4):324-31. doi: 10.1097/MCP.0000000000000068. https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000068
Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 70(1), 7-30. https://doi.org/10.3322/caac.21590
Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. CA: a cancer journal for clinicians, 73(1), 17-48. https://doi.org/10.3322/caac.21763
Srinivasan, K. (2016). Biological activities of red pepper (Capsicum annuum) and its pungent principle capsaicin: a review. Critical reviews in food science and nutrition, 56(9), 1488-1500. https://doi.org/10.1080/10408398.2013.772090
Surh, Y. J. (2002). More than spice: Capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. Journal of the National Cancer Institute, 94(17), 1263-1265. https://doi.org/10.1093/jnci/94.17.1263
Szallasi, A., & Blumberg, P. M. (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. Pharmacological reviews, 51(2), 159-212. https://doi.org/10.1016/S0031-6997(24)01403-0
T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 01 Kasım 2023, https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/haberler/akciger-kanseri-farkindalik-ayi.html
Tiltay, M., Hüseynli, A., Çiftçi, G. A., & Alataş, İ. Ö. (2022). Capsaicin inhibits proliferation and induces apoptosis in human lung adenocarcinoma A549 cell line. European Journal of Life Sciences, 1(2), 46-54. https://doi.org/10.55971/EJLS.1151479
Travis, W. D., Brambilla, E., Burke, A. P., Marx, A., & Nicholson, A. G. (2015). Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. Journal of Thoracic Oncology, 10(9), 1240-1242. https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000663
Vel, S. K., Ramakrishnan, A., Sindya, J., Rajanathadurai, J., & Perumal, E. (2024). Evaluation of cytotoxic and anti-cancer potential of capsaicin on lung cancer cell line: an in vitro investigation. Cureus, 16(8), e68119. https://doi.org/10.7759/cureus.68119
Wang, Y., Lu, J., Jiang, B., & Guo, J. (2020). The roles of curcumin in regulating the tumor immunosuppressive microenvironment. Oncology letters, 19(4), 3059-

3070. https://doi.org/10.3892/ol.2020.11437
Wang, Y., Deng, X., Yu, C., Zhao, G., Zhou, J., Zhang, G., ... & Zhang, Y. (2018). Synergistic inhibitory effects of capsaicin combined with cisplatin on human osteosarcoma in culture and in xenografts. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 37, 1-17. https://doi.org/10.1186/s13046-018-0922-0
Warner, K. E., & Mendez, D. (2010). Tobacco control policy in developed countries: yesterday, today, and tomorrow. Nicotine & Tobacco Research, 12(9), 876-887. https://doi.org/10.1093/ntr/ntq125
Wu, D., Jia, H., Zhang, Z., & Li, S. (2020). Capsaicin suppresses breast cancer cell viability by regulating the CDK8/PI3K/Akt/Wnt/β catenin signaling pathway. Molecular Medicine Reports, 22(6), 4868-4876. https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11585
Xu, Y., Kong, W., Zhao, S., Xiong, D., & Wang, Y. (2024). Capsaicin enhances cisplatin-induced anti-metastasis of nasopharyngeal carcinoma by inhibiting EMT and ERK signaling via serpin family B member 2. Carcinogenesis, bgae032. https://doi.org/10.1093/carcin/bgae032
Yang, K., Pyo, J., Kim, G. Y., Yu, R., Han, I., Ju, S., & Kim, B. S. (2009). Capsaicin induces apoptosis by generating reactive oxygen species and disrupting mitochondrial transmembrane potential in human colon cancer cell lines. Cellular and Molecular Biology Letters, 14(3), 497-510. https://doi.org/10.2478/s11658-009-0016-2
Yang, Z. H., Wang, X. H., Wang, H. P., Hu, L. Q., Zheng, X. M., & Li, S. W. (2010). Capsaicin mediates cell death in bladder cancer T24 cells through reactive oxygen species production and mitochondrial depolarization. Urology, 75(3), 735-741. https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.03.042
Ye, L. Y., Hu, S., Xu, H. E., Xu, R. R., Kong, H., Zeng, X. N., & Wang, H. (2017). The effect of tetrandrine combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of A549/DDP cells and A549 cells. Cancer cell international, 17, 1-10. https://doi.org/10.1186/s12935-017-0410-1
Zappa, C., & Mousa, S. A. (2016). Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. Translational lung cancer research, 5(3), 288. https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07
Zhang, S., Wang, D., Huang, J., Hu, Y., & Xu, Y. (2020). Application of capsaicin as a potential new therapeutic drug in human cancers. Journal of clinical pharmacy and therapeutics, 45(1), 16-28. https://doi.org/10.1111/jcpt.13039
Zhang, Y., Li, Y., Han, Y., Li, M., Li, X., Fan, F., & Li, S. (2023). Experimental study of EGFR-TKI aumolertinib combined with ionizing radiation in EGFR mutated NSCLC brain metastases tumor. European Journal of Pharmacology, 945, 175571. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175571

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

AKT: Protein Kinaz B
AMPK: Aktive edici protein kinaz
BCA: Bikinkoninik asit
CAP: Capsaicin
CDK: Siklin bağımlı kinaz
Cis: Cisplatin
CTR1: Bakır taşıyıcı protein-1
DAMPs: Hasar ilişkili moleküler paternler
DDP: diaminodichloroplatinum,
DMSO: Dimetilsülfoksit
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA: Etilendiamintetraasetik asit
EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
EMT: Epitelyal Mezenşimal Geçiş
ERK: Extracellular signal regulated kinase
FaDu: Faringeal skuamöz karsinom hücreleri
FBS: Fötal Bovine Serum
FDA: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
HIV: İnsan İmmun Yetmezlik Virusu
HRP: Horse Radish Peroxidase
KHAK: Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK: Küçük hücreli dışı akciğer kanseri
LCNEC: Büyük hücreli nöroendokrin karsinom
MAPK: Mitojenle etkinleşen protein kinaz
mTOR: Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
NSCLC: Non-Small Cell Lung Cancer
PARP-1: Poli-ADP riboz polimeraz-1
PD-1: Programlanmış hücre ölüm proteini-1
PDL-1: Programlanmış hücre ölüm ligandı-1
PI3K: Fosfatidil-inositol-3-kinaz
PPARγ: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PVDF: Polivinil florür
ROS: Reaktif oksijen türleri
SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi)
SHU: Scoville Heat Units
SIRT-1: silent mating type information regulation 2 homolog- 1
SRB: Sulforhodamine B
tNOX: Tümörle ilişkili NADH oksidazı
TRP: Geçici salım potansiyeli
TRPV1: Transient reseptör potansiyel vanilloid 1
TRPV6: Geçici reseptör potansiyel vanilloid alt aile üyesi 6
VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
Z-VAD-FMK: Genel Kaspaz İnhibitörü

8. EKLER

EK 1: Şekil Listesi

Şekil 1. Cisplatin'in yapısı ve etki meknizması 9
Şekil 2. CAP'ın kimyasal formülü… 11
Şekil 3. CAP'ın apoptotik etkisinde rol oynayan hücre içi sinyal yolu… 15
Şekil 4. Hücrelerin immunohistokimya (A) ve Western Blot (B) için ekilmesi 18
Şekil 5. CD-1 nude farelerin kabin içerisinde altlık değişimi ve bakımlarının yapılması..... 20
Şekil 6. A549 hücrelerin hazırlanması ve flank bölgesine enjeksiyonları 20
Şekil 7. Tümör ölçümlerinin yapılması ve intraperitoneal tedavi uygulamaları 21
Şekil 8. Kontrol (A) ve tedavi (B) grubunda tümör ölçümleri..... 22
Şekil 9. Hücrelerin SRB analizi sonrasında ölçülen absorbans değerleri 25
Şekil 10. Hücrelerin Cis ve farklı doz CAP uygulamaları sonrasında ışık mikroskobundaki görüntüleri 27
Şekil 11. A549 hücrelerinde Cis ve farklı doz CAP uygulaması sonrasında Ki67 immunsitokimya sonuçlarının % değerleri ve ışık mikroskobundaki görüntüleri 29
Şekil 12. A549 hücrelerinde Cis ve farklı doz CAP uygulaması sonrasında Ki-67 western blot analiz sonuçları 30
Şekil 13. A549 hücrelerinde Cis ve farklı doz CAP uygulaması sonrasında Cleaved-Caspase 3 immunsitokimya sonuçlarının % değerleri ve ışık mikroskobundaki görüntüleri 31
Şekil 14. A549 zenogref tümör modelinde morfolojik inceleme..... 33
Şekil 15: A549 zenogref tümör modelinde Ki67 IHC boyaması..... 34
Şekil 16. A549 zenogref tümör modelinde Cleaved Caspase-3 IHC boyaması..... 35

EK 2: Tablo Listesi

Tablo 1. A549 zenogref tümör modelinde deney sonlandırıldığında tümör ölçüm analiz sonuçları..... 32
Tablo 2. A549 zenogref tümör modelinde Ki67 ve Cleaved Caspase-3 HSCORE analizi 35

9. TEŞEKKÜR

Tez konumun planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde değerli zamanlarını ayırarak bana yardımcı olan çok kıymetli danışman hocam Doç. Dr. Sabire GÜLER'e sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Proje No-BUAP(V)-2020/3, "Farklı Kanser Türlerinde Capsaicin'nin Kemoterapotiklerle Kombinasyonun *in vitro* ve *in vivo* Etkileri" adlı proje ile bu tezin gerçekleştirilmesine mali destek veren Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim boyunca verdikleri emekler için Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm öğretim üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanması sırasında bana her türlü yardımlarından dolayı Arş. Gör. Onur ONGUNCAN'a ve Dok. Öğr. Nevruz ALIŞ SÖYLEYİCİ'ye teşekkür ederim.

Ayrıca farklı alanlarda olmalarına rağmen desteklerini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Dr. Aybike SARIOĞLU BOZKURT'a, Arş. Gör. Öner SÖNMEZ'e ve Dok. Öğr. Elif BAYRAM'a teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren sevgili aileme ve öncellikle annem Nermin MUTLU'ya, bana çalışmanın ve bilginin erdemini yeri geldiğinde gaz lambası ışığında benimle birlikte ders çalışarak öğrettiği için minnettarım.

10. ÖZGEÇMİŞ

İlk ve orta okulu Pilot Sanayi İlk Öğretim Okulunda tamamladım. Ardından Bursa Anadolu Sağlık Meslek Lisesinden mezun oldum ve Lisans eğitimimi İstanbul Haliç Üniversite Hemşirelik Yüksek Okulunda tamamladım. Bursa Acıbadem Hastanesinde başladığım mesleğime atandığım kamuda halen devam etmekteyim. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım ve halen devam etmekte olan eğitimimi sunduğum bu tez ile tamamlamayı hedefliyorum.