

# Konvansiyonel Kemoterapötikler ve Isı Şok Protein 90 İnhibitör Kombinasyonunun Mesane Kanseri Hücreleri Üzerine Apoptotik Etkisi

## The Apoptotic Effect of Conventional Chemotherapeutics and Heat Shock Protein 90 Inhibitor on Bladder Cells

Nuray Varol

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

Yazışma Adresi / Correspondence:

**Nuray Varol**

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD. İzmir yolu 8.km 03200 Afyonkarahisar

T: +90 532 635 32 95 E-mail: : varolnur@gmail.com

Geliş Tarihi / Received : 14.01.2019 Kabul Tarihi / Accepted : 01.04.2019

Orcid :

Nuray Varol <https://orcid.org/0000-0002-5002-943X>

### Öz

Amaç	Isı şok protein 90 (IŞP90), ATP-bağımlı moleküler şaperonlardır ve hücrel fonksiyonların gerçekleştirilmesinden sorumlu çok sayıda önemli proteinin konformasyonel katlanması ve stabilizasyonu için gereklidir. Bu çalışmada amacımız, IŞP90 inhibitörü geldanamisin, kemoterapötik ajanlar gemsitabin ve sisplatinin tek başlarına ve/veya kombinasyonlarının kullanımının, insan mesane kanser hücre hattı T24'de apoptotik yolak üzerindeki sinerjik etkilerinin araştırılmasıdır. ( <i>Sakarya Tıp Dergisi</i> 2019, 9(2):230-236 )
Gereç ve Yöntemler	Gemsitabin (0-500 nM) ve sisplatin (0-10 µM), tek başına ve/veya birlikte T24 hücreleri üzerinde anti-tümör etkileri WST-1 testi ile belirlendi. 1 µM geldanamisin ile belirlenen ilaçların tek başlarına ve/veya kombine kullanımının, Bax ve Bcl2 genlerinin protein ekspresyon seviyelerindeki varyasyonları ise western blot yöntemi ile belirlendi.
Bulgular	Proapoptotik gen Bax protein ifadenmesi, geldanamisin, sisplatin ve gemsitabin tek başlarına ve/veya kombinasyonları sonrasında transkripsiyonel düzeyde artarken anti apoptotik gen Bcl2 protein düzeyinde önemli bir değişiklik gözlenmemiştir. Bununla birlikte, üçlü kombinasyon (geldanamisin, sisplatin ve gemsitabin), kontrolle karşılaştırıldığında Bax protein düzeylerinde artışla birlikte Bcl2 protein seviyesinde önemli bir azalmaya neden olmuştur.
Sonuç	Geldanamisin, gemsitabin ve sisplatin üçlü kombinasyonunun kullanımı kemoterapötiklerin apoptotik aktivitesinde bir artışa yol açmıştır. IŞP90 inhibitörlerinin ve kemoterapötiklerin kombine kullanımı, mesane kanserinin tedavisi için umut verici bir tedavi seçeneği olabilir.
Anahtar Kelimeler	IŞP90 inhibitör; Konvansiyonel Kemoterapötikler; Apoptozis

### Abstract

Objective	Heat shock protein 90 (HSP90) is ATP-dependent molecular chaperones and is required for the conformational and stabilization of a number of important proteins responsible for the realization of cellular functions. This study is aimed to investigate, the synergic effects of alone and/or combined use of heat shock protein 90 inhibitor geldanamycin, and chemotherapeutic agents gemcitabine and cisplatin on the apoptotic pathway of human bladder cancer cell line T24. ( <i>Sakarya Tıp Dergisi</i> 2019, 9(2):230-236 ).
Materials and Methods	The anti-tumor effects of gemcitabine (0-500 nM) and cisplatin (0-10 µM), alone and/or combined on T24 cells were determined by WST-1. In the case of unaccompanied and/or combined use of specified drugs with 1 µM geldanamycin, the variations in the expression levels of Bax and Bcl2 genes were determined by western blot.
Results	After the use of unaccompanied and/or combined geldanamycin, cisplatin and gemcitabine combination, while protein expression of the proapoptotic gene Bax was increased at the translational level no significant change in protein level of the anti apoptotic gene Bcl2 was observed. However, triple combination (geldanamycin+cisplatin+gemcitabine) caused an increase in Bax protein levels which in turn significantly decreased Bcl2 protein levels with respect to control.
Conclusion	The use of triple geldanamycin, gemcitabine and cisplatin combination led to an increase in apoptotic activity of chemotherapeutics. Combined use of Hsp90 inhibitors and chemotherapeutics could be a promising therapeutic option for treatment of bladder cancer.
Keywords	HSP90 inhibitor; Conventional Chemotherapeutics; Apoptosis

## GİRİŞ

Mesane kanseri, dünyada en sık görülen dokuzuncu kanser türüdür ve ürolojik maligniteler arasında ise ikinci sırada yer almaktadır.<sup>1,2</sup> Mesane kanserlerinin çoğunluğu (yaklaşık% 90) ürotelyal karsinom (Transizyonel hücreli karsinomu, TCC) oluşturmaktadır, bunu skuamöz hücreli karsinom (% 5) ve adenokarsinom (% 2) izlemektedir ve genellikle cerrahi yöntemle tedavi edilmektedir.<sup>1,3</sup> Bununla birlikte, TCC, yüksek prevalans, çoklu rekürrens, invaziv ve metastatik karakter nedeniyle yüksek sağlık maliyetine neden olmaktadır. Bu nedenle, etkili tedavi stratejilerinin belirlenmesi sadece hastalar için değil, aynı zamanda ekonomik olarak da hayati öneme sahiptir.<sup>1,2</sup>

Kanser tedavi yaklaşımlarında birincil hedef kanser hücrelerini apoptozise yönlendirmektir. Bunun nedeni apoptotik yolaktaki değişiklikler hem neoplastik gelişime katkı sağlarken hem de geleneksel antikanser terapilerine karşı direncin gelişimine önemli katkı sağlamaktadır.<sup>4</sup> Mesane kanser tedavisi için hali hazırda kullanılan kemoterapötikler arasında sisplatin, vinblastin, doksorubisin, metotreksat, ve gemsitabin-sisplatin kombinasyonu yer almaktadır. Sisplatin (cis-diaminedikloroplatinyum, CDDP, Cis) ilk ve yaygın kullanılan platinyum temelli kemoterapötik ilaç olup metastatik ürener mesane kanserinin tedavisi için köşe taşlarından biridir. Sisplatin, DNA'daki pürin bazına bağlanarak iplikçikler arasında inter ve intra çapraz bağların oluşumuna yol açarak DNA hasarına neden olur ve böylece apoptotik yolak aktive olur.<sup>3,5</sup> Bununla birlikte, Sisplatinin etkinliği, kanser hücrelerinin ilaç direnci nedeniyle azalır. Bu ilaç direncine, kanser hücrelerindeki intrasellüler antioksidanlar, ilaç dışı atış (efflux) pompası, DNA onarım ve artmış anti-apoptotik sinyallerdeki değişimler yol açmaktadır. Gemsitabin (2'-deoksi-2',2'-difluorositidin; dFdC, Gem) bir deoksitidin analogudur ve kemoterapötik etkisini DNA sentezini inhibe etmek suretiyle hücreleri apoptoza yönlendirerek gösterir.<sup>3</sup> Gemsitabin'ın trifosforile edilmiş metaboliti olan dFdC trifosfat DNA zincirine eklenir, sonrasında ikinci bir nükleotid eklenir ve böylece gemsitabin maskelenerek DNA eksizyon onarım sistemin-

den kaçır ve DNA sentezini inhibe eder.<sup>6,7</sup> Bununla birlikte, etkin dozu bazı miyelosüpresyon (kemik iliğinin çalışmasının engellenmesi), ateş, enfeksiyon, anemi gibi ağır yan etkileri bulunmaktadır.<sup>7</sup> Özellikle, gemsitabin ve sisplatin kombinasyonu mesane kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan ajanlardandır.<sup>8,9,10</sup> Sisplatin ile gemsitabinin birlikte kullanımının hastaya uygulanan tedavinin etkinliğini artırdığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.<sup>10,11</sup> Son zamanda yapılan in vitro çalışmalarda gemsitabin ve sisplatinin düşük dozda etkinliğinin artırılması için ısı şoku proteini 90 inhibitörleri ile kombine edilerek kullanımının hastalığın tedavisi için yararlı olabileceği vurgulanmaktadır.<sup>3,12</sup>

Isı şoku proteini 90 (İSP90), ATP bağımlı moleküler şaperonlardır. İSP90, hücre çoğalması, farklılaşma, sağ kalım ve çeşitli sinyal yolları gibi önemli hücre fonksiyonlarının yerine getirilmesinden sorumlu çok sayıda proteinin doğru konformasyonel katlanması, hücre lokalizasyonu ve stabilizasyonundan sorumludur. İSP90, hemen hemen yaşayan tüm organizmalarda var olmasına karşın kanser hücrelerinde yüksek düzeyde ekspres edilir ve aktiftirler.<sup>3,13,14</sup> İSP90 hedef proteinleri mesane kanserinin gelişiminde de önemli rol oynamaktadır ve diğer kanser türlerinde olduğu gibi mesane kanser hücrelerinde de yüksek düzeyde ekspres edilir. Bu nedenle İSP90, kanser tedavisindeki özellikle mesane kanserinin tedavisinde potansiyel bir hedeftir.<sup>1</sup> Ayrıca son yıllarda, İSP'nin modern kemoterapötikler ve radyoterapötikler ile birlikte sinerjistik etkilerine odaklanılmıştır.<sup>1,3,15</sup> Dolayısıyla, bu çalışmamızda amacımız, mesane kanser hücre hattında İSP90 inhibitörü geldanamisin (GA) ve mesane kanseri tedavisinde kullanılan klasik kemoterapötikler Sisplatin ve Gemsitabin'in tek başlarına ve/veya kombinasyonlarının apoptotik yolak üzerine sinerjistik etkisini incelemektir.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

### Hücre Kültürü

İnsan transizyonel hücreli karsinoma hücre hattı T24 (grade III), American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edilmiştir. T24 hücreleri, %10 FBS içeren McCoy's 5A

besiyerinde %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda kültüre edildi.

### Hücre Canlılığının Belirlenmesi

T24 hücreleri 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 105 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi, bir gece %1'lik McCoy's 5A besiyerinde inkübe edilerek hücrelerin yapışmasını takiben besiyeri uzaklaştırıldı. T24 hücreleri, sırasıyla Gem (0,1 – 500 nM) ve Cis (0,1- 10 µM) ile ayrı ayrı ve Cis-Gem içeren besiyerinde 48. saat inkübe edildi. İSP90 inhibitörü olarak geldanamisin (GA) (CST; Kat. No: 9843S) için literatürde belirtilen 1 µM etkin dozu kullanıldı.<sup>16</sup> Belirtilen sürenin sonucunda her 100 µl için her bir kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonu (Roche; Kat. No: 001 644 807) eklendi ve formazan ürününün oluşturduğu renk değişimi 4 saat sonunda spektrofotometre ile 450 nM dalga boyunda belirlendi. Negatif kontroller kör olarak kullanıldı. Her bir konsantrasyon için 3 ayrı kültür yapılarak deney tekrarlandı. WST1 sonrasında deney grupları, kontrol (herhangi bir ajan uygulanmayan hücreler), Cis, Gem, Cis-Gem, GA, GA-Cis, GA-Gem ve GA-Cis-Gem olarak seçilmiştir.

### Total protein izolasyonu ve Western Blot yöntemi ile protein düzeylerinin belirlenmesi

Cis, Gem, Cis-Gem ve GA'nın ayrı ayrı ve/veya birlikte kombinasyonları belirlenen sürelerin dolmasını takiben T24 hücrelerinden 1 mM PMSF içeren 1x Ripa Lizis Buffer (CST; USA) ile total protein izole edildi ve BCA (Thermo Fisher, Pierce Biotechnology, USA) ile miktar tayini yapıldı. Yaklaşık olarak 30 µg total protein %12'lik SDS-PAGE 'de elektroforez sonrasında ıslak transfer aracılığıyla PVDF membrana aktarıldı. Membranlar, %5'lik yağsız süt tozu ile bloklama ardından primer antikolar anti- Bax, anti-Bcl2 ve anti-β-aktin (yükleme kontrolü) antikoları (1: 1.000 dilüsyon; CST, USA) ile bir gece 4°C'de hibridizasyona bırakıldı. Primer antikor ile inkübasyon sonrasında anti-fare veya anti-tavşan HRP-konjuge sekonder antikor (1: 1.000 seyreltme, CST USA) ile 1 saat hibridizasyona tabi tutuldu. Protein ekspresyonu, Luminata Forte Western HRP kemilümenans substrat (Merck Millipore, Almanya) kullanılarak, Chemidoc (BioRad) sistemi ile görüntülendi.

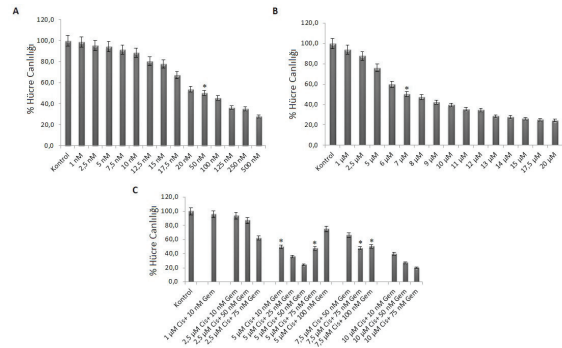
### İstatistiksel analiz

Hücre canlılığı, iki yönlü varyans analizi kullanılarak analiz edilmiştir. Çoklu karşılaştırma analizlerinde SPSS yazılımı, sürüm 21.0 (SPSS, Inc., Chicago IL) kullanılarak yapılmış olup p değeri <0,01'den küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### BULGULAR

#### İlaç Dozlarının Belirlenmesi

CDDP, GEM ve CDDP-GEM'in antiproliferatif etkisi WST-1 testi ile belirlenmiştir. T24 mesane kanser hücreleri farklı dozlarda CDDP ve GEM ayrı ayrı ve/veya birlikte 48 saat inkübe edildi. Cis, Gem ve Cis-Gem için IC50 değerleri sırasıyla 7 µM, 50 nM ve 5 µM+10 nM olarak belirlendi (p<0,01, Şekil 1).



Şekil 1. T24 hücrelerinin kemoterapötikler ile 48 saat inkübasyonu sonrasında hücre canlılığı oranları (A) Gem (0-500 nM) (B) Cis (0-10 µM) (C) Cis-Gem kombinasyonu. \* p < 0,01.

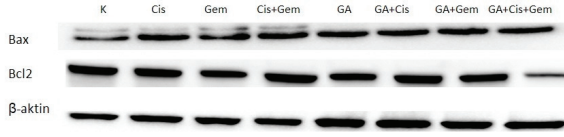
Gem; gemsitabin, Cis; sisplatin.

PI3K/Akt1/mTOR ve Akt1/GSK3β/β-katenin sinyal yolları, ürotelyal mesane kanseri vakalarında tümör progresyonu ve yaşam süresinin azalması ile ilişkilidir. Bu sinyal yollarının inaktivasyonu kanser hücrelerinin apoptoza yönlendirilmesinde son derece önemlidir.<sup>17</sup> Çoban ve ark. çalışmasında İSP90 inhibitörü geldanamisin için 24 saat inkübasyon için IC50 değeri 10 µM olarak belirlemelerine karşın 24 saat inkübasyon sonrasında hem düşük doz geldanamisin (1 µM) hem de 10µM geldanamisin uygulaması sonrasında benzer şekilde pAkt1(S473) ve Akt1 protein

düzeyinde azalma belirlenmiştir.<sup>16</sup> Bu nedenle, bizde çalışmamızda sitotoksitesi daha düşük olan 1µM GA dozunu kullandık.

### Apoptozun Değerlendirilmesi

Kemoterapötiklerin tek başlarına ve/veya GA ile birlikte neden olduğu antiproliferatif etkinin apoptotik yolağın aktivasyonu aracılığıyla mı gerçekleştiğini belirlemek için Bax ve Bcl2 protein ekspresyon düzeyleri incelendi. Kemoterapötiklerin (7 µM Cis, 50 nM Gem ve 5 µM+10 nM Cis-Gem) tek başlarına ve/veya geldanamisin (1 µ) ile birlikte kombinasyonlarının 48 saat süre ile inkübasyonları sonrasında Bax protein düzeyinde ilaç uygulanmayan (kontrol) hücrelere nazaran bir artış belirlenmiştir (Şekil2). Cis+Gem+GA'nın birlikte kombinasyonu hariç kontrol ve diğer uygulamalarda Bcl2 protein düzeyinde değişme görülmezken Cis+Gem+GA uygulaması sonrasında Bcl2 düzeyinde önemli bir azalma belirlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. T24 hücrelerinde kemoterapötik ajanların ve İSP90 inhibitörü geldanamisin ile birlikte 48 saat inkübasyonu sonrasında apoptozun değerlendirilmesi. Her bir ajanın kanser hücrelerinde kullanılan konsantrasyonu: 7µM Cis, 50nM Gem ve 5µM-10nM Cis-Gem, 1 µM GA, 5µM-10nM-1 µM Cis-Gem-GA, sırasıyla.

Cis; Sisplatin, GA; Gelsanamisin, Gem; Gemsitabin.

### TARTIŞMA

Mesane kanserine yönelik kemoterapinin etkinliği, ilaç direncinin gelişmesi nedeniyle sıklıkla azalmaktadır. Bu kemoterapötikler başlangıçta yüksek yanıt oranlarına sahiptir, ancak bu kemoterapötiklerin, direnç gelişmesiyle birlikte etkisi azalır ve hastaların çoğunluğunda hastalık nükseder. Hastalığın nüksetmesinden kısa bir süre sonra hastaların yaşam kalitesi ve süresi azalır. Bu nedenle mesane kanseri hastalarında sağkalım sonuçlarını ve yaşam

kalitesini iyileştirmek için yüksek verimliliğe sahip yeni ajanlar geliştirmesine ihtiyaç duyulmaktadır.<sup>3</sup> İSP90, akciğer, meme, mesane kanseri dahil olmak üzere kanser hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilir.<sup>1</sup> Bazı sinyal yollarının bozulması ilaç direncine önemli bir katkıda bulunur, örneğin, birçok kanserde geleneksel terapilere dirençte PI3K/AKT/mTOR sinyalinin artması söz konusudur. Bu sinyal moleküllerinin çoğu İSP90 hedef proteinleridir.<sup>18</sup> Mesane kanseri başta olmak üzere birçok kanserde İSP90 protein düzeyi yüksek düzeyde eksprese edilir ve bu nedenle kanser tedavisinde potansiyel hedeflerdir.<sup>11-15</sup> Mesane kanserinin tedavisinde, metatoraksat, vinblastin, doksorubisin, sisplatin veya sisplatin-gemsitabin kombinasyonu gibi platin temelli kemoterapötikler kullanılmaktadır. Bu kemoterapötiklere yanıt oranı %50 ila 70 iken sağ kalım oranı oldukça düşüktür (%15-20). Hastaların bir kısmı başlangıç aşamasında tedaviye yanıt vermezken, yanıt veren hastaların büyük bir kısmında ise ilk bir yıl içerisinde hastalık nüksetmektedir.<sup>19</sup> Gem ve Cis tek başlarına etkin dozları bütün organizmalar için toksik olmasına karşın Gem ve Cis kombinasyonu mesane kanser tedavisi için kullanılan standart kemoterapötiklerdir. Yapılan çalışmalarda Gem ve Cis'nin birlikte kullanımlarının tek başlarına kullanımlarına nazaran daha düşük dozlarda hücre proliferasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir.<sup>5,20</sup> Biz de bu çalışmamızda literatürle uyumlu olarak, Cis ve Gem tek başlarına kullanımlarına nazaran birlikte kullanımlarının düşük dozlarda hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini belirledik.

Cis ve Gem ile ayrı ayrı ve/veya birlikte kombinasyonlarının T24 hücrelerinde apoptotik etkisini değerlendirmek için Bax/Bcl2 oranını inceledik. Cis ve Gem'in tek başlarına ve/veya birlikte kombinasyonu sonrasında kontrole nazaran anti-apoptotik Bcl2 protein düzeyinde ise herhangi bir değişiklik olmamasına karşın pro-apoptotik Bax protein düzeyinde artma gözlemlenmemiştir. Bu durum göstermektedir ki, Cis, Gem ve Cis+Gem, mesane kanser hücrelerinde apoptozu indüklemektedir. Benzer şekilde, Varol ve ark. çalışmasında benzer dozlarda Cis ve Gem uygula-

ması sonrasında Bax mRNA düzeyinde artış gözlemlerken Bcl2 mRNA düzeyinde önemli bir değişiklik gözlemlenmişlerdir. Bu karşın bir diğer anti-apoptotik gen olan Bcl-xL mRNA düzeyinde azalma olduğunu belirlemişlerdir.<sup>20</sup> Mesane kanser gelişiminde önemli sinyal moleküllerinden biri Akt1'dir ve IŞP90 hedef proteinlerindedir. Akt1 proteini apoptotik yolak üzerinde önemli etkisi bulunmaktadır. Akt hedef proteinleri arasında pro-apoptotik BAD ve Kaspaz 9 genleri yer almaktadır. Akt aracılı BAD fosforilasyonunun sonunda BCL-2 veya BCL2L1 ile kompleks oluşturamaz ve Bax/Bak aracılı apoptozis inhibe olur.<sup>21</sup> Akt'nin diğer bir anti-apoptotik fonksiyonu ise Kaspaz 9 aktivasyonunu bloke etmesidir. Bu nedenle çalışmamızda, literatüre uygun olarak T24 hücrelerinde, Akt1 ve aktif Akt1 işareti olan pAkt1(Ser473)'ün protein düzeyinde azalmaya neden olan 1 µM GA, IŞP90 inhibitör dozu olarak kullanıldı. GA ve/veya GA türevlerinin kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanımlarının apoptotik yolak üzerine sinerjistik etkisini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda kemoterapötikler ile birlikte IŞP90 inhibitörlerinin kullanımlarının kanser hücrelerinde kemoterapötiklerin apoptotik etkinliğini arttırdığı belirtilmiştir.<sup>12,22,23</sup> Çalışmamıza benzer şekilde, Ma ve ark.'larının çalışmasında T24 hücrelerinde GA türevi 17AAG'nin Cis ve Gem ile birlikte kullanımlarının bu kemoterapötiklerin apoptotik etkinliğini arttırdığı gösterilmişler ve konvansiyonel antikanser ilaçların ile IŞP90 inhibitörlerinin birlikte kombinasyonunun ileri evre mesane kanserli hastalar için terapötik bir seçenek olabileceği vurgulanmıştır.<sup>3</sup> Benzer olarak, T24 hücrelerinde GA tek başına ve Cis ve Gem ile birlikte kullanımları sonrasında hücrelerin apoptoz yönlendirildiğini gözlemledik. Bununla birlikte, Cis ve Gem'in tek başlarına ve/veya kombinasyonlarının ile GA ile birlikte kombinasyonları ile karşılaştırıldığında hem Bax hem de Bcl2 düzeyinde önemli bir değişiklik gözlemlenmedi. Buna karşın GA+Cis+Gem üçlü kombinasyonu sonrasında kontrole nazaran hem Bax düzeyinde artma hem de Bcl2 düzeyinde azalma olduğu belirledik.

Sonuç olarak, bu çalışmamızda, IŞP90 inhibitörü GA'nın

mesane kanserinde sisplatin, gemsitabin veya sisplatin-gemsitabin kombinasyonlarının sinerjistik anti kanser etkisini gösterdik. Bizim sonuçlarımız göstermiştir ki, ileri evre metastatik mesane kanserlerinin tedavisi için IŞP90 inhibitörlerinin konvansiyonel kemoterapötiklerle birlikte kullanımı mesane kanseri tedavisi için yeni ve potansiyel bir yaklaşım olarak kullanılabilir. Çalışmamız preklinik bir çalışmadır. Apoptozis üzerine IŞP90 inhibitörlerin kemoterapötiklerle kullanım etkinliğinin tam olarak ortaya konması için ileri moleküler analizlerin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

#### Kaynaklar

1. Chehab M, Caza T, Skotnicki K, Landas S, Bratslavsky G, Mollapour M, et al. Targeting Hsp90 in urothelial carcinoma. *Oncotarget* 2015;6:8454-73.
2. Wong MCS, Fung FDH, Leung C, Cheung WWL, Goggins WB, Ng CF. The global epidemiology of bladder cancer: a joinpoint regression analysis of its incidence and mortality trends and projection. *Sci Rep* 2018;8(1):112.
3. Ma L, Sato F, Sato R, Matsubara T, Hirai K, Yamasaki M, et al. Dual targeting of heat shock proteins 90 and 70 promotes cell death and enhances the anticancer effect of chemotherapeutic agents in bladder cancer. *Oncol Rep* 2014;31(6):2482-92.
4. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res* 2009;15:1126-32.
5. da Silva GN, de Castro Marcondes JP, de Camargo EA, da Silva Passos Júnior GA, Sakamoto-Hojo ET, Salvadori DM. Cell cycle arrest and apoptosis in TP53 subtypes of bladder carcinoma cell lines treated with cisplatin and gemcitabine. *Exp Biol Med* 2010;5:814-24.
6. Gahr S, Ocker M, Ganslmayer M, Zopf S, Okamoto K, Hartl A, et al. The combination of the histone-deacetylase inhibitor trichostatin A and gemcitabine induces inhibition of proliferation and increased apoptosis in pancreatic carcinoma cells. *International Journal Of Oncology* 2007;31:567-576.
7. Tharakan ST, Inamoto T, Sung B, Aggarwal BB, Kamat AM. Curcumin potentiates the anti-tumor effects of gemcitabine in an orthotopic model of human bladder cancer through suppression of proliferative and angiogenic biomarkers. *Biochem Pharmacol* 2010;79:218-28.
8. Chen MK, Qin ZK, Zhou FJ, Han H, Liu ZW, Li YH, et al. Intra-arterial chemotherapy is reliable in preventing high-risk superficial bladder cancer from recurrence and progression. *J Chemother* 2009;21:681-6.
9. Vaishampayan U. Systemic therapy of advanced urothelial cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2009;10:256-66.
10. Yafi FA, Kassouf W. Is neoadjuvant chemotherapy with gemcitabine plus cisplatin beneficial in patients with muscle-invasive bladder cancer? *Expert Rev Anticancer Ther* 2009;9:747-52.
11. Gazzaniga P, Silvestri I, Gradilone A, Scarpa S, Morrone S, Gandini O, et al. Gemcitabine-induced apoptosis in 5637 cell line: an in-vitro model for high-risk superficial bladder cancer. *Anticancer Drugs* 2007;18:179-85.
12. Breinig M, Caldas-Lopes E, Goepfert B, Malz M, Rieker R, Bergmann F, et al. Targeting heat shock protein 90 with non-quinone inhibitors: a novel chemotherapeutic approach in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009;50(1):102-12
13. Li J, Soroka J, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery: Conformational Dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012;1823:624-35.
14. Tatokoro M, Koga F, Yoshida S, Kihara K. Heat shock protein 90 targeting therapy: state of the art and future perspective. *EXCLI J* 2015;14:48-58.
15. Ischia J, So AI. The role of heat shock proteins in bladder cancer. *Nature Reviews Urology* 2013; 10(7):386-95.
16. Çoban N. Mesane Kanseri Hücrelerinde Hsp90 İnhibitörlerinin Histon Metilasyonu Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Afyonkarahisar: Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, 2018.
17. Sun CH, Chang YH, Pan CC. Activation of the PI3K/Akt/mTOR pathway correlates with tumour progression and reduced survival in patients with urothelial carcinoma of the urinary bladder. *Histopathology*. 2011;58(7):1054-63.
18. Safa AR. Resistance to Cell Death and Its Modulation in Cancer Stem Cells. *Crit Rev Oncog* 2016;21(3-4):203-19.
19. Jeon HG, Yoon CY, Yu JH, Park MJ, Lee JE, Jeong SJ, et al. Induction of Caspase Mediated Apoptosis and Down-Regulation of Nuclear Factor-κB and Akt Signaling are Involved in the Synergistic Antitumor Effect of Gemcitabine and the Histone Deacetylase Inhibitor Trichostatin A in Human Bladder Cancer Cells. *J Urol* 2011;186: 2084-93.
20. Varol N, Konac E, Onen IH, Gurocak S, Alp E, Yilmaz A, et al. The Epigenetically Regulated Effects of Wnt Antagonists on the Expression of Genes in the Apoptosis Pathway in Human Bladder Cell Line (T24). *DNA and Cell Biology* 2014;33:408-17.
21. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* 1999;13:2905-27.
22. Lee SY, Liu S, Mitchell RM, Slagle-Webb B, Hong YS, Sheehan JM, et al. HFE polymorphisms influence the response to chemotherapeutic agents via induction of p16INK4A. *Int J Cancer* 2011;129(9):2104-14.
23. Mohammadian M, Zeynali S, Azarbaijani AF, Khadem Ansari MH, Kheradmand F. Cytotoxic effects of the newly-developed chemotherapeutic agents 17-AAG in combination with oxaliplatin and capecitabine in colorectal cancer cell lines. *Res Pharm Sci* 2017;12(6):517-525.