KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE ANASTAZİSİN MOLEKÜLER VE GENETİK MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Halime AKGÜN

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE ANASTAZİSİN MOLEKÜLER VE GENETİK MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Halime AKGÜN
0000-0002-2048-3252

Prof. Dr. Ferda ARI
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2022
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KÜÇÜK HÜCRELİ DIŞI AKCİĞER KANSERİNDE ANASTAZİSİN MOLEKÜLER VE GENETİK MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Halime AKGÜN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ferda ARI

Ölmekte olan bir hücre, genel olarak kabul edilen 'geri dönüşü olmayan noktalara' ulaştıktan sonra hücre ölümünün eşiğinden kurtulabilir mi? Bu soru, anastazis mekanizmasının ilk adımını oluşturmakla beraber bu tezin ortaya çıkmasına da neden olmuştur. Apoptozisin tersine çevrilmesi olarak literatüre geçen anastaziste süreç, indükleyici ajanın ortamdan çıkarılmasıyla başlar. Yeni keşfedilen bir süreç olduğu için anastazisin amacı ve nasıl çalıştığı konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu tez çalışması, A549 hücrelerinin Paklitaksel'in neden olduğu apoptozisten kurtulabileceğini ortaya koymaktadır. İlk aşamada A549 hücrelerini anastatik hücrelere dönüştürmek için öncelikle, SRB hücre canlılık analiziyle Paklitaksel uygulaması sonrasında büyüme eğrileri oluşturularak Paklitaksel'in maksimum toksik konsantrasyonu belirlenmiştir. Ayrıca daha hassas bir yöntem olan ATP hücre canlılık analiziyle de sonuçlar doğrulanmıştır. İkinci aşamada ise Paklitaksel'in maksimum toksik konsantrasyonu kullanılarak hangi zaman aralığında anastatik hücre dönüşümünün gerçekleştiği belirlenmiştir. Apoptozisin erken ve geç aşamaları üçlü floresan boyama (Hoechst 33342, Propidyum iyodür ve Anneksin-V) yöntemiyle, Kaspaz 3/7 enzim aktivitesi de luminometrik kaspaz ölçüm kitiyle belirlenmiştir. Ek olarak, belirlenen zaman ve konsantrasyonlarda Kaspaz 3/7+ ve Propidyum iyodür- ile Kaspaz 3/7+ ve Propidyum iyodür+ hücre popülasyonlarının varlığı akış sitometrisi kullanılarak doğrulanmıştır. Bu sayede Paklitaksel'in hangi zaman ve konsantrasyonlarda hücre popülasyonun çoğunluğunda (> %80) apoptotik hücre ölümünü indüklediği tespit edilmiştir. Son aşamada ise Paklitaksel, belirtilen zaman ve konsantrasyonlarda A549 hücrelerine uygulandıktan sonra ortamdan uzaklaştırılarak anastatik hücre dönüşümü protein düzeyinde western blot, gen düzeyinde ise RT-PCR yöntemi ile araştırılmıştır.
Bu tez çalışması sonucunda A549 hücrelerinin Paklitaksel kaynaklı apoptotik hücre ölümünü tersine çevirdiği gösterilmiştir. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri hücrelerinin (A549), Paklitaksel'e bağlı apoptotik hücre ölümünü tersine çevirerek geri geldiği ve geri gelen bu (anastatik) hücrelerin mekanizmasının protein ve gen seviyesinde varlığı in vitro olarak gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anastazis; Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, hücre ölümü, apoptozis
2022, ix + 61 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF MOLECULAR AND GENETIC MECHANISMS OF ANASTASIS IN NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Halime AKGUN

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Ferda ARI

Can a dying cell escape the brink of cell death after reaching the generally accepted 'points of no return'? This question constitutes the first step of the mechanism of anastasis, but also led to the emergence of this thesis. Anastasis, which has been described in the literature as a reversal of apoptosis, begins with the removal of the inducing agent from the environment. More work is needed on the purpose of anastasis and how it works, as it is a newly discovered process. This thesis study reveals that A549 cells can recover from Paclitaxel-induced apoptosis. In the first stage, in order to convert A549 cells into anastatic cells, the maximum toxic concentration of Paclitaxel was determined by creating growth curves after the application of Paclitaxel with SRB cell viability analysis. In addition, the results were confirmed by ATP cell viability analysis, which is a more sensitive method. In the second step, it was determined at what time interval anastatic cell transformation occurred by using the maximum toxic concentration of Paclitaxel. Early and late stages of apoptosis were determined by triple fluorescent staining (Hoechst 33342, Propidium iodide and Annexin-V) and Caspase 3/7 enzyme activity was determined with a luminometric caspase measurement kit. In addition, the presence of Caspase 3/7+ and Propidium iodide- and Caspase 3/7+, Propidium iodide+ cell populations at the specified times and concentrations was confirmed using flow cytometry. In this way, it has been established at what time and concentrations paclitaxel induces apoptotic cell death in the majority of the cell population (>80%). In the final stage, after applying the paclitaxel to A549 cells at the specified times and concentrations, it was removed from the environment and anastatic cell transformation was investigated by western blot at the protein level and RT-PCR method at gene level.
As a result of this thesis study, it was shown that A549 cells reverse Paclitaxel-induced apoptotic cell death. It has been shown in vitro that Non-Small Cell Lung Cancer cells (A549) come back by reversing Paclitaxel-induced apoptotic cell death, and the presence of the mechanism of these returning cells (anastatic) at the protein and gene levels.

Key words: Non-small cell lung cancer, cell death, apoptosis, anastasis
2022, ix + 61 pages.

TEŞEKKÜR

Her şeyden önce, çalışmalarımda danışmanlığımı yapan, yüksek lisans sürecim boyunca bana rehberlik eden, bilimsel bir araştırmacı olarak büyümeme ve öğrenmeme izin veren mentorluk ve deneyimi sağladığı için değerli danışman hocam Prof. Dr. Ferda Arı'ya,

Çalışmalarımda tecrübeleriyle bana yön gösteren, laboratuvar şartlarında gerekli düzenin sağlanmasında emeği geçen Bursa Uludağ Moleküler Kanser Araştırma Laboratuvar (BUMKAL) üyelerine,

İstisnasız her deney sonucumda benimle aynı heyecanı ve ilgiyi gösterip, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan; buraya yazmakla asla sığdıramayacağım emekler harcayan, gücüne ve başarılarına hayran olduğum ayrıca, yapamayacağımı düşündüğümde bana inanarak, yetersiz kaldığımı hissettiğimde beni geliştirerek her zaman her koşulda desteğini esirgemeyen hem hayat arkadaşım hem laboratuvar arkadaşım olan sevgili eşim Oğuzhan AKGÜN'e,

Ömrümün her aşamasında maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyip hiçbir fedakârlıktan kaçınmayarak her zaman yanımda olup her türlü sıkışıklık ve yorgunluğuma koşan, bugüne gelmemde en büyük emeğin/sabrın sahibi annem Rabia ÖZÇELEBİ'ye ve babam Servet ÖZÇELEBİ'ye, ablam Zeynep ÖZÇELEBİ KAPACAK'a ve gece yarılarında benimle laboratuvara gelerek deney yaptığımda beni bekleyen ruhu güzel kardeşim Ömer ÖZÇELEBİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezi, aileme, biricik yeğenim Eymen Aras'a, sevgili eşime ve canım oğlum Aybars'a ithaf ediyorum.

Halime AKGÜN
…/12/2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
ÇİZELGELER DİZİNİ ix
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI 4
2.1. Akciğer Kanseri 4
2.1.1. Akciğer Kanseri Alt Tipleri 4
2.1.1.1. Akciğer Kanserinin Histolojiye Göre Sınıflandırılması 4
2.1.1.2. Akciğer Kanserinin Biyobelirteçlere Göre Sınıflandırılması 7
2.1.1.2.1. Akciğer Kanserinde Genomik Biyobelirteçler 7
2.1.1.2.2. Akciğer Kanserinde İmmünoterapi Belirteçleri 10
2.2. KHDAK'da Güncel Kemoterapötik Yaklaşımlar 11
2.3. Hücre Ölümü ve Apoptozis 13
2.3.1. Apoptozisin Evreleri ve Zaman Süreci 15
2.3.2. Apoptozisin Biyokimyasal Özellikleri 16
2.3.2.1. İnternükleozomal DNA Parçalanması 16
2.3.2.2. Kaspaz Aktivasyonu 18
2.3.3. Apoptotik Hücre Ölümünün İnhibisyonu 19
2.4. Anastazis 22
2.4.1. Anastazisin Kanıtları ve Potansiyel Mekanizmaları 24
2.4.2. Anastazisin Kanser Üzerindeki Potansiyel Etkileri 28
3. MATERYAL ve YÖNTEM 29
3.1. Materyal 29
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 29
3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler 29
3.1.3. Kullanılan Cihazlar 30
3.1.4. Kullanılan Kitler 31
3.2. Yöntem 32
3.2.1. Hücre Kültürü 32
3.2.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Soyu 32
3.2.1.2. Kullanılan İlaçların Hazırlanması 32
3.2.1.3. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması 32
3.2.1.4. Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması 32
3.2.1.5. Hücre Soylarının Pasajlanması 33
3.2.1.6. Hücre Soylarının Stoklanması 33
3.2.1.7. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı 33
3.2.2. Büyüme Oranı Analiziyle PTX Konsantrasyonunun Belirlenmesi 33
3.2.2.1. SRB (Sulforhadamine B) Canlılık Metodu 35
3.2.2.2. ATP (Adenozin Trifosfat) Canlılık Metodu 36
3.2.3. Anastatik Hücrelerin Elde Edilmesi ve Doğrulanması 37
3.2.3.1. PTX Sonrası Kaspaz 3/7 Enzim Aktivasyonun Zamana Bağlı Belirlenmesi 37

3.2.3.2. Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Akış Sitometri Yöntemiyle Ölçülmesi 38
3.2.3.3. Piknotik Nükleusların Floresan Boyama Yöntemiyle Görüntülenmesi 39
3.2.3.4. Fosfatidilserinlerin Floresan Boyama Yöntemiyle Görüntülenmesi ve Kantitatif Olarak Ölçümü 40
3.2.4. Anastatik Hücre Dönüşümünün Doğrulanması 41
3.2.4.1. Anastatik Hücrelerdeki Aktif-Kaspaz 3/7 Seviyelerinin İncelenmesi 41
3.2.4.2. Anastatik Hücrelerdeki Anneksin-V Seviyelerinin İncelenmesi 42
3.2.5. Anastazis Mekanizmasının Moleküler Süreçlerinin Protein ve Gen Seviyesinde İncelenmesi 42
3.2.5.1. Western Blot Analizleri 42
3.2.5.2. RT-PCR Analizleri 44
3.2.6. İstatistiksel Analiz 46
4. BULGULAR 47
4.1. Büyüme Oranı Analizi Sonuçları 47
4.2. PTX Sonrası Kaspaz 3/7 Enzim Aktivasyonunun Zamana Bağlı Belirlenmesi 48
4.3. Apoptoziste Geri Dönülemez Noktanın Belirlenmesi 49
4.3.1. Akış Sitometri Analizleriyle Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Değerlendirilmesi 49
4.4. Apoptotik Uyarımın Floresan Boyama Yöntemiyle Görüntülenmesi 50
4.5. Fosfatidilserinlerin Floresan Boyama Yöntemiyle Görüntülenmesi ve Kantitatif Olarak Ölçümü Sonuçları 50
4.6. Anastatik Hücre Dönüşümünün Doğrulanması 52
4.6.1. Anastatik Hücrelerdeki Aktif-Kaspaz 3/7 Seviyeleri 52
4.6.2. Anastatik Hücrelerdeki Anneksin-V Seviyeleri 53
4.6.3. Anastatik Hücrelerdeki Moleküler Süreçlerin Protein Seviyesinde İncelenmesi 55
4.6.4. Anastatik Hücrelerdeki Moleküler Süreçlerin Gen Seviyesinde İncelenmesi 56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 57
KAYNAKLAR 62
ÖZGEÇMİŞ 73

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
mM	Milimolar
mL	Mililitre
nM	Nanomolar
µM	Mikromolar
µl	Mikrolitre
µg	Mikrogram
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
w/v	Ağırlık/Hacim

Kısaltmalar	Açıklama
ALK	Anaplastik Lenfoma Kinaz
ATP	Adenozin Trifosfat
DISC	Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Nükleozit Trifosfat (Deoxynucleoside Triphosphate)
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
EMT	Epitelyal Mezenkimal Tranzisyon
FADD	Fas İlişkili Ölüm Alanı (Fas Associated Death Domain)
FBS	Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum)
FITC	Fluoresin İzotiyosiyanat
GAPDH	Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)
GI	Büyüme İnhibisyonu (Growth Inhibition)
HER2	İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
IC_{50}	Yarı Maksimum İnhibitör Konsantrasyon (Half Maximal Inhibitory Concentration)
ICAD	Kaspazla Aktive Edilmiş
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
kDa	KiloDalton
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KRAS	Kirsten Sıçan Sarkomu Viral Onkogen Homoloğu
LC	Ölümcül Konsantrasyon (Lethal Concentration)
MAPK	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz

MOMP	Mitokondri Dış Membran Permeabilizasyonu
MTT	Metil Tiyazoldifenil Tetrazolyum
PARP	Poli(ADP-Riboz)Polimeraz (Poly ADP-Ribose Polymerase)
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PS	Fosfatidilserin
PD-1	Programlanmış Hücre Ölümü 1
PD-L1	Programlanmış Ölüm-Ligandı 1
PD-L2	Programlanmış Ölüm-Ligandı 2
PIK3	Fosfatidil İnositol 3-Kinaz
PIK3CA	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-Kinaz Katalitik alt birim alfa
PTX	Paklitaksel
RLU	Rölatif Işık Ünitesi
ROS1	ROS proto-onkogen 1, reseptör tirozin kinaz
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TGI	Toplam Büyüme İnhibisyonu (Total Growth Inhibition)
TRADD	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü 1-İlişkili Ölüm Alanı
XIAP	X'e Bağlı Apoptoz Protein İnhibitörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 1.	Akciğer kanserinin varlığını gösteren şema…….	4
Şekil 2.	Histolojiye göre akciğer kanseri türleri……	5
Şekil 3.	KHDAK alt tiplerine ait mikroskobik görüntüler……	6
Şekil 4.	Akciğer adenokarsinomu ve skuamöz hücreli karsinomun moleküler alt tipleri……...	7
Şekil 5.	Paklitaksel'in etki mekanizması……...	12
Şekil 6.	Apoptozisin morfolojik özellikleri……...	14
Şekil 7.	Apoptozis mekanizmasına ait yolaklar…….	15
Şekil 8.	Apoptozisin aşamaları……...	16
Şekil 9.	Agaroz jel elektroforezi ile apoptotik DNA fragmanlarının görüntüsü……...	17
Şekil 10.	Apoptoz ile indüklenen DNA fragmantasyonu…….	17
Şekil 11.	Memeli kaspazlarının domain yapısı ve fonksiyonel sınıflandırması…….…….	19
Şekil 12.	Apoptozisin inhibisyonunu gösteren sinyal yolakları……...	21
Şekil 13.	Hücre iyileşmesi sırasında önerilen anastazis mekanizması….	27
Şekil 14.	Doz yanıt eğrilerinin matematiksel olarak belirlenmesi……....	34
Şekil 15.	Büyüme oranı analizi…….……...	47
Şekil 16.	PTX sonrası kaspaz 3/7 enzim aktivasyonun zamana bağlı değişimi…….……...	48
Şekil 17.	Apoptotik hücre popülasyonunun akış sitometri yöntemiyle belirlenmesi…….…….	49
Şekil 18.	Piknotik nükleusların floresan boyama yöntemiyle görüntülenmesi…….…….	50
Şekil 19.	Fosfatidilserinlerin floresan boyama yöntemiyle görüntülenmesi…….…….	51
Şekil 20.	Floresan boyama sonuçlarının kantitatif olarak ölçülmesi…..	52
Şekil 21.	PTX sonrası anastatik hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivite ve hücre canlılık analizi…….……	53
Şekil 22.	Anastatik hücrelerdeki Anneksin-V seviyelerinin incelenmesi.……. …….……...	54
Şekil 23.	Anastazis mekanizmasının protein seviyesinde incelenmesi…	55
Şekil 24.	Anastazis mekanizmasının gen seviyesinde incelenmesi…….	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

		Sayfa
Çizelge 1.	KHDAK tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçları……..	11
Çizelge 2.	Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin listesi……..	29
Çizelge 3.	Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi……...	29
Çizelge 4.	Çalışmada kullanılan cihazların listesi……	30
Çizelge 5.	Çalışmada kullanılan kitlerin listesi……	31
Çizelge 6.	Erken, geç apoptozis ve nekrotik hücrelerin gösterimi……...	40
Çizelge 7.	cDNA çevrimi aşamaları…….	45
Çizelge 8.	RT-PCR çevrimi aşamaları…….	45

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri global bir sağlık sorunu olma yolunda hızla ilerlemektedir. Akciğer kanserinde bildirilen vakaların yaklaşık %80'inini küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) oluştururken bu gurupta en sık rastlanılan patolojik tip ise adenokarsinomalardır. KHDAK adenokarsinomalarının agresif bir fenotipe sahip olması, tedaviden sonra nüks ve metastazların ortaya çıkması ve vakaların çoğunda tanı anında ilerlemiş hastalığın gelişmesi nedeniyle 5 yıllık sağkalım %20'den az olmaktadır (Pikor ve ark., 2013; Siegel ve ark., 2022).

Akciğer kanseri hastalarında önemli sağkalım artışları ancak platin ve taksanlar, vinoralbin ve gemsitabin dahil olmak üzere yeni nesil kemoterapötik ajanların geliştirilmesi ve piyasaya sürülmesinden sonra gösterildi. Günümüzde ilk aşama ("first line") tedavi olarak standart kabul edilen kemoterapi uygulamasının KHDAK hastalarındaki sağkalım başarılarına rağmen konvansiyonel kemoterapinin kritik birkaç sınırlaması bulunmaktadır. Kemoterapi spesifik olmayan hedeflemeden kaynaklanan yüksek yan etki ve hedef dışı toksisite profili nedeniyle sınırlı döngü ve zaman aralıklarında uygulanabilmektedir. Bu aşamada ise sağkalımı etkileyen en büyük etmenlerin başında uygulanan "tedavinin başarısızlığı" devreye girmektedir. Çünkü toksisiteyi en aza indirmek amacıyla optimal bir rejim seçilmesiyle uygulama kürleri arasında geçen sürede ajanların plazma konsantrasyonlardaki azalma ile kanser hücrelerine rejenerasyonları için zaman tanınabilmektedir. Bu aşamada akla gelen ilk soru hücre ölümünün indüklendiği bir kanser hücresinde, etkisn ajanın ortamdan kaldırılması sonucu hücreler ölüm sürecine devam edebilirler mi? Bu soru en çok çalışılan ve mekanizması aydınlatılan programlanmış hücre ölümü olan apoptozis için test edilmiştir. Apoptoziste geri dönülmez nokta ("the point of no return") olarak tanımlanan effektör kaspaz-3/7 aktivasyonu ve mitokondri membran potansiyelinin (MOMP) bozulmasından sonra apoptotik indükleyicinin ortamdan kaldırılması sonucu hücrelerin nasıl bir süreci takip edeceği incelenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda da ''anastazis'' olarak tanımlanan süreç açığa çıkarılmıştır (Sun ve ark., 2017; Sun ve Montell, 2017; Tang ve Tang, 2018; Tang ve ark., 2022; Tang ve ark., 2017; Tang ve ark., 2015; Tang ve ark., 2012). Yapılan *in vitro* analizlerde apoptozu indükleyen ajanın ortamdan uzaklaştırılması sonucu hücreleri apoptozisin geri dönülemez noktasından kurtaran doğal

bir hücre kurtarma yolu olduğu kanıtlanmıştır. Özünde apoptozisin tersine çevrilmesi olarak literatüre geçen anastaziste süreci başlatan temel olay ise apoptotik indükleyicinin ortamdan çıkarılmasıdır. Bu, apoptotik hücrelerin post-anastatik hücrelere dönüşmesini sağlayan ilk ve tek adımdır. Yapılan *in vitro* (Inceboz ve ark., 2021; Seervi ve ark., 2019; Sun ve ark., 2017; Tang ve ark., 2022; Tang ve ark., 2017; Tang ve ark., 2015; Tang ve ark., 2012; Tang ve ark., 2009) ve *in vivo* (Tang ve ark., 2018) çalışmalar ile süreç başarılı bir şekilde ortaya konmuştur. Tüm bu çalışmalar sonucunda da anastazisin içsel bir iyileşme olayı olduğu kanısına varılmıştır (Tang ve Tang, 2018).

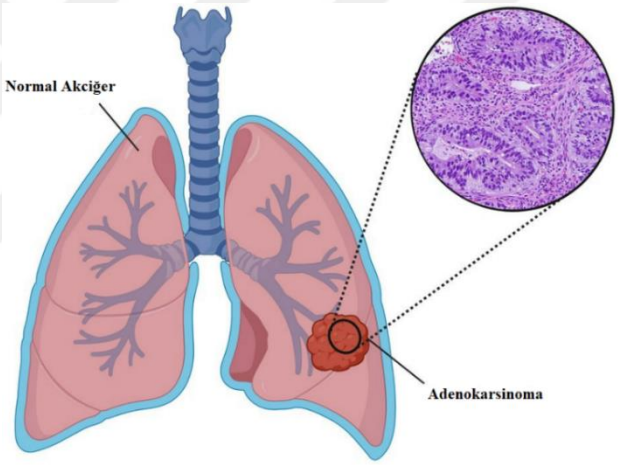
Hücrelerin subletal ("bir süreliğine" öldürücü dozun altında olan) konsantrasyonlarda ajanlara maruz kalması sonucu etkin ajanın ortamdan uzaklaştırılmasıyla apoptotik hücre ölümü başarısızlığı ("apoptosis failure") yoluyla hücrelerin yaşama döndükleri bilinirdi (Berthenet ve ark., 2020). Sınırlı kaspaz-3/7 aktivasyonu veya sınırlı MOMP'daki değişimler hücrelerin genomik kararsızlık, mutasyon yükü ve yüksek DNA hasarıyla geri dönmesine neden olmaktadır (Ichim ve ark., 2015). Fakat anastaziste hücrelerin letal dozdaki ajanların uygulanmasından yaşama döndükleri ve sürece dair yapılan ileri analizlerde belli genetik imzaların bulunduğu hatta geri dönen hücrelerdeki sınırlı DNA hasarının yüksek oranda tamir edildiği bu nedenle apoptotik hücre ölümü başarısızlığından oldukça farklı bir mekanizma olduğu görülmüştür. Üstelik geri dönen hücrelerin ilaç direnci, metastatik aktivite, epitelyal mezenkimal tranzisyon (EMT) uyarımı gibi onkojenik özellikler sergilediği bildirilmiştir (Tang ve ark., 2017; Tang ve ark., 2012). Mekanizma sadece kanser hücrelerinde değil kanser olmayan sağlıklı hücrelerde de gösterilmiştir. Fakat en büyük zorluk anastazisin *in vivo* koşullarda test edilmesidir. Tang ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmalarda apoptozisten yaşama dönen hücreleri takip etmek amacıyla kaspaz biyosensörü geliştirmiş ve *Drosophila melanogaster*'de anastazis mekanizmasını başarıyla göstermiştir. Fakat mekanizma birçok kanser hücresi üzerinde *in vitro* şartlarda araştırılsa da süreçle ilgili olarak henüz *in vivo* tümör modellerinde bir araştırma bulunmamaktadır. Anastazis mekanizmasıyla yaşama doğru kıvrılan hücrelerin yüksek onkojenik karaktere sahip olması anastazisin *in vivo* şartlarda test edilerek mekanizmaya yönelik detaylı araştırmaların yapılması oldukça önem arz etmektedir.

Özetle, anastazis sürecine dair nispeten bu belirsizliğin ve akabindeki problemlerin çözülmesi gerekmektedir. Ancak anastazisin tespitine yönelik yerleşik bir biyobelirteçin olmaması ve ölümden dönen bu alt popülasyonun ana popülasyondaki hücrelerle morfolojik olarak aynı olması, ölümle yaşam arasında kalmış bu hücrelerin ayrım noktasında birtakım zorluklar yaratmaktadır. Bu alanda bazı başarılar elde edilmiş olsa da araştırılmayı ve çözülmeyi bekleyen birçok soru bulunmaktadır. Bu yüzden, gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışması KHDAK hücreleri için kemoterapötik bir ajanla tedaviden sonra apoptozisten yaşama geri dönen (post anastatik) anastatik hücre mekanizmasının detaylı araştırılmasını kapsamaktadır. Belki de en önemlisi, anastazisin klinik ortamda saptanması, kemorezistan (ilaca dirençli) ve metastatik hastalığı olan hastalar için kişiselleştirilmiş tedavi planlarının belirlenmesinde yararlı olacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Akciğer Kanseri

Normalde, akciğerlerimizdeki ve vücudumuzun diğer kısımlarındaki hücreler, hücre sayısını kontrol altında tutan belirli bir büyüme ve ölüm döngüsüne sahiptir. Bu dengenin bozulmasıyla hücreler; tümör, neoplazma veya lezyon adı verilen bir kitle oluşturur. Tümör hücreleri normal dokuları istila edebildiğinde, tümörün malign olduğu kabul edilir. Malign hücreler orijinal olarak akciğerden geldiğinde, tümör akciğer kanseri olarak adlandırılır. Akciğer kanserleri tipik olarak bronşları kaplayan hücrelerde ve akciğerin bronşiyoller veya alveoller gibi bölümlerinde başlar (Şekil 1) (https://www.lungevity.org/for-patients-caregivers/lung-cancer-101/how-lung-cancer-develops).



Şekil 1. Akciğer kanserinin varlığını gösteren şema (https://www.lungevity.org/for-patients-caregivers/lung-cancer-101/how-lung-cancer-develops)

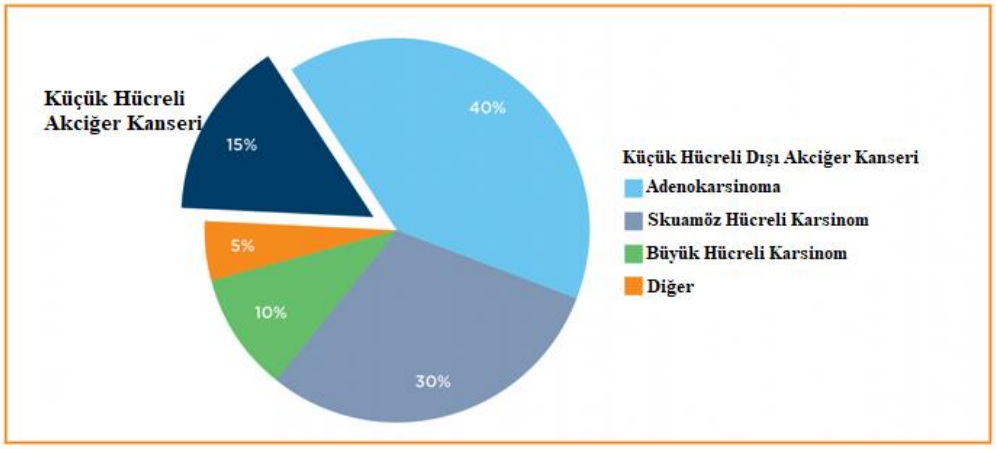
2.1.1. Akciğer Kanseri Alt Tipleri

Akciğer kanseri, histolojisine (hücrelerin mikroskop altında nasıl göründüğüne) veya biyobelirteçlerine (kanserde aktivitesi değişen genler veya proteinler) göre iki şekilde sınıflandırılabilir (Thai ve ark., 2021).

2.1.1.1. Akciğer Kanserinin Histolojiye Göre Sınıflandırılması

Farklı akciğer kanseri türleri, patoloğun mikroskop altında gördüğü hücre tipleri ile histolojik olarak tanımlanır. Akciğer kanserlerinin yaklaşık %85'i KHDAK, yaklaşık

%15'i ise küçük hücreli akciğer kanseridir (KHAK) (Thai ve ark., 2021). Adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli (farklılaşmamış) karsinom (Şekil 2) olmak üzere üç ana KHDAK alt tipi vardır (Travis ve ark., 2015).



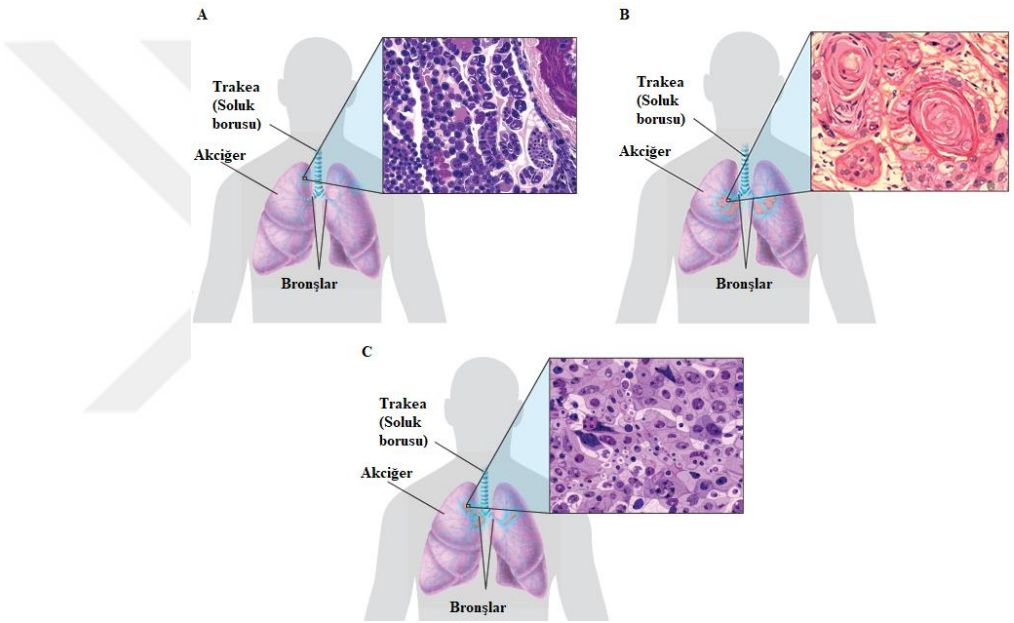
Şekil 2. Histolojiye göre akciğer kanseri türleri (https://www.lungevity.org/for-patients-caregivers/lung-cancer-101/how-lung-cancer-develops)

Akciğer adenokarsinomu, KHDAK'ların bir alt tipidir ve diğer türler gibi kanser hücrelerinin mikroskop altında nasıl göründüğüne göre kategorize edilir. Akciğer adenokarsinomu genellikle akciğerlerin dış kenarları boyunca yer alır (Şekil 3, A). Diğer akciğer kanserlerinden daha yavaş büyüme eğilimindedir ve tüm akciğer kanserlerinin %40'ını oluşturur (Herbst ve ark., 2018).

Skuamöz hücreli karsinomlar, akciğerlerdeki hava yollarının içini kaplayan düz hücreler olan skuamöz hücrelerde başlar. Akciğerlerin orta kısmında, ana hava yolunun (bronş) yakınında bulunma eğilimindedirler. Tümör büyürse, göğüs röntgeni veya bilgisayarlı tomografi (CT veya CAT) taraması akciğerde bir boşluk tespit edebilir. Bu boşluk ise, bir tümör kitlesi veya nodül içindeki gaz veya sıvı dolu bir boşluktur ve skuamöz hücreli akciğer kanserinin klasik bir belirtisidir (Şekil 3, B). Bu türün beyin, omurga ve diğer kemikler, adrenal bezler ve karaciğer dahil olmak üzere birçok bölgeye yayılma özelliği vardır. Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %30'u skuamöz hücreli akciğer kanseri olarak sınıflandırılır (Derman ve ark., 2015).

Büyük hücreli akciğer kanseri, mikroskop altında açıkça adenokarsinom veya skuamöz hücreli akciğer kanseri hücrelerinden farklı görünmekle birlikte büyük boyutları ile

KHAK hücrelerinden ayırt edilirler (Şekil 3, C). Hızlı bir şekilde büyümeye ve yayılmaya meyillidir, bu da tedavi edilmesini zorlaştırabilir. Geçmişte, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %10'u büyük hücreli olarak sınıflandırılırdı. Bununla birlikte, akciğer kanserini teşhis etmenin daha kesin yolları kullanılmaya başlandıkça, bu oran muhtemelen %2'ye kadar düşmektedir. Geçmişte büyük hücreli olarak kabul edilen birçok akciğer kanseri, şimdi akciğer adenokarsinomu veya skuamöz hücreli akciğer kanseri olarak tanımlanıyor. Bu ek bilgiye sahip olmak, tedavi seçeneklerini seçmek için önemlidir. Bu tip akciğer kanseri, daha sık periferde bulunsa da akciğerin herhangi bir yerinde de bulunabilir (Xiaochuan ve ark., 2020).



Şekil 3. KHDAK alt tiplerine ait mikroskobik görüntüler. A) Akciğer Adenokarsinom B) Skuamöz hücreli karsinom C) Büyük hücreli akciğer kanseri hücreleri (https://www.lungevity.org/for-patients-caregivers/lung-cancer-101/how-lung-cancer-develops)

Küçük hücreli akciğer kanseri, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %10 ile %15'ini oluşturur. Bu tip akciğer kanseri, KHDAK'tan daha hızlı büyüme ve yayılma eğilimindedir. Kansere yakalanan kişilerin yaklaşık %70'inde, bu tür teşhis edildiğinde yayılış göstermiş olurlar. Bu kanser hızla büyüdüğü için kemoterapi ve radyasyon tedavisine iyi yanıt verme eğilimindedir (Rudin ve ark., 2021).

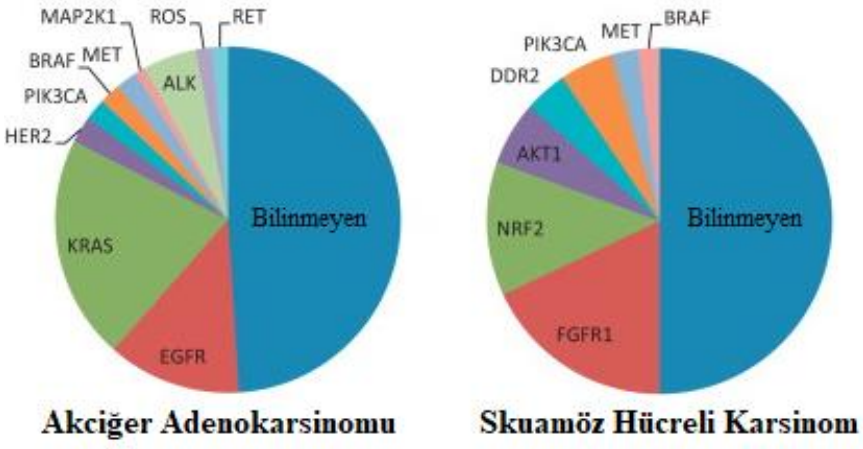
2.1.1.2. Akciğer Kanserinin Biyobelirteçlere Göre Sınıflandırılması

Kanser hastalarında gözlemlenen klinik yanıttaki büyük heterojenlik ve antikanser ilaçların dar terapötik endeksleri göz önüne alındığında, kanser tedavisini bireyselleştirmek için yeni yöntemler hasta sonuçlarını iyileştirmek için kritik öneme sahiptir. Kanseri moleküler düzeyde anlamamız, tümörleri yalnızca anatomik konumla karakterize etmekten moleküler profillerini dikkate almaya doğru bir kayma ile sonuçlanmıştır (Fontana ve ark., 2022). Yakın zamana kadar, genomik kanser araştırmalarının çoğunluğu keşif ve doğrulama aşamasındaydı; bununla birlikte, tümör moleküler profilleme konusundaki bilgiler arttıkça, klinikte genomik kanser tıbbı giderek daha somut hale gelmektedir (Berger ve Mardis, 2018).

Kanser biyobelirteçleri genel olarak prognostik ve prediktif olarak iki sınıflandırmaya ayrılır. Prognostik bir biyobelirteç, tedavinin yokluğunda esas olarak hastalık sonucu ile ilişkilidir, prediktif bir biyobelirteç ise ilaç yanıtının değerlendirilmesinde değerlidir (Costantini ve Budillon, 2020).

2.1.1.2.1. Akciğer Kanserinde Genomik Biyobelirteçler

Akciğer kanserinin moleküler biyolojisinin aydınlatılmasındaki ilerlemeler, KHDAK'lı hastaların klinik yönetiminde ilgili olabilecek bir dizi potansiyel biyobelirteçlerin tanımlanmasına yol açmıştır (Şekil 4) (Pikor ve ark., 2013).



Şekil 4. Akciğer adenokarsinomu ve skuamöz hücreli karsinomun moleküler alt tipleri (Pikor ve ark., 2013'ten [s. 180] Türkçeleştirilerek alınmıştır)

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR): Epidermal büyüme faktörü reseptör geni (EGFR), reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. EGFR sinyali, gelişim ve hücresel homeostaz, çoğalma ve büyümede kritik öneme sahiptir (Sharma ve ark., 2007). EGFR proteininin, çoğu akciğer kanserinde aşırı eksprese edildiği bilgisi 1990'lı yıllara kadar uzanmaktadır (Tateishi ve ark., 1991). Bu nedenle EGFR uzun zamandır akciğer adenokarsinomunda onkogen ve varsayılan terapötik hedef olarak yer almaktadır. EGFR, KHDAK'ların %62'sinde aşırı eksprese edilir ve ekspresyonu kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Sharma ve ark., 2007).

Kirsten Sıçan Sarkomu Viral Onkogen Homoloğu (KRAS): KRAS onkogeni, RAS membranla ilişkili G proteinleri ailesinin bir üyesidir ve çoğalma, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve hayatta kalma dahil olmak üzere çeşitli hücresel tepkilerde yer alan içsel GTPaz aktivitesine sahip bir proteini kodlar (Edkins ve ark., 2006). KRAS, EGFR dahil olmak üzere bir dizi tirozin kinaz reseptörünün aşağı akışında (downstream) hareket eder ve RAS/RAF/MAP kinaz/ERK ve RAS/MAPK sinyal yollarının aktivasyonu ile ilişkilidir (Sholl, 2015). KRAS mutasyonları, KHDAK hastalarının %25 ila %35'inde, esas olarak katı paternli adenokarsinomlarda meydana gelir (Kempf ve ark., 2016). KRAS mutasyonunun varlığı, olumsuz sonuçlarla ilişkili olabilmekle beraber (Ying ve ark., 2015) kemoterapiye yanıtın negatif bir göstergesi olabilir (Macerelli ve ark., 2014). Ek olarak, ikinci bir primer tümöre sahip olma olasılığının artmasıyla ilişkilidir (Shepherd ve ark., 2013).

ROS proto-onkogen 1, reseptör tirozin kinaz (ROS1): ROS proto-onkogen 1, reseptör tirozin kinaz (ROS1), insülin reseptör ailesinin bir tirozin kinaz reseptör üyesidir. ROS1, çeşitli organların gelişimi sırasında epitel hücre farklılaşmasında rol oynar, ancak bu reseptör için hiçbir ligand tanımlanmamıştır (Bergethon ve ark., 2012). Klinik araştırmalar, ROS1 yeniden düzenlemesini barındıran ileri evre KHDAK'lı hastaların krizotinib tedavisinden fayda gördüğünü ve %80'e varan yanıt oranları gösterdiğini bildirmiştir (Mazières ve ark., 2015). Ulusal Kapsamlı Kanser Ağı 2014 kılavuzları, ileri üçlü negatif [EGFR, ALK (anaplastik lenfoma kinaz) ve KRAS] akciğer adenokarsinomu olan tüm hastaların ROS1 dahil diğer moleküler belirteçler için test edilmesini önermektedir (Mazières ve ark., 2015).

İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2 (HER2): İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 geni HER2 (ERBB2), bir proto-onkogendir (Popescu ve ark., 1989). ERBB reseptör ailesinin bir tirozin kinaz reseptörü üyesini kodlar (Ricciardi ve ark., 2014). HER2'de belirli bir ligand yoktur. Bununla birlikte, bir heterodimer oluşturmak için diğer ERBB reseptörleri ile birleştirilebilir (Bu ve ark., 2017). Bu, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve göçünde yer alan MAPK (mitojenle aktive olan protein kinaz) ve PI3K (fosfatidilinositol 3-kinaz) yolakları dahil olmak üzere önemli sinyal iletim yollarının aktivasyonuna izin verir (Ricciardi ve ark., 2014). HER2 ekspresyonu ve/veya amplifikasyonu meme ve mide kanseri dahil birçok kanserde bulunur. HER2'nin aşırı ekspresyonu, KHDAK'ların %7 ila %34,9'unda rapor edilmiştir ve bu tümörleri olan hastalarda kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. HER2'nin aktive edici mutasyonları, akciğer kanserlerinin %1,6 ila %4'ünde bulunmuştur (Yamamoto ve ark., 2008). Farklı çalışmalar, yaklaşık %50 yanıt oranları gösteren HER2 hedefli tedavilerden (afatinib ve trastuzumab) fayda görebilecek hastaları seçme yöntemi olarak HER2 mutasyonu için akciğer adenokarsinomlarının taranmasının önemini pekiştirmektedir (Mazières ve ark., 2015).

RET proto-onkogeni: RET proto-onkogeni, bir transmembran reseptörünü ve proteinlerin tirozin protein kinaz ailesinin bir üyesini kodlar. Ligandların kodlanmış reseptöre bağlanması, reseptör dimerizasyonunu ve hücre farklılaşması, büyümesi, göçü ve hayatta kalmasında rol oynayan downstream sinyal yollarının aktivasyonunu uyarır (Knowles ve ark., 2006). In vitro çalışmalar, RET füzyonlarının, vandetanib, sorafenib ve sunitinib gibi çok hedefli kinaz inhibitörleri tarafından inhibe edilebilen onkojenik dönüşüme yol açtığını göstermiştir (Lipson ve ark., 2012).

MET proto-onkogeni: MET geni, hücre proliferasyonu, hayatta kalma, motilite ve istilada temel roller oynayan çoklu sinyal yollarını aktive eden bir tirozin kinaz reseptörünü (hepatosit büyüme faktörü reseptörü) kodlar (Fujimoto ve Wistuba, 2014). MET'in patolojik aktivasyonu, mutasyon, gen amplifikasyonu ve aşırı protein ekspresyonunu içerir (Paik ve ark., 2015). MET değişiklikleri ilk olarak renal papiller karsinomalı hastalarda ve MET kinaz alanındaki mutasyonlarda reseptörün yapısal aktivasyonuna yol açanlarda rapor edilmiştir (Schmidt ve ark., 1997). Akciğer kanserinde, MET mutasyonları, skuamöz hücreli akciğer kanserlerinin %3'ünde ve

akciğer adenokarsinomlarının %8'inde meydana gelir. MET amplifikasyonları akciğer adenokarsinomlarının %4'ünde ve skuamöz hücreli akciğer kanserlerinin %1'inde bulunur ve MET inhibitörlerine duyarlılık ile ilişkilidir (Paik ve ark., 2015). KHDAK'da, yüksek MET gen kopya sayısıyla birlikte MET ve hepatosit büyüme faktörü protein ekspresyonu, kötü prognoz faktörleri olarak tanımlanmıştır (Beau-Faller ve ark., 2008; Masuda ve ark., 2012).

B-RAF proto-onkogen, serin/treonin kinaz (BRAF): B-RAF proto-onkogen, serin/treonin kinaz (BRAF) onkogeni, RAS/RAF/MEK/ERK sinyal yolunda yer alan bir serin/treonin kinazı kodlar. Onkojenik mutasyonlar tarafından aktive edildiğinde, BRAF MEK'i fosforile eder ve hücre büyümesini, çoğalmasını ve hayatta kalmasını destekler. BRAF mutasyonları KHDAK'ların %1 ila %3'ünde (çoğunlukla adenokarsinom olduğu) rapor edilmiştir (Cardarella ve ark., 2013).

Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat 3-kinaz katalitik alt birim alfa (PIK3CA): PI3K'lar, katalitik ve düzenleyici alt birimlerden oluşan heterodimerik lipid kinazlardır ve hücre büyümesi, transformasyon, adezyon, apoptoz, sağkalım ve motilitede rol oynayan çeşitli aşağı akış yolaklarının bir parçasıdır (Yamamoto ve ark., 2008). Akciğer kanserleri de dahil olmak üzere birçok tümörde PKI3CA amplifikasyonları, delesyonları ve somatik hatalı mutasyonlar bildirilmiştir. Aslında, PIK3CA, insan kanserlerinde KRAS'la birlikte en yaygın mutasyona uğramış onkogenlerden biridir (Samuels ve Velculescu, 2004). Mutasyonlar KHDAK hastalarının %1 ila %4'ünde bulunur (Endoh ve ark., 2006; Fujimoto ve Wistuba, 2014; Kawano ve ark., 2006; Samuels ve Velculescu, 2004).

2.1.1.2.2. Akciğer Kanserinde İmmünoterapi Belirteçleri

Kanser immünoterapisi, tümörlerin kendinden ziyade yabancı olarak tanınabileceği ve aktifleştirilmiş bir bağışıklık sistemi tarafından etkin bir şekilde saldırıya uğrayabileceği fikrine dayanır. Bununla birlikte, tümörün ilerlemesi sırasında, düzenleyici bağışıklık tepkisini kontrol eden kontrol noktalarından yararlanılarak kanser hücrelerinin bağışıklık gözetiminden kaçmasına izin veren özelliklerin edinilmesi gerçekleşebilir (Spranger ve Gajewski, 2018).

Programlanmış Hücre Ölümü 1 (PD-1), Programlanmış Ölüm-Ligandı 1 (PD-L1), PD-L2: PD-1 reseptörü, tümör mikroçevresinde bulunan ligandı (PD-L1) ve antijen sunan hücreler tarafından eksprese edilen ikinci bir ligand olan PD-L2 ile T hücreleri tarafından ifade edilen bir inhibitör reseptördür (Garon ve ark., 2015). PD-L1 ve PD-L2'nin, özellikle kanserde, PD-1'e bağlandıktan sonra T hücresi aktivasyonunu down regüle ettiği ve böylece bağışıklık tepkisini kesintiye uğrattığı gösterilmiştir (Akbay ve ark., 2013). Şu anda, anti-PD-1 tedavisine yanıt verme olasılığı en yüksek olan hastaları tanımlamak için doğrulanmış bir belirteç bulunmamaktadır; bununla birlikte, PD-1 ve PD-L1 ekspresyonunun prediktif değeri ile ilgili araştırmalar devam etmektedir.

2.2. KHDAK'da Güncel Kemoterapötik Yaklaşımlar

Her ne kadar moleküler hedefli tedavi ve immüno-onkolojideki son gelişmeler akciğer kanseri terapötiklerinin doğasında devrim yaratmış olsa da sitotoksik kemoterapi akciğer kanseri tedavisinin önemli bir bileşeni olmaya devam etmektedir. Kemoterapi, tümör hücrelerinin büyümesini ve bölünmesini durdurmak için ilaçların kullanıldığı bir tedavidir. Her hasta kemoterapi ilaçlarına farklı yanıt verirken, kemoterapi tedavisi akciğer kanseri tümörlerini küçültebilir, akciğer kanseri semptomlarını hafifletebilir ve ömrü uzatabilir. Bu geleneksel tedavi, akciğer kanserinin tüm evrelerinde hem KHDAK hem de KHAK için kullanılabilir. Kemoterapi ilaçları, hızla büyüyen hücrelerin çekirdeğindeki DNA'ya zarar vererek veya hücrelerin bölünüp büyümesini engelleyerek çalışır. Şu anda, paklitaksel (PTX) dahil olmak üzere kemoterapi, KHDAK tedavisinin temelini oluşturmaktadır (Pirker, 2020). KHDAK tedavisi için yaygın olarak kullanılan bazı kemoterapötik ilaçlar Çizelge 1'de verilmiştir.

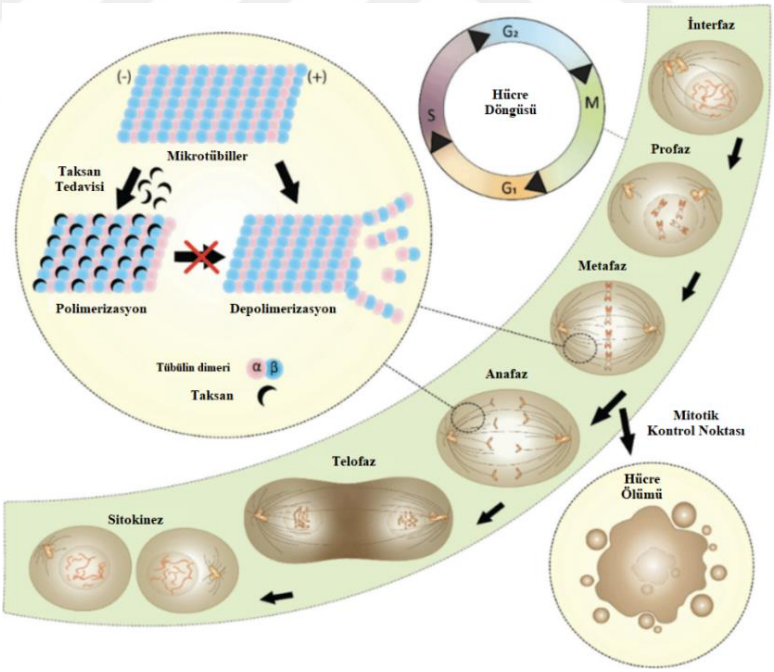
Çizelge 1. KHDAK tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçları

Genel (kimyasal) isim	Ticari İsim
karboplatin	Paraplatin
sisplatin	Platinol-AQ
dosetaksel	Taxotere
etoposid	Etopophos

Çizelge 1. KHDAK tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapi ilaçları (devam)

gemsitabin	Gemzar
paklitaksel	Taxol, Onxol
Paklitaksel (albümine bağlı)	Abraksan
pemetrekset	Alimta
vinorelbin	Navelbine

Kullanılan kemoterapi yelpazesinin genişliğine rağmen PTX uzun süredir birinci basamak tedavilerin baş aktörü olmuştur. Mikrotübülleri hedef alan bir antikanser ilacı olan PTX, mikrotübülün β-tübülin alt birimine bağlanarak mikrotübül polimerizasyonu ile depolimerizasyon arasındaki dinamik dengeyi bozar. Bu sayede hücre döngüsü G2/M fazında mitotik durma ile sonuçlanır (Şekil 5) (Škubník ve ark., 2021). Ayrıca, apoptotik düzenleyici proteinler olan Bcl-2 ailesi ve JNK/SAPK, NFκB yolağı gibi diğer sinyal yolları aracılığıyla hücrelerin ölümünü modüle eder (Lim ve ark., 2022).

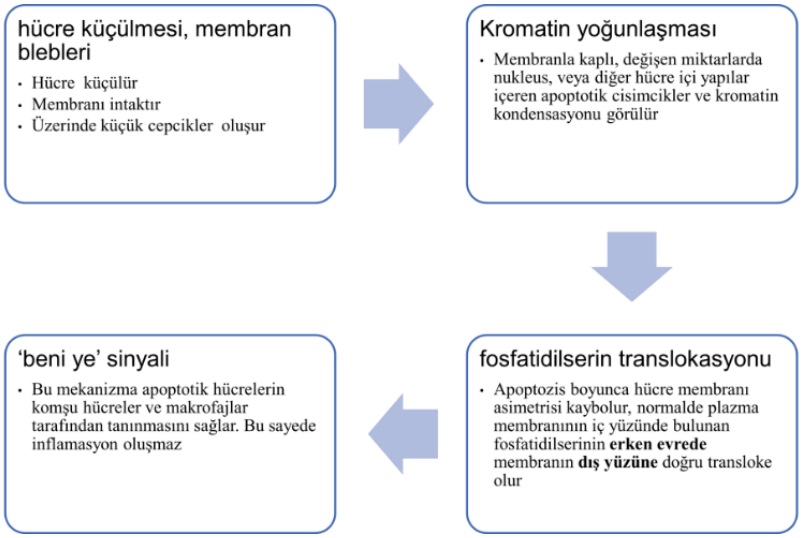


Şekil 5. Paklitaksel'in etki mekanizması (Škubník ve ark., 2021'den [s. 10] Türkçeleştirilerek alınmıştır)

2.3. Hücre Ölümü ve Apoptozis

Hücre ölümü organizmanın gelişimi, doku homeostazı ve konak savunmasında çok önemli bir adımdır. Patolojik/fenotipik alt tiplemeleri dahil bilinen 200'den fazla kanser türünün (Siegel ve ark., 2022) ortak özelliklerinden en önemlisi hücre ölüm mekanizmalarının üstesinden gelmeleridir. Hücre ölümü, kanserlerde uzun süre araştırılmıştır. Ancak başlangıçta büyük ölçüde büyüyen tümörlerde hipoksik alanlarda gözlenen nekroz bağlamında rapor edilmiştir (Strasser ve Vaux, 2020). Nekroz gibi letal etkili hücre ölümünden farklı olarak, fizyolojik intihar süreci sonucunda hücrelerin öldüğü bildirilmiş ve bu hücre ölümüne atıfta bulunmak için "apoptoz" terimi önerilmiştir (Kerr ve ark., 1972). İlerleyen çalışmalarda ise hücre ölümüne olan ilgi artarak apoptozisin moleküler mekanizmaları aydınlatılmaya çalışılmıştır. Artık günümüzde apoptozun metazoanlar için yaşamın temel bir parçası olduğu ve hücrelerin apoptoza girme şeklinin nematodlardan memelilere kadar korunduğu kabul edilmektedir (Singh ve ark., 2019).

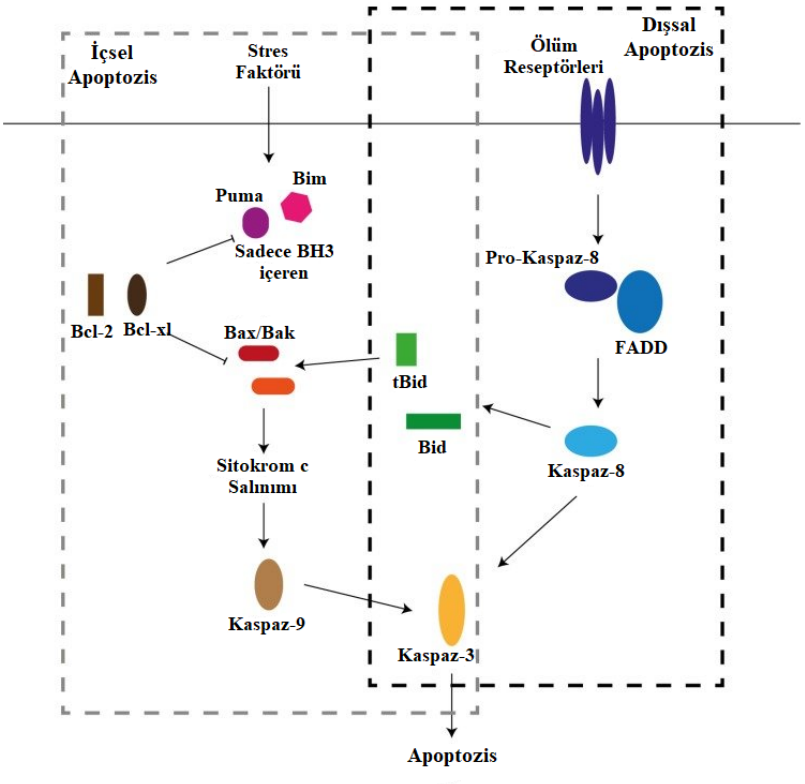
Görsel analizlerle ışık ve elektron mikroskopisiyle apoptozis sırasında meydana gelen hücre küçülmesi, piknotik ve fragmente nükleuslar gibi çeşitli morfolojik değişiklikler tanımlanmıştır (Şekil 6) (Häcker, 2000). Apoptozisin moleküler mekanizması ise enerjiye bağımlı oldukça karmaşık bir süreçtir. Bugüne kadar mekanizma dışsal veya ölüm reseptörleri yolu ve içsel veya mitokondriyal yol olarak iki ana sürece indirgenerek incelenmiştir. Hatta bu iki yolak birbirlerine kontrollü sinyal yollarıyla bağlanır (Şekil 7) (Igney ve Krammer, 2002).



Şekil 6. Apoptozisin morfolojik özellikleri (Hacker, 2000'den Türkçeleştirilerek uyarlanmıştır ve PowerPoint ile tasarlanmıştır)

Apoptozun dışsal fazını tanımlayan olaylar dizisi en iyi şekilde FasL/FasR ve TNF- α /TNFR modelleri ile karakterize edilmiştir. Bu modellerde, reseptörlerin kümelenmesiyle ligand bağlanması üzerine, reseptörlerin sitoplazmik domainlerine adaptör proteinler toplanır. Örneğin Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması adaptör protein FADD (Fas ilişkili ölüm domaini)'ın bağlanmasıyla sonuçlanır ve TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanmasıyla ise adaptör protein TRADD (tümör nekroz faktör reseptörü 1-ilişkili ölüm domaini alanı)'ın FADD ve RIP alımı ile bağlanmasıyla sonuçlanır. Adaptör proteinler ölüm efektör alanının dimerizasyonu yoluyla prokaspaz8 ile birleşir. Bu noktada, prokaspaz-8'in oto-katalitik aktivasyonu ile sonuçlanan, ölümü indükleyen bir sinyal kompleksi ("DISC") oluşur. Kaspaz-8'in aktifleşmesi ile apoptozisin yürütme aşaması tetiklenmiş olur. Aktif kaspaz-8 efektör kaspaz olarak sınıflandırılan kaspaz-3/7'nin proleotik aktivasyonuna neden olur. Cellat kaspazlar olarak da isimlendirilen aktif-kaspaz-3/7, sitokeratinler, PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase), plazma membranı, hücre iskeleti proteini alfa fodrin, nükleer protein NuMA dahil olmak üzere çeşitli substratları parçalayarak apoptotik süreci tamamlar. Bir diğer yol ise aktif kaspaz-8'in Bid'i enzimatik olarak parçalaması ile başlar. Bu bölünme 15kDa'lık t-Bid olarak isimlendirilen ara ürünün ortaya çıkmasıyla sonuçlanır (Li ve ark., 1998; Luo ve ark., 1998). t-Bid daha sonra dış mitokondriyal membrana yer değiştirir ve sitokrom c ve diğer apoptojenik proteinlerin mitokondrinin intermembran boşluğundan sitozole salınmasını

kolaylaştırmak için Bax veya Bak'ın oligomerizasyonunu destekler. Mitokondri membran potansiyelinin (MOMP) değişimi sonucu salınan sitokrom c, ATP'nin varlığında adaptör protein Apaf-1'e bağlanır ve onu aktive eder. Bu da sırasıyla kaspaz-9'u sisteme katarak apoptozom oluşumuna, kaspaz-9'un aktivasyonuna ve ardından cellat kaspazlar olan kaspaz-3/7 aktivasyonuyla sonuçlanır. İçsel yolak tek başına MOMP değişimiyle başlayabileceği gibi dışsal yolak tarafından indüklenen aktif kaspaz-8 tarafından da başlatılabilir. Fakat yolak akışı incelendiğinde en son aşama olarak kaspaz-3/7 aktivasyonunda kesişirler. Mekanizma Şekil 7'de özetlenmiştir.

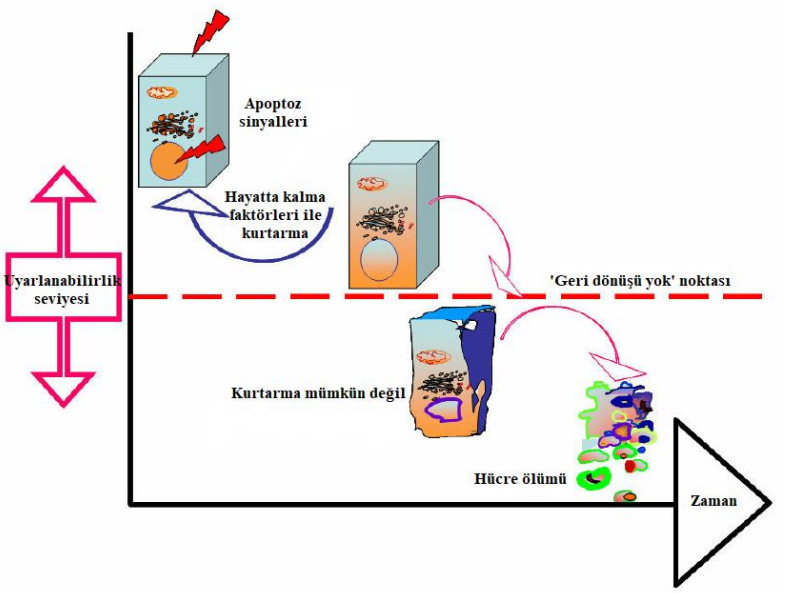


Şekil 7. Apoptozis mekanizmasına ait yolaklar (Wali ve ark., 2013'ten [s. 268] Türkçeleştirilerek alınmıştır)

2.3.1. Apoptozisin Evreleri ve Zaman Süreci

Senkronize bir şekilde apoptozise uğramaya indüklenen hücrelerin sitozolik ekstraktları ile yapılan çalışmalar, apoptozisin biyokimyasal ve morfolojik olarak farklı faza bölünebileceğini göstermiştir (Lazebnik ve ark., 1993; Solary ve ark., 1993). Bunlardan birincisi, pro-apoptotik uyaranlar, apoptozisin merkezi moleküler mekanizmasının aktivasyonunu tetikler (başlangıç aşaması). İkinci olarak, kararlı veya efektör fazda,

moleküler yürütme mekanizması tamamen aktive olur. Ancak bundan sonra, üçüncü veya bozunma aşamasında, apoptozisin ayırt edici özellikleri belirgin hale gelir. Bunlar morfolojik değişiklikleri ve DNA parçalanmasını içerir (Şekil 8).



Şekil 8. Apoptozisin aşamaları (Hilario ve ark., 2010'dan [s. 1027] Türkçeleştirilerek alınmıştır)

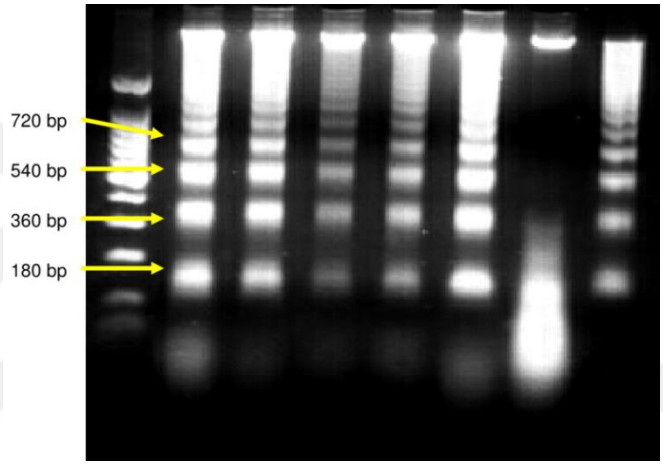
Hücre popülasyonlarında apoptotik ölümün asenkron doğası, esas olarak başlatma fazının oldukça değişken süresinden kaynaklanmaktadır. Geri dönüşü olmayan nokta, morfolojik özelliklerin ortaya çıkmasından birkaç saat önce meydana gelir (Brunet ve ark., 1998; Messam ve Pittman, 1998). İn vivo olarak, bir apoptotik hücre ölümünün süresinin, hücre tipine bağlı olarak değişebilmesine rağmen, 6 ila 24 saat arasında olduğu tahmin edilmektedir (Jiang ve ark., 2019; Kerr ve ark., 1972; Lazebnik ve ark., 1993).

2.3.2. Apoptozisin Biyokimyasal Özellikleri

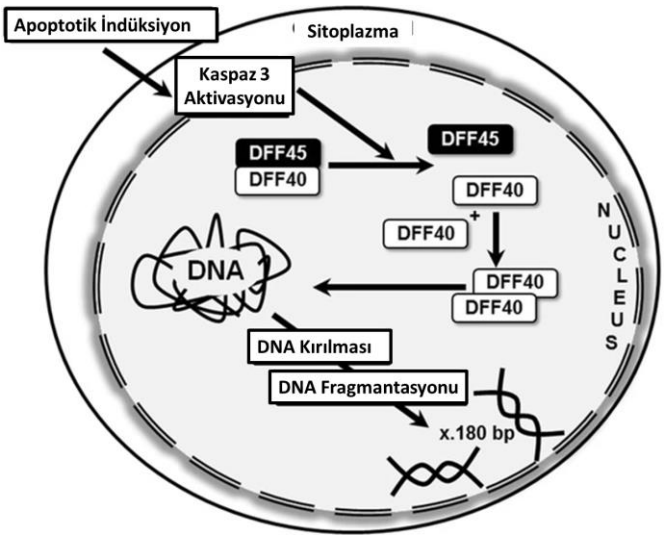
2.3.2.1. İnternükleozomal DNA Parçalanması

Apoptozun ayırt edici biyokimyasal özelliği, DNA'nın endojen DNazlar tarafından nükleozomal birimlere parçalanmasıdır, bu da çift sarmallı DNA'yı 180-200 baz çiftlik (bp) internükleozomal fragmanlara ve bunların katlarına (360, 540 vb.) ayrılmasını sağlar (Wyllie ve ark., 1980). Apoptotik hücrelerin DNA fragmanları, izole edilmiş DNA'nın elektroforezinde bir merdiven modeli olarak görünüm oluşturur (Zhang ve Xu, 2000). Bu,

apoptoz için tipik bir görünüm sağlar (Şekil 9) (Sekaran ve ark., 2010). Fragmantasyon apoptotik hücrelerde CAD ("caspase activated DNaz- kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz-'') enzimi tarafından DNA'nın nükleozom birimlerine ayrılmasıyla sağlanır. CAD normal hücrelerde ICAD'a ("inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease"-kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü-DNA fragmentasyon faktör) bağlı inaktif formda bulunur ancak apoptoz sinyali alan hücrelerde kaspaz 3 tarafından aktive edilir ve bu enzim DNaz (endonükleaz) olduğu için çekirdek DNA'sının hızlı biçimde 180-200 baz çiftlik nükleozomal fragmanlara ayrılmasını sağlar (Şekil 10) (Güleş ve Eren, 2008; Majtnerová ve Roušar, 2018).



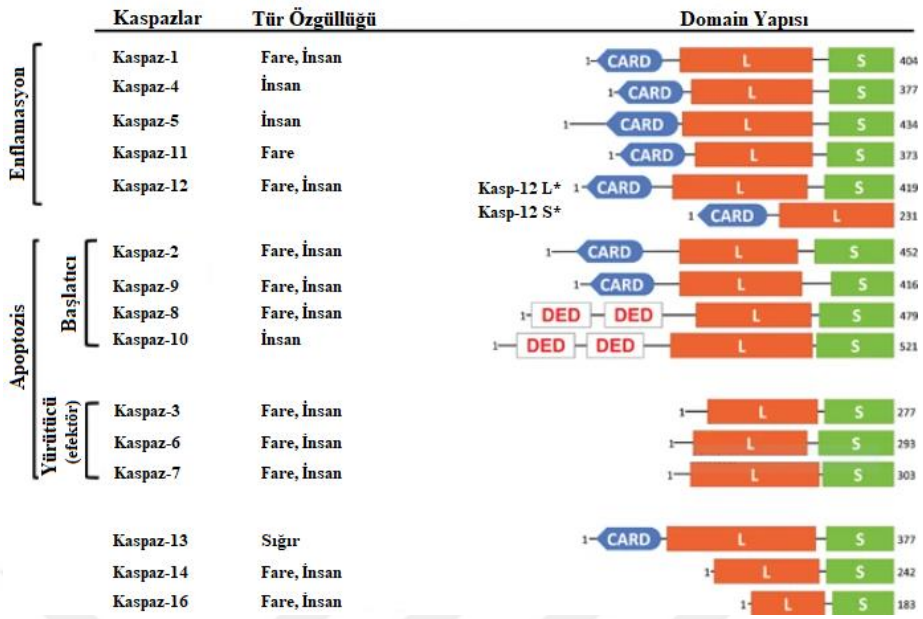
Şekil 9. Agaroz jel elektroforezi ile apoptotik DNA fragmanlarının görüntüsü (Sekaran ve ark., 2010 [s. 499])



Şekil 10. Apoptoz ile indüklenen DNA fragmantasyonu (Majtnerová, 2018'den Türkçeleştirilerek alınmıştır)

2.3.2.2. Kaspaz Aktivasyonu

Apoptoz olarak tanıdığımız bu morfolojik değişikliklere ve genellikle bu fenomenle ilişkili biyokimyasal değişikliklere ne sebep olur? Cevap kaspazlardır. Kaspazlar, metazoanlar boyunca filogenetik olarak korunan ve birçok farklı role hizmet eden bir sistein proteaz ailesidir. Memeli kaspazları, bağışıklıkla ilgili olanlar (1, 4, 5, 11, 12) ve apoptotik hücre ölümünü kolaylaştıranlar (2, 9, 8, 10, 3, 6, 7) olmak üzere iki fonksiyonel gruba ayrılır (Şekil 11) (Shalini ve ark., 2015). Normalde hücrelerin içinde aktif olmayan (inaktif proenzim) öncüler olarak bulunurlar. Spesifik hedef substratları parçalamak için aktive edilirler. Tam enzimatik aktivitenin uyarılması için, büyük ve küçük alt birimleri birbirinden ayıran spesifik iç aspartat kalıntılarında bölünme gerektirirler (Alnemri ve ark., 1996). Substrat özgüllüğü, prodomain yapısı ve biyolojik fonksiyon üzerine yapılan çalışmalar, kaspazların apoptoz sırasında kendiliğinden çoğalan bir kaskad da aktive olduğunu ortaya koymuştur (Riedl ve Shi, 2004; Opdenbosch ve Lamkanfi, 2019). Yani apoptotik kaspazlar kendi içinde, N-ucuna doğru spesifik protein etkileşim alanlarının varlığına veya yokluğuna bağlı olarak başlatıcılar ve yürütücüler (efektörler) olmak üzere alt bölümlere ayrılır (Şekil 11) (Shalini ve ark., 2015). 2, 8, 9 ve 10 numaralı kaspaz gibi upstream (yukarı akış) kaspazlarının pro-apoptotik sinyallerle aktivasyonu, downstream (aşağı akış) veya efektör kaspazların 3, 6 ve 7'nin proteolitik aktivasyonuna yol açar. Efektör kaspazlar aslında bir dizi hayati proteini parçalara ayırır ve böylece DNA yıkımı ve tipik morfolojik özellikler dahil olmak üzere apoptotik bozunma fazını başlatır ve yürütür.



Şekil 11. Memeli kaspazlarının domain yapısı ve fonksiyonel sınıflandırması. CARD, kaspaz aktivasyon ve alım alanı; DED, ölüm efektör alanı; L, büyük alt birim; S, küçük alt birim; S*, kısa form; L*, uzun form (Shalini ve ark., 2015'ten [s. 527] Türkçeleştirilerek alınmıştır)

Kaspaz aktivasyonunun iki ana yolu karakterize edilmiştir. Bunlardan biri, örneğin Fas ve TNF reseptörlerini içeren ölüm reseptörlerinin bağlanmasıyla başlatılır. Kaspaz 8, reseptörlerde bir sinyal kompleksi tarafından aktive edilen bu yoldaki en apikal kaspazdır. Diğer, mitokondriyal yol, çeşitli sitotoksik ajanların, anormal onkojen ekspresyonunun ve p53'ün neden olduğu apoptotik sinyalleri birleştirir (Fearnhead ve ark., 1998; Soengas ve ark., 1999).

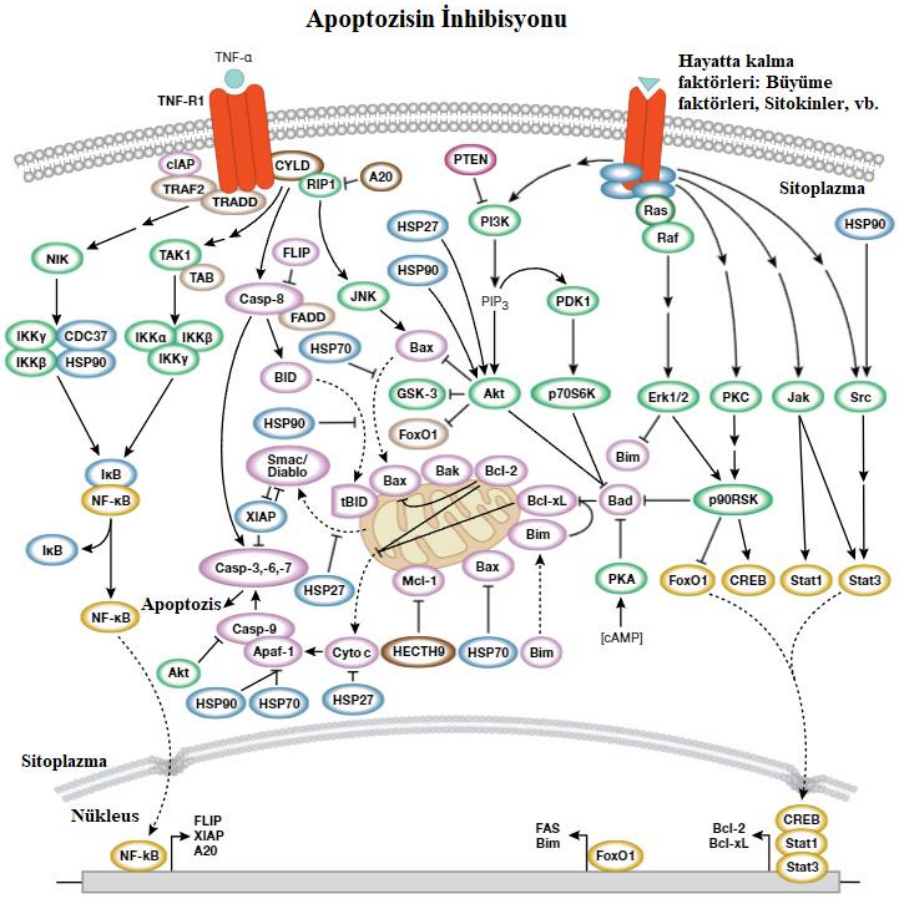
2.3.3. Apoptotik Hücre Ölümünün İnhibisyonu

Apoptotik inhibitörler, hücrenin hayatta kalmasını teşvik ederek hücre proliferasyonunu düzenler. Bu inhibitörler, pro-apoptotik ve anti-apoptotik faktörlerin inhibisyonu da dahil olmak üzere sayısız kavşak yol mekanizması aracılığıyla çalışmaktadır (Şekil 12) (Abdelhafez ve ark., 2019). Potansiyel anti-apoptotik tedavi yöntemlerinin kısa bir listesi, IAP ("inhibitors of apoptosis proteins"-apoptoz proteinlerinin inhibitörleri) protein ailesinin stimülasyonunu, kaspaz inhibisyonunu, PARP (poly [ADP-ribose] polymerase-poli [ADP-riboz] polimeraz) inhibisyonunu, PKB/Akt (protein kinaz B) yolunun stimülasyonunu ve Bcl-2 proteinlerinin inhibisyonunu içerir (Elmore, 2007).

IAP protein ailesi hem içsel hem de dışsal yolları düzenlemeleri nedeniyle belki de apoptozun en önemli düzenleyicileridir (Deveraux ve Reed, 1999). Bu ailenin en bilindik üyeleri XIAP (X-bağlantılı memeli apoptoz proteini inhibitörü) ve survivin proteinleridir (Silke ve ark., 2002). XIAP başlatıcı ve efektör kaspazlara, özellikle Kaspaz-3 ve Kaspaz-7'ye bağlanır ve aktivitelerini inhibe ederek hücre ölümünü engeller. Şimdiye kadar, IAP ailesinin üyeleri, felç, omurilik yaralanmaları, multipl skleroz ve kanser tedavisi için terapötik hedefler olarak araştırılmıştır. Sentetik nonspesifik kaspaz inhibitörü z-VAD-FMK'nın sıçan ve fare miyokard enfarktüs modellerinde miyokardiyal reperfüzyon hasarının şiddetini azalttığı gösterilmiştir (Mocanu ve ark., 2000). Kaspaz aktivitesinin spesifik inhibitörleri de bu anlamda faydalı olabilir. Nitekim Kaspaz I olarak da adlandırılan ICE (Interlökin-1 beta dönüştürücü enzim), apoptoz sırasında hücre içi protein yıkımına aracılık eden bir sistein proteazdır. ICE inhibitörleri, interlökin 1β'nin azaltılması yoluyla romatoid artrit ve diğer inflamatuar durumları tedavi etmek için geliştirilmiştir (Le ve Abbenante, 2005).

PARP-1'in hem DNA onarımı hem de apoptozdaki ikili rolü nedeniyle, PARP-1 inhibitörlerinin farmakolojik kullanımı iskemik ve inflamatuar hücre ve organ hasarını azaltma veya antitümör ajanların sitotoksisitesini arttırma şeklindedir (Graziani ve Szabó, 2005). PARP-1 nakavt farelerle yapılan son araştırmalar, PARP-1 inhibitörlerinin kullanımının miyokardiyal iskemi ve reperfüzyon hasarı ile bağlantılı yaralanma için etkili bir tedavi olabileceğini göstermektedir (Zhou ve ark., 2006). PKB/Akt sinyalini uyaran ve hücrenin hayatta kalmasını destekleyen insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) infüzyonunun, miyokardiyal iskeminin hayvan modellerinde faydalı olduğu gösterilmiştir. Transgenik kardiyak iskemi modelleri ve global beyin iskemisi ile ilgili diğer çalışmalar, Bax ekspresyonunun ve/veya fonksiyonunun inhibe edilmesinin mitokondriden sitokrom c salınımını önleyebileceğini, mitokondriyal membran potansiyelindeki azalmayı engelleyebileceğini ve hücreleri apoptoza karşı koruyabileceğini göstermektedir (Elmore, 2007). IAP regülasyonu çeşitli moleküller tarafından düzenlenir. IAP'lerin kendileri, içsel ve bazı dışsal apoptotik uyaranlar sırasında sitozole salınan Smac/Diablo ve HtrA2/Omi adlı iki mitokondriyal protein tarafından inhibe edilir. Omi/HtrA 2 sitoplazmada XIAP proteinine bağlanarak bu proteinin inhibisyonuna neden olur. Bu şekilde, hücre ölümünün indüksiyonuna aracılık

eder. Smac/DIABLO ise herhangi bir apoptotik uyaranla birlikte sitoplazmaya salınır. Burada IAP proteinlerine bağlanır ve apoptozisi indükler (Bildik ve Bayar, 2018).



Şekil 12. Apoptozisin inhibisyonunu gösteren sinyal yolakları. (https://www.cellsignal.com/pathways/inhibition-of-apoptosis-pathway)

Birçok hayatta kalma faktörü tarafından aktive edilen PI3K yolu, hayatta kalma sinyalizasyonunda önemli bir oyuncu olan Akt'nin aktivasyonuna yol açar. PTEN, PI3K/Akt yolunu negatif olarak düzenler. Aktive Akt, pro-apoptotik Bcl-2 aile üyeleri Bad, Bax, kaspaz-9, GSK-3 ve FoxO1'i fosforile eder ve inhibisyonuna neden olur. Birçok büyüme faktörü ve sitokin, anti-apoptotik Bcl-2 aile üyelerini indükler. Jaks ve Src, sırayla Bcl-xL ve Bcl-2 ekspresyonunu indükleyen Stat3'ü fosforile eder ve aktive eder. Erk1/2 ve PKC, CREB'yi aktive eden ve Bcl-xL ve Bcl-2 ekspresyonunu indükleyen p90RSK'yı aktive eder. Bu Bcl-2 ailesi üyeleri, sitokrom c salınımını ve ardından kaspaz-9 aktivasyonunu önleyerek mitokondrinin bütünlüğünü korur. TNF-a, hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik yolları aktive edebilir; TNF-α, kaspaz-8 ve -10'u aktive ederek

apoptozu indükleyebilir, ancak ayrıca Bcl-2 gibi anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu indükleyen NF-κB yoluyla apoptozu inhibe edebilir. cIAP1/2, TRAF2'ye bağlanarak TNF-a sinyalini inhibe eder. FLIP, kaspaz-8 aktivasyonunu engeller (Şekil 12).

2.4. Anastazis

Doku homeostazının proliferasyon ve ölüm arasındaki bir denge yoluyla sağlandığı (Toit, 2013) göz önüne alındığında, Programlanmış Hücre Ölümünün ("Programmed Cell Death" PCD) "hücreler için mitoz kadar içsel" olduğu ve fizyolojik ve patolojik koşulların yönetilmesinde çok önemli bir rol oynadığı açıktır. Aslında düzensiz bir hücre ölümü, nöronların kitlesel ölümünün meydana geldiği nörodejeneratif hastalıklar ve hücrelerin defektif bir şekilde çıkarılmasıyla teşvik edilen kanser de dahil olmak üzere bir dizi bozukluğun etiyolojisine katkıda bulunabilir (Gökhan ve ark., 2022). Çeşitli PCD biçimlerinin varlığını (ve aralarındaki ilişkiyi) destekleyen kanıtların artması bu alanı son derece karmaşık hale getirmektedir.

Kanserin hücre proliferasyonunda artış ve apoptoziste azalmaya bağlı olarak geliştiği bilinmektedir. Hücre ölümü engellendiğinde hasarlı hücreler birikir ve dokuya zarar verir (Carneiro ve El-Deiry, 2020). Apoptozis, programlanmış hücre ölümü yoluyla hasarlı hücreleri elimine ederek koruyucu bir mekanizma görevi görür (Fuchs ve Steller, 2011). Apoptotik hücrelerin, mitokondriyal disfonksiyon ve efektör kaspaz aktivasyonundan sonra, hücrelerin apoptotik yola bağlı olduklarına ve kaderlerini etkili bir şekilde mühürlediklerine inanılırdı. Çünkü tek başına kaspaz aktivasyonu veya mitokondriyal hasar hücre ölümüne neden olmak için yeterli bir sebeptir. Dolayısıyla bu zamana kadar, kaspaz aktivasyonu veya sitokrom c'nin sitoplazmaya salınımı apoptoziste "geri dönüşü olmayan nokta" olarak kabul edilir ve bu aşamalardan sonra hücrelerin geri döndürülemez olduğu bilinirdi (Chipuk ve ark., 2010; Green ve Kroemer, 2004). Fakat son yıllarda araştırmalarla ortaya çıkan yeni bir fenomenin hücrelerin bir alt popülasyonunun preapoptotik bir duruma geri dönebildiğini göstermesiyle bu teoriye meydan okunmuştur. Yeni keşfedilen bir mekanizma olan bu fenomen Yunanca 'canlanmak, hayata yükselmek' anlamlarına gelen anastazis olarak tanımlanmıştır (Tang ve ark., 2012). Anastazis, özünde apoptozisin tersine çevrilmesidir. Süreci başlatan temel olay ise apoptotik indükleyicinin ortamdan çıkarılmasıdır. Bu sayede apoptotik hücreler

post-anastatik hücrelere dönüşerek ölümün eşiğinden kurtulabilir ve hayatta kalabilirler. Hem *in vitro* (Inceboz ve ark., 2021; Seervi ve ark., 2019; Sun ve ark., 2017; Tang ve ark., 2022; Tang ve ark., 2017; Tang ve ark., 2012; Tang ve ark., 2009) hücre modellerinde hem de *in vivo* (Tang ve ark., 2018) olarak *Drosophila melanogaster*'de süreç başarılı bir şekilde ortaya konmuştur. Bu da anastazisin içsel bir iyileşme olayı olduğunu göstermektedir. Hatta anastazisin keşfi apoptoziste ‘‘geri dönüşü olmayan nokta’’ olmadığı gerçeğini gün yüzüne çıkarak PCD nomenklatürüne katkı sağlamıştır (Galluzzi ve ark., 2018).

Anastazise yönelik güncel çalışmalarda tümör hücrelerini yaşama doğru yönlendirdiği, ilaç direnci, metastazı indüklediği ve ayrıca maligniteyi teşvik ettiği ortaya konmuştur. İlk olarak Tang ve arkadaşları (2009) apoptotik indüksiyondan sonra insan kanser hücrelerinde gözlenen apoptozisin tersinir olduğunu ve ölmekte olan hücrelerin tekrar geri geldiğini bildirdiler. Sadece kanser hücrelerinde değil apoptozisin başladığı primer hücrelerde de indükleyicilerin uzaklaştırılması sonrasında anastazis mekanizması ile hücrelerin yaşama doğru döndüğü bildirilmiştir (Tang ve ark., 2012). Hatta bunun endojen bir mekanizma olduğunu ve anastazisin anormal hücrelere sınırlı bir fonksiyondan ziyade normal bir fizyolojik süreç olduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca mevcut çalışma ile anastazisin, memeli hücrelerinde genel bir fenomen olabileceği de ifade edilmektedir (Tang ve ark., 2012).

Bununla birlikte anastazisin indüklenmesinin veya inhibe edilmesinin farklı potansiyel uygulama alanları bulunduğu öngörülmektedir. Anastazisin indüklenmesi stratejisi ile nöronlar ve kardiyomiyositler gibi farklılaşması ve çoğalması kısıtlı olan hücrelerin korunması, fotoreseptör hücrelerinde retinal dejenerasyonun önüne geçilebilmesi, beyin hasarını takiben ya da nörodejeneratif hastalıklarda nöronal hasar derecesinin azaltılması veya fonksiyonel iyileşme, kardiyomiyositlerde ortaya çıkan apoptozisin geri döndürülmesi ile strese bağlı olarak kalbin fonksiyonel olarak iyileşmesi gibi rejeneratif sistemlerin desteklenmesi hedeflenebilecektir (Tang ve Tang, 2018). Anastazisin inhibisyonu ise klinik açıdan kanser hastalarının aldıkları tedavilerin fizyolojik yanıtında hayati öneme sahip olabilir. Kemoterapi ajanlarının neden olduğu toksisite profilleri tedavi rejiminin belirlenmesinde seçici etkiye sahiptir. Birçok kemoterapi ilacında her kür uygulama arasına belirli zaman süreçleri belirlenerek yan etkilerini azaltmak ve hasta

refahını arttırmak amaçlanmıştır. Fakat her yeni kür kemoterapi uygulamasından önce kullanılan ilaçların plazma konsantrasyonlarının azalması kanser hücrelerinin apoptotik hücre ölümünden kaçışı için fırsat olabilir. Bu yüzden uygulanan ajanın konsantrasyonunun azalmasıyla kanser hücreleri anastazisi bir kaçış yolu olarak kullanabilir ve bu durum muhtemelen kanser nüksüne katkıda bulunabilir (Sun ve ark., 2017; Tang ve Tang, 2018). Sun ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışma ile tümör hücrelerinin kemoterapi, radyoterapi veya cerrahi ile tetiklenen apoptozisten kurtulması durumunda, bu hayatta kalanların anjiyogenezi ve tümör nüksünü teşvik etmek için proanjiyojenik faktörlerin üretimini düzenleyebileceğini ortaya koymuştur.

2.4.1. Anastazisin Kanıtları ve Potansiyel Mekanizmaları

Başarılı kanser tedavisi, büyük ölçüde kanser hücrelerinde apoptozun etkili bir şekilde uyarılmasına dayanır. Çoğu hücrede, bu iyi tanımlanmış düzenlenmiş hücre ölümü biçimi, birbirine bağlı iki süreç gerektirir: MOMP ve kaspaz proteaz aktivasyonu. Mitokondriyal hasar veya kaspaz aktivasyonu tek başına hücre ölümünü başlatmak için yeterlidir (Galluzzi ve ark., 2012; Riedl ve Shi, 2004). Bu iki aşama apoptozis sürecinde geri dönülmez nokta (“point of no return”) olarak tanımlanmaktadır (Brentnall ve ark., 2013; Tait ve ark., 2010). Apoptozis süreci eğer verimsiz bir şekilde başlatılırsa geri dönülmez olarak tanımlanan sistemlerin aktivasyonları tam gerçekleşmez. Bu durumda hücrelerde apoptotik başarısızlık meydana gelmekte ve hücreler DNA hasarına bağlı olarak daha agresif bir fenotip kazanabilmektedirler. Başarısız apoptozisteki etken apoptotik indükleyicilerin düşük konsantrasyonlarda uygulanması olarak gösterilmiştir. Çünkü apoptotik uyaranlar öldürücü (“letal”) seviyelere ulaşmazsa, hücredeki tüm mitokondri fraksiyonlarında membran potansiyelleri etkilenmez (Tait ve ark., 2010). Veya etkilenen mitokondrilerin membranlarında sınırlı bir depolarizasyon oluşmaktadır. Bu durumda sitokrom c seviyesi etkilenerek düşük seviyelerde efektör kaspazlar (özellikle kaspaz-3/7) aktive edilir. Efektör kaspazların sınırlı aktivasyonu ise hücrede mutajenik ve pro-onkojenik sonuçlar doğurmakta ve hatta bu hücrelerde ana hücre popülasyonlarından oldukça farklı yüksek DNA hasarı gözlenmiştir (Ichim ve ark., 2015). Başarısız apoptozis sonucu genomik kararsızlığa, DNA hasarına ve düzensiz gen amplifikasyonu gibi potansiyel onkojenik hasara bağlı hücre transformasyonu farklı çalışmalarda da gösterilmiştir (Vringer ve Tait, 2019).

Başarısız apoptozun aksine, ölümcül konsantrasyonlarda ajanların uygulanmasıyla indüklenen apoptotik hücre ölümünden sonra bile yaşama doğru dönen hücrelerin varlığı rapor edilmiştir. Hatta bu hücrelerin anastazis olarak isimlendirilen mekanizma ile yaşama geri döndükleri gösterilmiştir (Seervi ve ark., 2019; Sun ve ark., 2017; Tang ve Tang, 2018). Tang ve arkadaşları (2012) etanol ile apoptoz indüklendikten sonra meme kanseri hücrelerinin hayatta kalmasının mümkün olduğunu belirtmiştir. Kanser hücrelerinin etanol ile tedavisinden sonra, tedavi edilen hücrelerde bazı apoptozis başlangıcı belirtilerin gözlenip apoptozun tamamlanmadığı ve hücre canlılığının restore edildiği görülmüştür. Yapılan çalışmalarda genel olarak bir indükleyici varlığında kaspaz-3/7 aktivasyonunun veya MOMP'daki değişikliklerin başlar başlamaz apoptotik uyarının ortadan kalkması durumunda hücrelerin anastazis mekanizması ile hayata döndükleri rapor edilmiştir. Hatta bu mekanizma, birçok hücre soyu ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Seervi ve ark., 2019; Tang ve Tang, 2018; Tang ve ark., 2009).

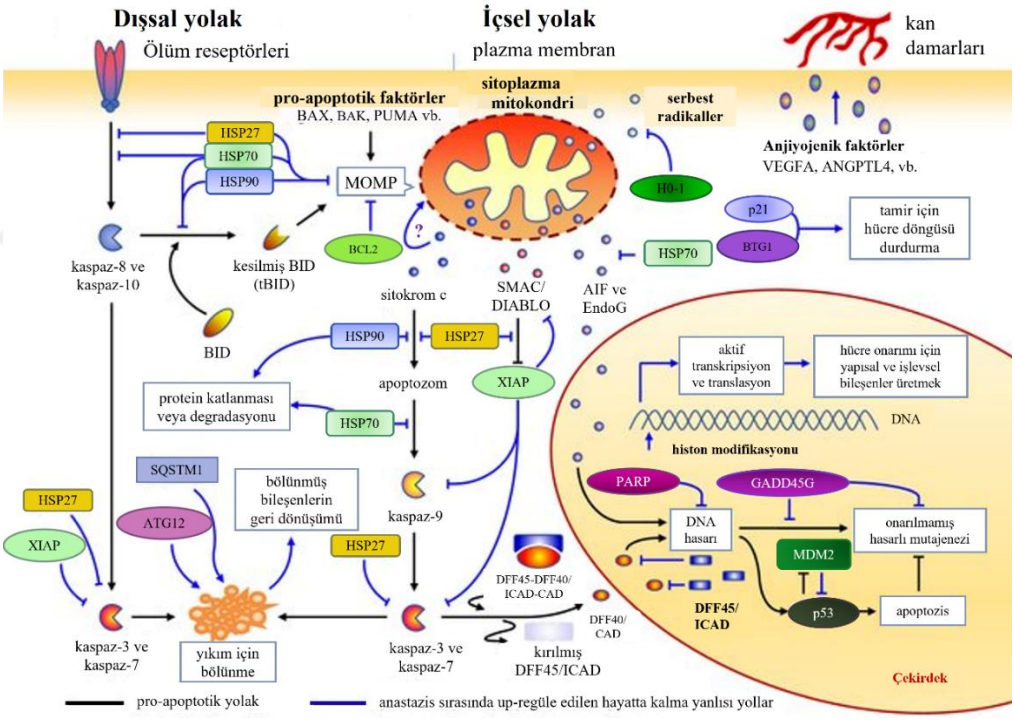
Tüm bu çalışmalar, ‘‘Ölmekte olan bir hücre, genel olarak kabul edilen 'dönüşü olmayan noktalara' ulaştıktan sonra hücre ölümünün eşiğinden kurtulabilir mi?’’ sorusunun cevabı olmuştur. Peki öyleyse ölmekte olan bir hücre, hücre ölümü kararını nasıl tersine çevirebilir? Çünkü iyileşme, programlanmış ölüm basamaklarını durdurmayı, normal hücresel işlevleri geri kazanmayı ve hasarı onarmayı içermelidir. Moleküler süreçlere yönelik yapılan ileri analizler ise anastazis mekanizmasının daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Çünkü anastazis mekanizmasında kompleks bir süreçte aktive olan kaspaz-3/7’lerin nasıl tekrar elimine oldukları veya inaktif forma dönebildikleri hala soru işaretidir. Prokaspaz-3'ün aktivasyonu, HSP27 proteini tarafından inhibe edildiği ve ayrıca kaspaz-9 aktivasyonu ve apoptozom oluşumu HSP27, HSP70 ve HSP90 proteinleri tarafından baskılandığına yönelik çalışmalar mevcuttur (Bratton ve Salvesen, 2010; Paul ve ark., 2002). Bu nedenle anastazis sırasında ısı şoku proteinlerinin gen ekspresyonlarındaki artışın kaspaz-3/7 inaktivasyonuyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Sun ve ark., 2017).

Anastatik hücrelerin bir kısmında kanser riskini arttıran çok çeşitli kromozomal anomaliler ve DNA kırılmaları tespit edilmiştir. Kaspaz-3/7 aktivasyonuna bağlı gerçekleşen DNA hasarı, başarısız apoptotik süreçle yaşama dönen hücrelerden farklıdır.

Çünkü anastatik hücrelerdeki DNA hasarında, bu hasarın onarımına yönelik moleküler düzeyde bir yanıt vardır. Ubiquitin ligaz MDM2'nin ekspresyon seviyesinin anastatik hücrelerde artışı, p53 proteinini parçalayan ve p53 ile ilişkili mitokondriyal apoptozu ve DNA hasarını baskılayan bir süreci tetikleyebilmektedir (Sun ve ark., 2017). Ayrıca, ısı şoku proteini olan HSP70'in ekspresyonunun anastazis sırasında arttığı ve DNA hasarını azaltmada hayati bir rol oynadığı belirtilmiştir (Mohammed ve ark., 2022).

Kaspaz-3/7 aktivasyonunu takip eden süreçte flipazların inhibisyonu fosfatidilserinin dış membran yüzeyine translokasyonuyla sonuçlanır. Eğer hücreler anastazis ile yaşama dönüş sağlıyor ise teoride fosfatidilserininde iç membran yüzeyine transloke olması veya dış yüzeyde bulunanların elimine olması beklenir. Kardiyomiyosit hücrelerinde yapılan çalışmalarda iskemik hasardan sonra iyileşen hücrelerde fosfatidilserinin iç plazma membranına transfer olduğunu bildirmiştir (Kenis ve ark., 2010). Anastazis çalışmalarında ise etanol tedavisi yoluyla hücre ölümünün indüklenmesinden sonra indükleyicinin kaldırılması fare kalp kası HL1 hücre soyunda ve neonatal sıçan primer kardiyomiyositlerinde fosfatidilserin iç membran yüzeyine translokasyonu bildirilmiştir. Tüm bu süreçler anastazis mekanizmasının hücreleri nasıl yaşama doğru çevirdiği ve apoptotik hücre ölümünün moleküler süreçlerini nasıl manipüle edebildiği yönündedir. Madalyonun bir diğer yüzünde ise anastazis sırasında meydana gelebilecek bir genetik transformasyon, iyileşen hücrelere ek terapötik direnç kazandırabilir. Bu nedenle, anastazis yoluyla iyileşen hücrelerin daha agresif ve terapötik modalitelere karşı dirençli olma riski artar (Sun ve ark., 2017). Çalışmalar anastazis ile ilaç direnci arasında bir ilişkinin yanı sıra anastazisle ilişkili genlerin ve yolakların katılımının, kemoterapötik ajanlara karşı ilaç direncini kolaylaştırdığını öne sürmüştür (Mirzayans ve Murray, 2020). Bu bağlamda yapılan farklı bir çalışmada, antikanser bileşikleri olarak etoposid ve paklitaksel ile geçiş tedavisinden sonra geri kazanılan anastatik meme ve rahim ağzı kanseri hücrelerinde eksportin 1 (XPO1) geninin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (Seervi ve ark., 2019). XPO1 geni, bir nükleer export proteinini kodlayarak kazanılmış ilaç direncinin desteklenmesinde ana rolleri oynar (Turner ve ark., 2016). XPO1'in aşağı regülasyonunun ise apoptotik hücrelerin iyileşmesini önemli ölçüde azalttığı ve anastatik kanser hücrelerinde onkojenik dönüşümü ortadan kaldırdığı, bu nedenle anastatik süreçte önemli rollere sahip olduğu bildirilmiştir (Seervi ve ark., 2019).

Anastatik hücreler ayrıca apoptozun farklı fazlarına direnen esnek bir hücre popülasyonunu temsil eder. Bu özellikler bakımından kanserin dirençli alt popülasyonu olan kanser kök hücreleriyle benzerlikleri dikkat çekmektedir. Son çalışmalar, apoptozdan iyileşen hücrelerin bazı kanser kök hücre belirteçlerini eksprese ettiğini bildirmiştir. Örneğin, apoptozun tersine çevrilmesinin, EMT uyarımını takip eden CD44/CD24 promotöründe epigenetik değişikliklere neden olarak kanser kök hücre özelliklerini indüklediği bildirilmiştir (Xu ve ark., 2018). HeLa (serviks kanseri hücresi) ve MDA-MB-231 (meme kanseri hücresi) üzerinde yapılan çalışmalarda ise anastatik kanser hücrelerinde, kanser kök hücre belirteçlerinden sadece ALDH1A3 ekspresyonunda artış gözlenmiştir. Bu durum aslında anastazis sürecinin kanser kök hücre mekanizmasını indükleyebildiğini göstermektedir (Seervi ve ark., 2019). Bu mekanizmaya ait temel yolak Şekil 13'te gösterilmiştir.



Şekil 13. Hücre iyileşmesi sırasında önerilen anastazis mekanizması. (Tang ve Tang, 2018'den [s. 4] Türkçeleştirilerek alınmıştır)

Anastazis sırasında tanımlanan hayatta kalma yanlısı yolların yukarı regülasyonu, başlatılan ölüm kaskadını bastırmak ve hücre iyileşmesini teşvik etmek için apoptozis yolağı ile etkileşime girer.

2.4.2. Anastazisin Kanser Üzerindeki Potansiyel Etkileri

Radyasyon ve yaygın olarak kullanılan birçok kemoterapi ilacı apoptozisi indükler ve toksisiteleri nedeniyle geçici olarak verilir. Bu nedenle, tümör hücreleri normal olarak kendileri için faydalı olabilecek anastazis iyileşme sürecini seçerse ve böylece terapinin neden olduğu hücre ölümünden kaçarsa, anastazis, tedaviyi takiben nüksün altında yatan bir neden olarak karşımıza çıkabilir. Nitekim, anastazis geçirmiş olan HeLa hücrelerinin bir kısmında, hücre morfolojisinde değişiklikler meydana geldiği ve daha invaziv karakterde oldukları gözlenmiştir. Bu nedenle, hayatta kalma ve invazyonu teşvik ederek, tümör hücrelerinde anastazis metastaza katkıda bulunabilir. Bu sebeple, anastazisin altında yatan mekanizmaları araştırmak ve onu geliştirmek veya engellemek için yöntemler bulmak kanser için yeni tedavi stratejileri sağlayabilir (Sun ve ark., 2017).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 2'de verilmiştir.

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddelerin listesi

Kimyasal Adı	Menşe
FBS (Fetal Bovine Serum)	PAA, ABD
Penisilin-Streptomisin Solüsyonu	Gibco, ABD
L-glutamin	Gibco, ABD
PBS	ThermoFisher, ABD
RPMI	Lonza, ABD
%0,05 Tripsin-EDTA	Gibco, ABD
DMSO	Sigma, Almanya
%0,5 Tripan mavisi	ThermoFisher, ABD
Triton X-100	Sigma, Almanya
Hoechst 33342	ThermoFisher, ABD
BSA (Bovine Serum Albumin)	Cell Signalling, Danvers, ABD
Yağsız kuru süt	Cell Signalling, Danvers, ABD
SDS	BioChemica Applicham, Almanya
Anneksin V	Fluos, Roche ABD
Bax Birincil Antikor	Cell Signalling, ABD
Kaspaz 3/7 Birincil Antikor	Cell Signalling, ABD
GAPDH Bax Birincil Antikor	Cell Signalling, ABD
DMEM-F12	ThermoFisher, ABD

3.1.2. Kullanılan Sarf Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan sarf maddeler Çizelge 3'te verilmiştir.

Çizelge 3. Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi

Sarf Malzeme Adı	Menşe
25cm^2'lik flask	ThermoFisher, ABD
75cm^2'lik flask	ThermoFisher, ABD
96 kuyulu plate	ThermoFisher, ABD
6 kuyulu plate	ThermoFisher, ABD
96 kuyulu beyaz hücre kültür kabı	ThermoFisher, ABD
5ml enjektör	Genject, Türkiye

Çizelge 3. Çalışmada kullanılan sarf malzemelerin listesi (devam)

10ml enjektör	Genject, Türkiye
15 ml'lik steril santrifüj tüpleri	ThermoFisher, ABD
50 ml'lik steril santrifüj tüpleri	ThermoFisher, ABD
10 ml hacimli serolojik pipet	ThermoFisher, ABD
25 ml hacimli serolojik pipet	ThermoFisher, ABD
10 µl'lik pipet uçları	SSIBIO, ABD
200 µl'lik pipet uçları	SSIBIO, ABD
1000 µl'lik pipet uçları	SSIBIO, ABD
0,2 mikron Steril tek kullanımlık filtreler	SSIBIO, ABD
2 ml'lik cam pastör pipetler	Isolab, Almanya
Kriyovial	ThermoFisher, ABD
5 ml'lik Kombi tip pipet ucu	ThermoFisher, ABD
1 ml'lik Kombi tip pipet ucu	ThermoFisher, ABD
Otoklavlanabilir cam şişe	Isolab, Almanya
Thoma lamı	Hausser Scientific Horsham, PA, USA

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 4'te verilmiştir.

Çizelge 4. Çalışmada kullanılan cihazların listesi

Cihaz Adı	**Menşe**
Steril kabin	ESCO, Singapur
CO_2 inkübatörü	Sanyo, Japonya
Inverted mikroskop	Olympus CKX41, Japonya
Santrifüj	Rotina 35R, Almanya
Saf su cihazı	Direct-Q 3 UV, Merck, Almanya
Hassas terazi	SHIMADZU AUW220D, Japonya
Aspiratör	Rocker 300, Tayvan
Spektrofotometre (FLASHScan S12)	Analytik Jena, Almanya
Luminometre (FL×800 Mikroplate)	Biotek, ABD

Çizelge 4. Çalışmada kullanılan cihazların listesi (devam)

Muse Cell Analyzer	Merck, Almanya
Görüntüleme cihazı (Fusion FX-7)	Vilber Lourmat, Fransa
qRT-PCR sistemi (StepOne Plus)	Applied Biosystems, Singapur
Mikroplaka çalkalayıcı	Heidolph, Almanya
Buharlı sterilizatör (Otoklav)	Nüve OT4060, Türkiye
10µl, 100µl ve 1000µl'lik pipet seti	Orange Scientific, Belçika
0,5-5ml pipet	Brand, Almanya
10ml pipet	Eppendorf, Almanya
Microspin, mini-santrifüf/vorteks	FV-2400, Biosan, Letonya
Multipipet cihazı	Hamburg, Almanya
Kuru hava sterilizatörü	Elektro-mag M 420, Türkiye
Otomatik Pipetör	ISO fill
20-200µl Transferpipet	Brand, Almanya
Mini santrifüj	Scan Speed, ABD
Güç kaynağı 300 Plus 300V	Labnet, ABD
Isı bloğu	TDB120, Biosan, Letonya
Manyetik mini-karıştırıcı	HI190M, Hanna Instruments, ABD

3.1.4. Kullanılan Kitler

Tez çalışmasında kullanılan kitler Çizelge 5'te verilmiştir.

Çizelge 5. Çalışmada kullanılan kitlerin listesi

Kit Adı	**Menşe**
ATP bioluminescent somatic cell assay kit	Sigma, Almanya
Caspase-Glo 3/7 Assay System	Promega, ABD
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher, ABD
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	ThermoFisher, ABD
RNA İzolasyon Kiti	ThermoFisher, ABD
Kaspaz 3/7 Enzim Aktivasyon Kiti	Promega, ABD
Andy Fluor 488 Anneksin V Kiti	ABP Biosciences, ABD

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre Kültürü

3.2.1.1. Çalışmada Kullanılan Hücre Soyu

Çeşitli hücre tiplerinin uygun fizyolojik ve biyokimyasal koşullarda büyütülerek çoğalmasının sağlandığı teknikler hücre kültürü olarak ifade edilir. Bu sayede temel hücre biyolojisi, ilaç araştırmaları, toksisite çalışmaları ve genetik manipülasyonlar dahil oldukça geniş yelpazede uygulama alanına sahiptir (Segeritz ve Vallier, 2017). Bu amaçla çalışmamızda A549 insan akciğer kanser hücre soyu kullanıldı. Kullanılan bu hücre soyu epitelyal karakterli ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri adenokarsinoma fenotipine sahip hücrelerdir.

3.2.1.2. Kullanılan İlaçların Hazırlanması

Kullanılan kemoterapötik bir ajan olan PTX ’in (BioVision, Katalog No: 1567) stok çözeltisi dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlandı ve bu stok çözeltiler -20°C'de saklanmak üzere muhafaza edildi. Daha sonra PTX’in farklı konsantrasyonları (15,93-0,002 μM) besiyeri ortamında çözünerek kullanıldı. PTX’ in ileri analizlerde kullanılan dozunu belirlemek için farklı konsantrasyonlarda ilaç yanıt hesabı yapıldı ve DMSO oranı en yüksek konsantrasyonda %0,01'i olacak şekilde kullanıldı.

3.2.1.3. Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması

A549 hücre soyu RPMI 1640 besiyeri içerisinde kültüre edilmiştir. Ayrıca besiyer içerisine %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10 000 U/ml penisilin, 10mg/ml streptomisin), %1 L-glutamin ve %10 Fetal Bovine Serum eklenmiştir.

3.2.1.4. Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması

-80°C’de özel örnek saklama tüplerinde bulunan hücreler sıcak su banyosunda hızlıca çözülerek %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI-1640 besiyeri içerisine alındı. Santrifüj tüplerine aktarılan hücre süspansiyonu 800xg’de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatantı atılarak peleti kullanıldı. Hücre peleti 5 ml ilgili besiyeri içerisinde 25 cm^2’lik flasklar içerisine alınarak 37ºC’de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edildi.

3.2.1.5. Hücre Soylarının Pasajlanması

Hücre kültür kabının %85 yüzey alanını kapladıktan sonra kültür kabı içerisindeki besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. 5ml 1x PBS ile hücrelerin yüzeylerinin hafifçe yıkanması sağlandıktan sonra 0,5ml %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu eklenerek hücreler 37 ºC'de, %5 CO_2'li ortamda 5dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin yüzey alanıyla bağlantılarının koptuğu gözlenince tüm sıvı ortam toplandı ve hacminin 5 katı besiyeri ile sulandırıldı. 800rpm'de 5dk santrifüj sonrasında pelet 10 ml besiyeriyle tekrar sulandırılarak 75cm^2'lik flasklara alındı. Ve 37ºC'de, %5 CO_2 içeren ortamda inkübasyona bırakıldı. Bu metodoloji tekrarlanarak hücreler yapılacak analizlere uygun sayıya gelene kadar çoğalmaları sağlandı.

3.2.1.6. Hücre Soylarının Stoklanması

Hücreler kültür kabının yüzeyinin yaklaşık %85'ine yayıldıktan sonra metot 3.2.1.5'te anlatıldığı gibi %0,05 Tripsin-EDTA solüsyonu ile kaldırıldı. 800rpm'de 5dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve pelet %20 FBS, %5 DMSO içeren DMEM-F12 içerisine alınarak özel dondurucu tüplerde -80ºC ultra dondurucu dolaplara kaldırıldı.

3.2.1.7. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücreler tripsin aşamasıyla tek hücre süspansiyonu haline getirildikten sonra 10 µl hücre süspansiyonu 10 µl %0,5 tripan mavisi ile karıştırıldı. Hemositometrenin her iki alanına 10 µl boyanan hücreler eklenerek lamel ile kapatılarak en az 5 alan olacak şekilde sayıldı.

3.2.2. Büyüme Oranı Analiziyle PTX Konsantrasyonunun Belirlenmesi

NCI ("National Cancer Institute"/Ulusal Kanser Enstitüsü)'nın in vitro sitotoksisite tarama çalışmalarındaki yaklaşımı esas alınarak, PTX'in A549 hücrelerinde büyüme oranı ("Growth Rate") üzerine etkisi SRB ve ATP canlılık testleri kullanılarak değerlendirildi. Bu yaklaşım kapsamında, canlılık testlerine göre sitotoksik, sitostatik veya antiproliferatif etkileri değerlendirmek üzere LC_{80}, LC_{50}, TGI_{50} ve GI_{50} parametreleri hesaplandı (Şekil 14) (Hafner ve ark., 2016; Shoemaker, 2006).

Bu amaçla, A549 hücreleri $3,5\times10^3$ hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyulu hücre kültür kaplarına ekildikten 24 saat sonra, henüz PTX uygulanmamış hücrelerin absorbansı (SRB

canlılık analizi) ve RLU (rölatif ışık ünitesi) (ATP canlılık analizi) değerleri elde edildi (Time zero, Tz). Ardından, hücreler PTX'in farklı konsantrasyonları ile muamele edilerek 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Tedavi süresi sonunda, PTX uygulanmış (Tα) ve/veya uygulanmamış (C) hücrelerin absorbans (SRB) ve RLU (ATP) değerleri elde edilerek LC_{80}, LC_{50}, TGI_{50} ve GI_{50} parametreleri hesaplandı.

Tz: Başlangıçtaki hücre popülasyonundan (henüz tedavi almamış, 0 µM) elde edilen absorbans ve/veya RLU değerini ifade etmektedir (Şekil 14).

Tα: İnkübasyon süresi sonunda PTX uygulanmış hücrelerden elde edilen absorbans ve/veya RLU değerini ifade etmektedir (Şekil 14).

C: İnkübasyon süresi sonunda PTX uygulanmamış hücrelerden elde edilen absorbans ve/veya RLU değerini ifade etmektedir (Şekil 14).

LC_{50} ("50% lethal concentration"): İlaç/ajan ile inkübasyon sonrasında, başlangıç hücre sayısını (Tz) %50 oranında azaltan (sitotoksik etki) konsantrasyonu ifade etmektedir (Şekil 14).

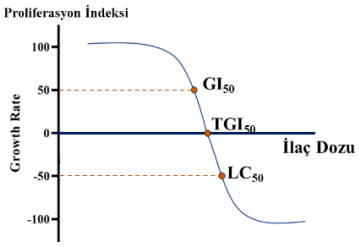
TGI ("total growth inhibition"): İlaç/ajan ile inkübasyon sonrasında, total büyüme inhibisyonuna (sitostatik etki) yol açan konsantrasyonu ifade etmektedir (Şekil 14).

GI_{50} ("50% growth inhibition"): İlaç/ajan ile inkübasyon sonrasında, uygulama almamış hücrelerin (C) proliferasyonunu %50 oranında azaltan (antiproliferatif etki) konsantrasyonu ifade etmektedir (Şekil 14).

$$T_\alpha \geq T_z,\ \frac{(T_\alpha - Tz)}{C - T_z} * 100 \qquad GI_{50},\ 50 = \frac{(T_\alpha - Tz)}{C - T_z} * 100$$

$$TGI_{50},\ 0 = \frac{(T_\alpha - Tz)}{C - T_z} * 100$$

$$T_\alpha < T_z,\ \frac{(T_\alpha - Tz)}{T_z} * 100 \qquad LC_{50},\ -50 = \frac{(T_\alpha - Tz)}{T_z} * 100$$



Şekil 14. Doz yanıt eğrilerinin matematiksel olarak belirlenmesi (Hafner ve ark., 2016).

3.2.2.1. SRB (Sulforhadamine B) Canlılık Metodu

Hücre kültürü çalışmalarında birçok hücre canlılık analiz yöntemi bulunmaktadır. SRB canlılık analizi de hücrelerdeki toplam protein seviyelerinin ölçümüne dayanmaktadır. Bu yöntem uzun züredir NCI'ın çalıştığı ucuz, pratik ve hızlı bir şekilde anti-kanser ilaç araştırmalarında kullanılabilen elverişli bir yöntemdir. SRB zayıf asidik ortamda proteinleri bağlayan anyonik bir boyadır. Ve zayıf bazik ortamda proteinlerden ayrılarak 560 ve 580 nm absorbanslarda ölçülebilen bir renk değişimi sağlar. Hücreler, 96 kuyulu hücre kültür kabının içerisine son hacim 200 µl medium (RPMI 1640) içinde 5000 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Kör (Negatif Kontrol) için kullanılacak kuyulara ise 200 µl besiyeri eklendi. Uygun doz seçimi yapabilmek amacıyla SRB testi için, PTX'in farklı konsantrasyonları (15,93-0,002 µM) hücre besiyerinde hazırlanarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarına uygulandı. A549 hücreleri sayılarak 100 µl besiyeri içerisinde 5000 hücre olacak şekilde her bir kuyuya ilave edildi. Hücrelerde, ölümün negatif kontrolü (maksimum canlılık) olarak sadece besiyeri ortamı içerisinde ekilen hücreler kullanıldı. Kör için ayrılan kuyular içerisine ise 200 µl besiyeri ilave edildi. Ardından hücreler, 24 saat 37°C, %5 CO_2'li ortamda inkübasyona bırakıldı. Tedavi süresi sonunda hücresel proteinleri fikse etmek için, her kuyuya 50 µl TCA eklendi. Ve +4ºC'de 1 saat fikse edildi. Fiksasyon süresi sonunda 96 kuyulu hücre kültür kabı ters çevrilerek TCA döküldü. TCA'yı uzaklaştırmak için kuyular 5 kez, deiyonze su ile yıkandı. Her yıkamanın sonunda 96 kuyulu hücre kültür kabı ters çevrilerek döküldü. Yıkama sonunda SRB solüsyonundan her kuyuya 50 µl eklendi ve 30 dakika oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda SRB 96 kuyulu hücre kültür kabından dökülerek uzaklaştırıldı. Bağlanmış, boyayı uzaklaştırmak için kuyular 5 kez %1'lik asetik asitle yıkandı. Her yıkamanın sonunda hücre kültür kabı ters çevrilerek döküldü. Yıkama sonunda hücre kültür kabı, kuyular içerisinde hiç damla kalmayacak şekilde havada kurutulduktan sonra proteinlere bağlanan boyanın çözünebilmesi için, 10 mM tris bazı (150 µl/kuyu) eklendi. Boya solüsyonunu homojenize hale getirmek için, kültür kabı en az 10 dk. 150 rpm'de plate çalkalayıcısında inkübe edildi. Mikroplaka spektrofotometre cihazında (Biotek, ABD) 564 nm dalga boyunda okuma yapılarak büyüme eğrisi (Şekil 14) hesaplamaları için gerekli absorbans değerleri elde edildi. Deney içerisinde her bir konsantrasyon birbirinden bağımsız üç farklı kuyuda tekrarlandı.

SRB Metodu İçin Kimyasalların Hazırlanması:

-%10 (w/v) TCA: 10 gram TCA, 100 ml deiyonize su ile 100 ml ye tamamlandı.

-%1 Asetik asit çözeltisi: 1ml asetik asit 99ml su ile hazırlanarak %1'lik asetik asit çözeltisi elde edildi.

- %0,4 (w/v) SRB: 400 mg SRB boyası tartılarak %1'lik asetik asit içinde hazırlandı.

-10 mM Tris baz: 121 mg tris bazı 100 ml deiyonize su ile tamamlanarak, 10 mM pH: 10.0 tris bazı elde edildi.

3.2.2.2. ATP (Adenozin Trifosfat) Canlılık Metodu

ATP yöntemi lüminesans bazlı metodolojiye bağlı olarak in vitro sitotoksite ölçümleri açısından SRB yöntemine göre çok daha hassas ve güvenilir olarak yapılabilmektedir. Hücre içerisindeki en önemli enerji deposu olan ATP; biyolojik sentez, sinyal iletimi, taşıma, hareket gibi önemli süreçler için kullanılmaktadır. Hücresel ATP hücre canlılığını ölçmede en hassas uç noktadır. Bu yöntemin prensibi hücre kültüründe büyütülen kanser veya normal hücrelerdeki intraselüler ATP içeriğinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. İntrasellüler ATP içeriğinin seviyesi yaşayan hücrelerin sayısının belirlenmesinde kullanılan bir göstergedir (Ulukaya ve ark., 2008). Kemoterapötik ajanlar veya mitokondriyal toksinler ile muamele sonucu hücrelerde ATP seviyesi önemli ölçüde azalmaktadır. ATP yöntemi; lüsiferinin Mg^{+2} ve ATP varlığında lüsiferaz enzimi ile oksilüsiferine katalize olup lüminesans sinyal oluşturmasına dayanmaktadır. Lüminesans sinyal ve ATP konsantrasyonu veya hücre sayısı arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Ulukaya ve ark., 2008).

Bu amaçla, A549 hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra PTX ise 200 µl besiyeri içinde 15,93 µM dozundan azalan dozlara doğru (15,93-0,002 µM) 96 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37°C'de %5'lik CO_2'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Negatif kontrol (maksimum canlılık, tedavi edilmemiş hücre kontrolü) için 100 µl besiyeri içerisine 100 µl 5×10^3 hücre ekildi. Toplamda 24 saatlik inkübasyon sonrasında intraselüler ATP içeriği ATP kiti kullanılarak belirlendi. İlk olarak 96 kuyulu hücre kültür kaplarındaki her kuyudan 150 µl atıldı. ATP kitinin içerisindeki hücre lizis tamponundan 50 µl her kuyuya ilave edildi ve böylece hücre içerisindeki

ATP'nin dışarı çıkması sağlandı. 20 dakikalık bekleme süresinin ardından hücre kültür süspansiyonundan 50 µl beyaz renkli 96 kuyulu hücre kültür kaplarına aktarıldı. Ardından her kuyuya 50 µl/kuyucuk lusiferin-lusiferaz enzimi içeren solüsyon ilave edildi. Elde edilen ATP miktarı lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (FL×800 Mikroplate Floresan Okuyucu) kullanılarak ölçüldü. Elde edilen RLU değerleri büyüme eğrisi hesaplamaları için kullanıldı.

3.2.3. Anastatik Hücrelerin Elde Edilmesi ve Doğrulanması

Anastazis, belirli durumlarda ölüm sürecinde olan hücrelerin, uyaran çıkarıldıktan sonra hücre intihar sürecini durdurup hayata dönmelerini ifade etmektedir (Tang ve ark., 2012). Bu dönüşüm apoptozisin geri dönülmez noktası olarak bilinen kaspaz aktivasyonundan sonra bile gerçekleşebilmektedir. Anastatik hücrelerin elde edilmesi için ilk olarak büyüme eğrisi analizleri sonucu belirlenen PTX konsantrasyonunun hangi zaman aralığında apoptozisi uyardığı kaspaz3/7 enzim aktivitesine bağlı olarak belirlendi. Akış sitometri analiziyle kaspaz3/7 pozitif apoptotik hücre popülasyonunun oranı ölçüldü. Apoptotik indüksiyona neden olan PTX uygulaması sonucu diğer apoptotik belirteçler olan fosfatidilserinler Anneksin-V boyasıyla ve piknotik nukleus morfolojileri ise hoechst boyası kullanılarak floresan mikroskop altında incelendi. Ayrıca fosfatidilserin pozitif hücre yoğunluğu florometrik mikroplaka okuyucuyla ölçülerek apoptotik hücre yoğunluğu kantitatif olarak doğrulandı.

3.2.3.1. PTX Sonrası Kaspaz 3/7 Enzim Aktivasyonun Zamana Bağlı Belirlenmesi

Bu amaçla, A549 hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra PTX ise 200 µl besiyeri içinde 15,93 µM dozundan azalan dozlara doğru (15,93-0,002 µM) 96 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37°C'de %5'lik CO_2'li etüvde inkübasyona bırakıldı. PTX uygulamasından 0, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28. saatler sonrasında hücre içi kaspaz 3/7 aktivitesi luminometrik olarak ölçüldü. Bu sayede PTX uygulaması sonrasında hangi zaman aralığında apoptozisin uyarıldığı belirlendi.

Kaspaz 3/7 aktivite analizi için "Caspase-Glo 3/7 Assay System" kiti kullanıldı. Kit içerisindeki liyofilize haldeki kaspaz substratı yine kit içerisinde bulunan 10ml tampon çözelti içerisinde çözülerek kaspaz 3/7 çözeltisi oluşturuldu. Tedavi süresi sonrasında kültür ortamındaki tümör hücreleri üzerine 50 µl hazırlanan kaspaz 3/7 çözeltisinden eklenerek 30dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivitesine orantılı olarak gerçekleşen ışıma miktarı luminometrik okuyucuyla RLU birimi olarak ölçüldü.

3.2.3.2. Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Akış Sitometri Yöntemiyle Ölçülmesi

Akış sitometrisi, belirli floresan prob etiketli hücrelerin bir lazer ışınından geçerken yaydıkları ışık saçılması ve floresan emisyonu ilkesi üzerinde çalışan karmaşık bir tekniktir. Parçacıklar lazer kesişme noktasından geçerken ışık saçılır ve florokrom parçacığının varlığında floresan ışığı yayar. Tek hücre düzeyinde hücre popülasyonlarının hızlı, nispeten nicel, çok parametreli analizine izin verdiği için benzersiz avantajlar sunar. Ayrıca, alt popülasyonları farklı parametrelere göre ayırmak için hücrelerin fiziksel olarak sıralanmasını da sağlar.

Kaspaz 3/7 aktivitesine sahip hücre popülasyonunun oranı hakkında daha detaylı bilgi elde etmek için kaspaz 3/7 aktivitesi akış sitometrisi ile değerlendirilmiştir. Bunun için A549 hücreleri, 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyu başına 100×10^3 hücre olacak şekilde ekildi ve 24 saat boyunca 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda kültüre edildi. Daha sonra PTX' in belirlenen maksimum toksik dozu 24 saat boyunca muamele edildi. Tedavi süresi sonunda 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki besiyeri aspire edildi. Hücreleri serumdan uzaklaştırmak amacıyla kuyular 2 ml 1x PBS (Gibco) ilave edilerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS ortamdan aspire edilerek uzaklaştırıldıktan sonra yüzeye yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları için 0,5 ml %0,05 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu kullanıldı ve hücreler 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda 5 dk inkübe edildi. 6 kuyulu hücre kültür kapları içerisindeki hücre süspansiyonu, içerisinde besiyeri bulunan 15ml'lik falkon tüp içerisine alındı. 800 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldıktan sonra süpernatant kısım aspire edildi ve 1 ml'sinde 2×10^4-5×10^5 hücre olacak şekilde hücre peleti sulandırıldı. Tedavi gruplarını içeren etiketli santrifüj tüplerine hücre süspansiyonundan 50 µl eklendi. Daha sonra kit içerisinde bulunan kaspaz3/7 çalışma solüsyonundan her bir tedavi

grubunu içeren ependorflara 5 µl konuldu. Kısa bir pipetaj işleminin ardından örnekler 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda santrifüj tüpleri içerisinde hücre süspansiyonlarına 150 µl DNA'ya bağlanabilen 7-AAD eklenerek vorteks yapıldıktan sonra oda sıcaklığından karanlıkta 5 dk inkübasyona bırakıldı. Son olarak Muse Cell Analyzer (Millipore, Hayward, CA, ABD) cihazında hücrelerde kaspaz $3/7^+$ ve kaspaz $3/7^-$ aktivasyonunun kantitatif olarak ölçümü yapıldı.

3.2.3.3. Piknotik Nükleusların Floresan Boyama Yöntemiyle Görüntülenmesi

Apoptozis, hücre çekirdeğinde piknoz, fosfatidilserin translokasyonu ve hücre küçülmesi dahil olmak üzere spesifik ve aşamaya bağlı morfolojik değişikliklerle sonuçlanır. Apoptotik süreçlerin deneysel araştırması hala zorludur ve rutin olarak kromatin parçalanması ve kaspaz enzim aktivitesi gibi moleküler olayların değerlendirilmesine dayanmaktadır. Alternatif olarak, floresan mikroskobu altında belli floresan problarla nükleer morfoloji analizi yapılarak apoptotik kaskadların tespiti ve nicelenmesi basit, sağlam ve düşük maliyetli bir yöntem sağlamaktadır.

Piknoz ile, çekirdek yoğun ve kompakt hale gelir ve parçalanmaya (karyoreksis) başlar ve bu da parlak lekeli nükleer kromatin küreleri ile sonuçlanır. Bu nedenle, piknotik hücreler, bir veya daha fazla, değişken boyutlu, yoğun, yuvarlak, parlak nükleer fragmanları olan sağlam bir sitoplazmik zara sahiptir. Hücrelerdeki nukleus morfolojisi Hoechst 33342 (ThermoFisher, 62249) floresan boyası kullanılarak belirlendi. Hoechst 33342 (2'-[4-etoksifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5'-bi-1H-benzimidazol trihidroklorür trihidrat), ultraviyole ışıkla uyarılan hücre geçirgen bir DNA boyasıdır. Floresan mikroskop altında 460 ila 490 nm'de mavi floresan ışık yayar. Hoechst 33342, DNA'nın küçük oluğuna ve tercihen adenin-timin (AT) bölgelerine bağlanır. Bu bağlanma özellikle apoptotik nukleusların morfolojisini ve kompakt kromatinini ayırt etmek için hızlı ve basit bir çözüm sağlamaktadır. Hücreler eş zamanlı olarak Anneksin-V-Fluorescein (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidyum iyodür (kırmızı floresan) ile boyanır. Canlı hücreler; FITC-/PI-, erken apoptotik hücreler; FITC+/PI- ve geç apoptotik veya nekrotik hücreler; FITC+/PI+ boyanırlar ve bu şekilde birbirlerinden ayırt edilirler (Çizelge 6) (Güleş ve Eren, 2008; Ulukaya ve ark., 2011).

Çizelge 6. Erken, geç apoptozis ve nekrotik hücrelerin gösterimi

	Erken Apoptotik Hücreler	Geç Apoptotik Hücreler	Nekrotik Hücreler	Kontrol Hücreleri
Hoechst	+	+	+	+
Anneksin V	+	+	-	-
PI	-	+	+	-

Bu tez çalışmasında da Hoechst boyasına ek olarak Anneksin-V ve PI boyaları kullanılarak hücreler eş zamanlı olarak boyanmıştır. A549 hücreleri 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 100 µl içerisinde 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. PTX 200 µl besiyeri içinde belirlenen konsantrasyonunda 96 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37°C'de %5'lik CO_2 içeren şartlandırılmış ortama sahip inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki besiyeri uzaklaştırıldı. Bölüm 3.2.3.4'te açıklanan Anneksin-V kiti içerisinde bulunan tampon çözeltide son konsantrasyon 5µg/ml olacak şekilde Hoechst 33342 boya çözeltisi hazırlandı. A549 hücreleri boya solüsyonundan 20µl eklenerek 15 dakika karanlıkta inkübasyon sonrasında 361⁄497 dalga boyu aralığına sahip floresan mikroskop altında incelendi.

3.2.3.4. Fosfatidilserinlerin Floresan Boyama Yöntemiyle Görüntülenmesi ve Kantitatif Olarak Ölçümü

Anneksin V'nin floresan konjugatları, apoptotik hücreleri tanımlamak için yaygın olarak kullanılır. İnsan vasküler antikoagülan Anneksin V, anyonik fosfolipid fosfatidilserin (PS) için yüksek bir afiniteye sahip olan 35-36 kDa ağırlığında Ca^{+2} bağımlı bir fosfolipid bağlayıcı proteindir. Normal sağlıklı hücrelerde PS, Flippaz adı verilen ATP'ye bağlı bir enzim tarafından plazma zarının sitoplazmik yüzeyinde tutulur. Flippazlar üzerinde bulunan kaspaz bağlanma alanları apoptozis sırasında aktive olan kaspaz 3/7 tarafından tanınması sonrasında flippaz fonksiyonları etkisiz hale gelir. Flippazların fonksiyon kaybı PS'lerin hücre membranının dış yüzeyine transloke olmasıyla sonuçlanır. Bu mekanizma makrofajlar için beni ye (eat me) sinyalini oluşturarak apoptotik hücreleri fagositoz için işaretleyerek yutulmalarını sağlar.

Bu tez çalışmasında apoptozis sırasında kaspaz aktivasyonu sonrası gerçekleşen PS translokasyonunu saptamak için Andy Fluor 488 Anneksin V kiti (ABP Biosciences, Rockville ABD) kullanılmıştır. Hücreler 3.2.3.3' de açıklandığı gibi 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilerek PTX'in 500 nM konsantrasyonu uygulanmıştır. Kit içerisinden çıkan tampon çözelti içerisinde 1x olacak şekilde Anneksin-V boyası ve 1µg/ml konsantrasyonunda PI boyası hazırlandı. Ek olarak 3.2.3.3'te açıklandığı gibi 5 µg/ml Hoechst 33342 boyasıda eklenmiştir. Tüm kuyulara boya solüsyonu eklenerek floresan mikroskop altında inceleme yapılmıştır. Ayrıca 495/520 nm dalga boyna sahip florometre mikro plaka okuyucu kullanılarak zamana bağlı Anneksin-V pozitif hücre yoğunluğu belirlenmiştir.

3.2.4. Anastatik Hücre Dönüşümünün Doğrulanması

A549 hücrelerinde apoptozisi uyaran PTX konsantrasyonu ve zamanı belirlendikten sonra bu uyaranın ortamdan kaldırılmasıyla anastatik hücre dönüşümü incelenmiştir. Anastasis temel olarak apoptotik uyaran sonrası hücre ölümünün başarılı bir şekilde üstesinden gelinmesidir. Ölüm sürecinde olan hücrelerin, uyaran gittikten sonra hücre intihar sürecini durdurup hayata dönmeleri apoptotik mekanizmada görevli faktörlerin etkisizleşmesi veya zamana bağlı etkilerinin azalmasıyla gerçekleşmektedir. Bu nedenle PTX'in ortamdan uzaklaştırılması sonrasında belli saat aralıklarında (0, 3, 6, 12, 24) hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivasyonu ve Anneksin-V durumları incelenmiştir.

3.2.4.1. Anastatik Hücrelerdeki Aktif-Kaspaz 3/7 Seviyelerinin İncelenmesi

A549 hücreleri 24 kuyulu hücre kültür kaplarına 250 µl içerisinde 2×10^4 hücre/kuyu olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. PTX 250 µl besiyeri içinde 500 nM konsantrasyonunda 24 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37°C'de %5'lik CO_2 içeren şartlandırılmış ortama sahip inkübatörde 20 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki PTX uzaklaştırıldı ve tedavi kuyularına 500 µl taze besiyeri eklendi. Anastatik hücre evrelerini görmek amacıyla taze besiyeri eklenmesini takip eden 0, 3, 6, 12, 24. Saatlerde 3.2.3.1'de açıklandığı gibi hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivitesi ölçüldü.

3.2.4.2. Anastatik Hücrelerdeki Anneksin-V Seviyelerinin İncelenmesi

A549 hücreleri 96 kuyulu hücre kültür kaplarına 100 µl içerisinde 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde (3 tekrarlı) ekim yapıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. PTX 200 µl besiyeri içinde 500 nM konsantrasyonunda 96 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37°C'de %5'lik CO_2 içeren şartlandırılmış ortama sahip inkübatörde 20 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki PTX uzaklaştırıldı ve tedavi kuyularına 500 µl taze besiyeri eklendi. Anastatik hücre evrelerini görmek amacıyla taze besiyeri eklenmesini takip eden 0, 3, 6, 12, 24. saatlerde 3.2.3.4'te açıklandığı gibi hücrelerdeki Anneksin-V durumları değerlendirildi.

3.2.5. Anastazis Mekanizmasının Moleküler Süreçlerinin Protein ve Gen Seviyesinde İncelenmesi

A549 hücreleri 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1 ml içerisinde 150×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde (6 tekrarlı) ekim yapıldı ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. PTX 1 ml besiyeri içinde 500 nM konsantrasyonunda 6 kuyulu hücre kültür kaplarında bulunan hücrelere uygulandı ve hücreler 37°C'de %5'lik CO_2 içeren şartlandırılmış ortama sahip inkübatörde 20 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrasında 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarındaki PTX uzaklaştırıldı ve tedavi kuyularına 2 ml taze besiyeri eklendi.

Erken ve geç anastatik hücre evrelerini görmek amacıyla taze besiyeri eklenmesini takip eden 0, 3, 6, 12, 24. saatlerde hücre kazıyıcılar ("cell scraper") kullanılarak hücreler kuyucukların zemininden kaldırıldı. 800g 5 dakika santrifüj sonrasında tüm örneklere ait hücre pelletleri western blot ve RT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere 2 ayrı tüplere ayrıldı.

3.2.5.1. Western Blot Analizleri

Western blot, araştırmalarda proteinleri ayırmak ve tanımlamak için sıklıkla kullanılır. Bu teknikte bir protein karışımı, jel elektroforezi yoluyla moleküler ağırlığa ve dolayısıyla türüne göre ayrılır. Bu sonuçlar daha sonra her protein için bir bant üreten bir zara aktarılır. Membran daha sonra ilgili proteine özgü etiket antikorları ile inkübe edilir. İşaretli antikorlar HRP substratı içeren ikincil bir antikor inkübasyonundan sonra

kemoluminesans özellikli bir okuyucuda incelenir. Western blot analizleri temel olarak protein izolasyonu, jelde yürütme, jelden membrana aktarım, birincil ve ikincil antikor inkübasyonları sonrası bantların görüntülenmesi olarak belli aşamalarda gerçekleşir.

Protein İzolasyonu: Protein izolasyonları RIPA Lizis tampon sistemi (SantaCruz, Texas ABD) kullanılarak 3.2.5'te açıklandığı gibi western blot analizler için ayrılan hücre pelletlerinde gerçekleştirildi. Her 1 ml lizis tamponu için 15 µl 200 mM fenillmetilsülfonil flüoride (PMSF), 15 µl 100 mM sodyum ortovanadat ve 45 µl proteaz inhibitör karışımı kullanılarak +4°C'de hazırlandı. Hücre pelletleri üzerine 0,05 ml lizis tamponu eklenerek karanlıkta 45 dakika buz üzerinde bekletildi ve bu esnada 10 dakikada bir sonikasyon işlemi gerçekleştirildi. Süre bitiminde solüsyonlar 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı ve +4°C'de <12 000 g'de 20 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatantlar proteaz içermeyen steril 0,5ml'lik tüplere toplandı ve protein miktarları ölçüldü.

Protein Miktar Tayini: Protein miktarları BCA Protein Kit (TermoFisher, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. BCA Protein Testi, alkalin bir ortamda proteinler tarafından Cu^{+2}'nin Cu^{+1}'e indirgenmesi ile bakır katyonunun (Cu^{+1}) bisinkoninik asit (BCA) tarafından oldukça hassas ve seçici kolorimetrik tespiti ile gerçekleşir. Kit içerisinden çıkan BCA tamponu ve Cu^{+2} içeren solüsyon 1:50 oranında hazırlanarak kullanıldı. 190 µl hazırlanan solüsyona 10 µl protein lizatı eklenerek 20 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürsi sonrasında 564nm dalga boyunda mikroplaka spektrofotometre cihazında absorbans değerleri ölçüldü. Ayrıca sığır serum albümini kullanılarak (BSA, bovine serum albümine) 2mg/ml konsantrasyonundan başlayarak logaritmik seyreltmeler oluşturuldu ve protein standardı olarak kullanıldı. Oluşturulan standart eğri grafiğine bağlı $y = m.\ln(x) + b$ denklemine göre protein konsantrasyonları hesaplandı.

Jelde Yürütme ve Membran Transfer İşlemi: Konsantrasyonu ölçülen protein örnekleri jeldeki kuyu başına 20 µg protein gelecek şekilde 4X LDS Sample Buffer ve 10X reducing agent içerisinde hazırlanarak 95°C'de 7 dakika boyunca denatüre edildi. Denatürasyon sonrası 4-12%, Bis-Tris jelin kuyularına yüklenen örnekler elektroforez tankında 200 volt değişken akımda 50 dakika boyunca yürütüldü. Yürütme işlemi sonrası

Iblot kuru transfer sistemi (ThermoFisher, ABD) cihazı kullanılarak nitroselüloz membranlara aktarım gerçekleştirildi.

Birincil, İkincil Antikor Uygulaması ve Bantların Görüntülenmesi: Proteinlerin aktarıldıkları membranlar, %5 BSA içeren 1X TBS-T içerisinde 1:1000 oranında hazırlanan birincil antikorda gece boyunca +4°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında %5 BSA içeren 1X TBS-T içerisinde 1:1000 oranında hazırlanan ikincil antikorla 1 saat inkübasyon sonrasında membranlar Fusion FX kemoluminesans görüntüleme sisteminde (Vilbert, France) görüntülendi. Protein bantalarının kantifikasyonu ve normalizasyonu Image-J yazılımı kullanılarak housekeeping protein olan Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (GAPDH) göre yapıldı.

3.2.5.2. RT-PCR Analizleri

RNA İzolasyonu (>200nt)

RNA izolasyonları 3.2.5.'de açıklandığı gibi RT-PCR analizleri için ayrılan hücre pelletlerinde gerçekleştirildi. Hücre pelleti 1:10 oranında beta-merkaptoetanol içeren 500 µl hücre lizis tamponunda parçalanmaları sağlandı. İzolasyon kolonlarına aktarılan örnekler ≥12 000 g hızda 15 saniye boyunca santrifüj edildi. Yıkama solüsyonu I ve yıkama solüsyonu II eklenmesi sonrasında tekrardan ≥12 000 g hızda 15 saniye boyunca santrifüj edildi. 14 000xg'de 1 dakika santrifüj edilerek arda kalan tamponlar uzaklaştırıldı ve son olarak 40 µl nükleaz içermeyen steril su eklenerek ≥12 000 g hızda 1 dakika santrifüj sonrası saf RNA eldesi sağlanmıştır.

İzolasyon sonrası RNA kalitesi ve konsantrasyon ölçümü qubit florometre cihazında gerçekleştirilmiştir (260/280nm oranı ≅ 2.00).

cDNA Çevrimi

İzolasyonu yapılan RNA'lar yüksek kapasite cDNA ters transkripsyon kiti (ThermoFisher, USA) kullanılarak çift zincir cDNA yapılarına çevrildi. Çevrim için kullanılan solüsyonlar ve çevrim süreci Çizelge 7'de gösterildiği gibi yapıldı.

Çizelge 7. cDNA çevrimi aşamaları

cDNA Çevrimi Bileşenleri	Kullanılacak Hacimler	cDNA Çevrimi			
10✕ RT Buffer	2 µl	25°C 10 dakika	37°C 120 dakika	85°C 5 dakika	4°C ∞
25✕ dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl				
10✕ RT Random Primers	2 µl				
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl				
RNase Inhibitor	1 µl				
Nuclease-free H_2O	3,2 µl				
RNA Örnekleri (500ng)	10 µl				

RT-PCR Aşaması

cDNA çevrimi sonrasında RT-PCR döngüleri power syber green mastermix (ThernoFisher, USA) kullanılarak StepOne Plus RT-PCR cihazında (ThernoFisher, USA) gerçekleştirildi. RT-PCR döngü aşamaları çizelge 7'de açıklandığı gibi gerçekleştirildi.

Çizelge 8. RT-PCR çevrimi aşamaları

RT-PCR Bileşenleri	Kullanılacak Hacim ve Konsantrasyonlar	RT-PCR Çevrimi			
10X Taq buffer	2 µl	İlk Denatürasyon	95°C	3 dakika	1 Çevrim
dNTP Mix, 2 mM	2 µl	Denatürasyon	95°C	30 saniye	30 Çevrim
25 mM MgCl2	1,2 µl	Annealing	***	30 saniye	
Reverse Primer	0,6 µl	Uzama	72°C	60 saniye	
Forward Primer	0,6 µl	Son Uzama	72°C	10 dakika	1 Çevrim
Taq DNA polymerase	0,1 µl				
cDNA	10 pg - 1 µg				
Nuclease-free H_2O	20 µl'ye tamamlanır				

3.2.6. İstatistiksel Analiz

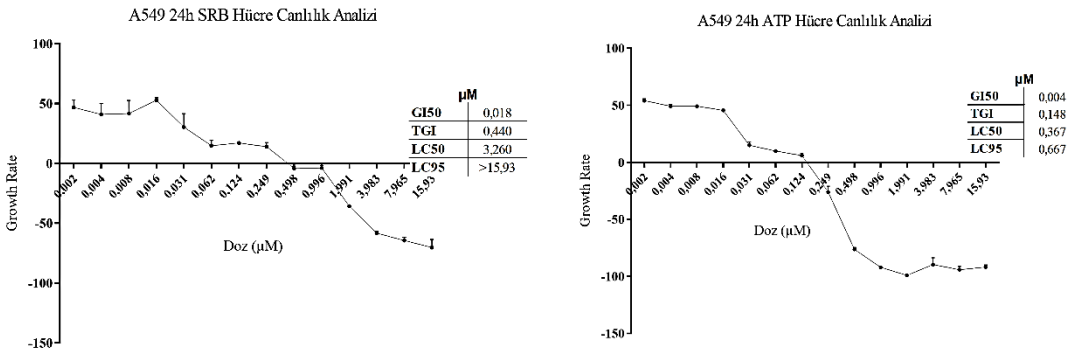
Hücre canlılık analizleri GraphPad programı aracılığı ile görselleştirilmiştir. Tüm deneysel veriler Spss V23 yazılımı kullanılarak çoklu veri analizi ANOVA ile değerlendirildi. 3 tekrarlı yapılan tüm analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ değerine göre belirlendi. Western blot protein bantları İmage-J yazılımı kullanılarak GAPDH kontrol gruplarına göre normalize edilerek kantite edildi. RT-PCR analizlerinde elde edilen CT (cycle threshold value) değerleri StepOnePlus Software V2.3 ile $2^{-\triangle\triangle CT}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. Büyüme Oranı Analizi Sonuçları

A549 hücreleri 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin büyümesi ve bölünme döngülerine girmesi için 24 saat boyunca %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosferli inkübatörlerde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra PTX'in farklı konsantrasyonlarıyla (15,93-0,002 µM) 24 saat boyunca muamele edildi. 24 saatlik uygulama sonrasında SRB ve ATP hücre canlılık analizleriyle alınan veriler metot kısmında açıklandığı gibi büyüme eğrisi analizleriyle hesaplandı.

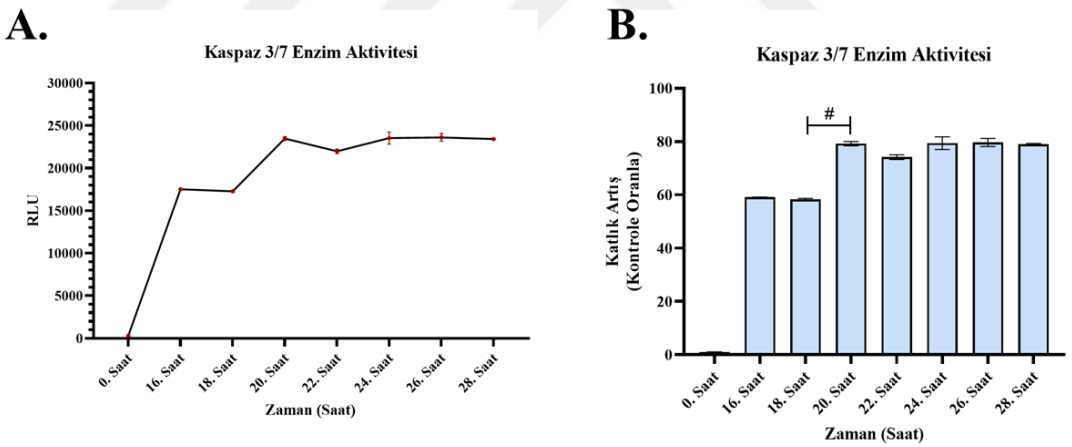
Canlılık sonuçlarına bakıldığında PTX uygulamasından sonra doza bağlı bir şekilde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar gözlenmiştir (Şekil 15). SRB canlılık analizlerinde GI_{50} 0,018 µM, TGI 0,440 µM, LC_{50} konsantrasyonu 3,260 µM ve LC_{80} 15,93 µM'den büyük olarak ölçülmüştür (Şekil 15). ATP canlılık analizlerinde ise bu değerler sırasıyla; 0,004 µM, 0,148 µM, 0,367 µM, 0,508 µM olarak ölçülmüştür (Şekil 15). Elde edilen bulgular sonucunda ATP canlılık analizi referans alınarak, ileri analizlerde LC_{80} konsantrasyonuyla devam edilmiştir.



Şekil 15. Büyüme oranı analizi. PTX uygulaması sonrasında A549 hücre soyunun SRB ve ATP canlılık analizine göre büyüme eğrisi grafiği. Her bir veri noktası 3 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir.

4.2. PTX Sonrası Kaspaz 3/7 Enzim Aktivasyonunun Zamana Bağlı Belirlenmesi

İlk olarak büyüme eğrisi analizleri sonucu LC_{80} olarak belirlenen 500 nM konsantrasyonunun hangi zaman aralığında apoptozisi uyardığı kaspaz3/7 enzim aktivitesinin ölçülmesiyle tanımlandı. Bu amaçla hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin büyümesi ve bölünme döngülerine girmesi için 24 saat boyunca %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosferli inkübatörlerde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrasında 500 nM PTX uygulandı ve 0, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28. saat süre sonunda kaspaz 3/7 aktiviteleri "Caspase-Glo 3/7 Assay System" kiti kullanılarak luminometrik mikro plaka okuyucuda ölçüldü. Enzim aktivite sonuçlarına göre 500 nM PTX uygulaması sonucu zamana bağlı olarak kaspaz 3/7 aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlendi (Şekil 16). Enzim aktivitesi maksimum doygunluk seviyesine 20 saat 500 nM PTX uygulaması sonucu ulaşmıştır. Bu nedenle 500 nM PTX'in uygulamasının 20. saati apoptozis uyarımının zirve yaptığı nokta olarak değerlendirilmiştir.



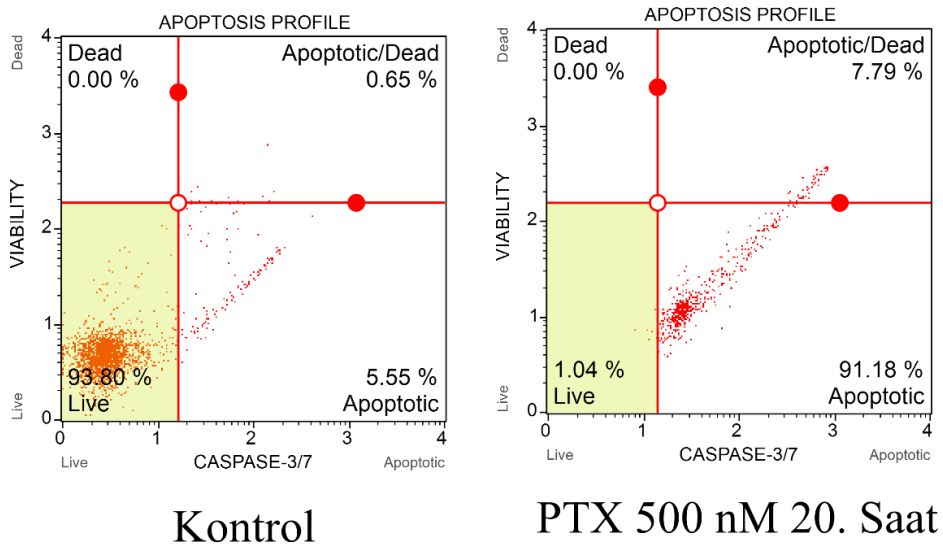
Şekil 16. PTX sonrası kaspaz 3/7 enzim aktivasyonun zamana bağlı değişimi. A. RLU değerlerine bağlı enzim aktivitesi grafiği, B. Enzim aktivitesinin kontrole göre katlık artış grafiği. # istatistiksel olarak anlamlılığı (# :$p < 0{,}001$) ifade etmektedir.

4.3. Apoptoziste Geri Dönülemez Noktanın Belirlenmesi

4.3.1. Akış Sitometri Analizleriyle Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Enzim aktivitesi sonuçlarının daha hassas ve kantitatif olarak ölçülmesi için akış sitometri analizleri gerçekleştirildi. Bu amaçla hücreler 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyu başına $1x10^5$ hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin büyümesi ve bölünme döngülerine girmesi için 24 saat boyunca %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosferli inkübatörlerde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrasında 500 nM PTX, enzim aktivite analizlerinde belirlenen süre olan 20 saat boyunca hücrelere uygulandı.

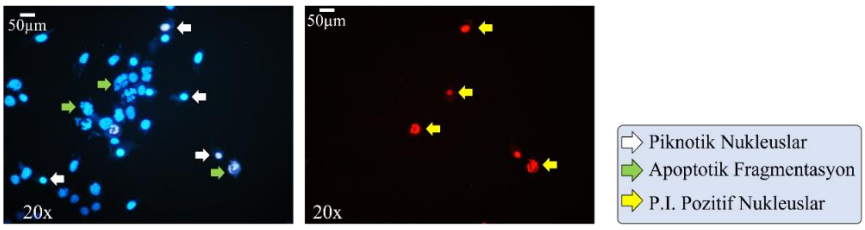
Akış sitometri sonuçlarına göre kontrol örneğinde toplam apoptotik hücre ("Apoptotik/Dead+Apoptotic live") oranının %6,2 olduğu gözlenmiştir. PTX uygulaması sonucunda ise bu oran %98,97 olarak ölçülmüştür. Apoptotic ("live") hücre oranının ise 91,18 olduğu gözlenmiştir. Buna göre, 500 nM PTX konsantrasyonunun 20 saat boyunca A549 hücrelerine uygulanması sonucunda, hücrelerin %98,97'sinde apoptotik hücre ölümünün uyarıldığı belirlenmiştir. Enzim aktivite analizlerinde PTX'in 20 saat uygulanma sonrasında kaspaz 3/7 aktivitesinin maksimum noktaya ulaşması, akış sitometri analizleriyle enzim aktivite analizlerinin uyumlu olduğunu göstermektedir (Şekil 17).



Şekil 17. Apoptotik hücre popülasyonunun akış sitometri yöntemiyle belirlenmesi.

4.4. Apoptotik Uyarımın Floresan Boyama Yöntemiyle Görüntülenmesi

Enzim aktivite ve akış sitometrisi analizleri ile belirlenen konsantrasyon ve zaman aralığında kaspaz 3/7 aktivitesinin pik yaptığı ve toplam hücre popülasyonunun %98,72'sinde apoptotik uyarımın gerçekleştiği gösterilmiştir. Apoptozisin görsel olarak yorumlanması ve doğrulanması amacıyla Hoechst ve PI floresan boyama yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyu başına $5x10^3$ hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin büyümesi ve bölünme döngülerine girmesi için 24 saat boyunca %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosferli inkübatörlerde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrasında 500 nM PTX enzim aktivite analizlerinde belirlenen süre olan 20 saat boyunca hücrelere uygulandı. Uygulama süresi sonunda besiyeri uzaklaştırıldı ve 5µg/ml Hoechst, 1µg/ml PI boyası eklenerek uygun dalga boylarına sahip floresan mikroskop altında görüntüleme yapıldı. Floresan boyama görüntüleri piknotik nuklesuslar, apoptotik fragmentasyon ve P.I. pozitif boyanan hücreler olarak 3 kategoride incelendi (Şekil 18). Apoptozisin morfolojik belirteçleri olan piknotik nükleus ve fragmentasyon varlığı net şekilde görülmüştür. Ayrıca hücrelerin büyük bir kısmında Hoechst boyasının pozitif fakat PI boyasının negatif olarak gözlenmesi erken apoptotik sürecin belirtisi olup kaspaz aktivasyonunu takiben gerçekleşen apoptozisin bir göstergesidir.

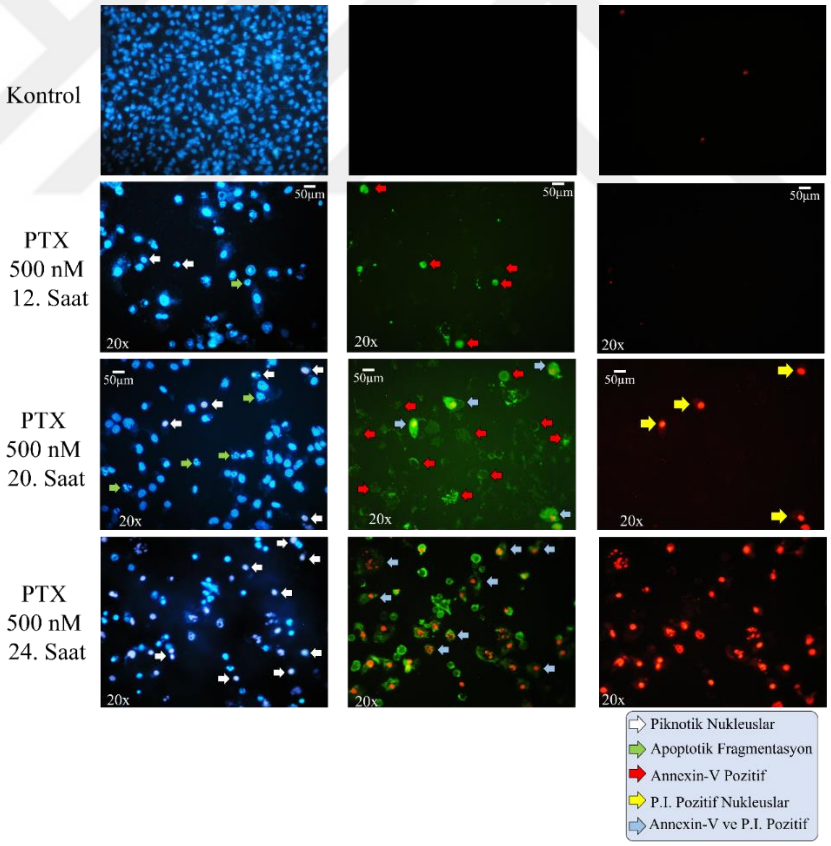


Şekil 18. Piknotik nükleusların floresan boyama yöntemiyle görüntülenmesi. Mikroskobik büyütme 20X.

4.5. Fosfatidilserinlerin Floresan Boyama Yöntemiyle Görüntülenmesi ve Kantitatif Olarak Ölçümü Sonuçları

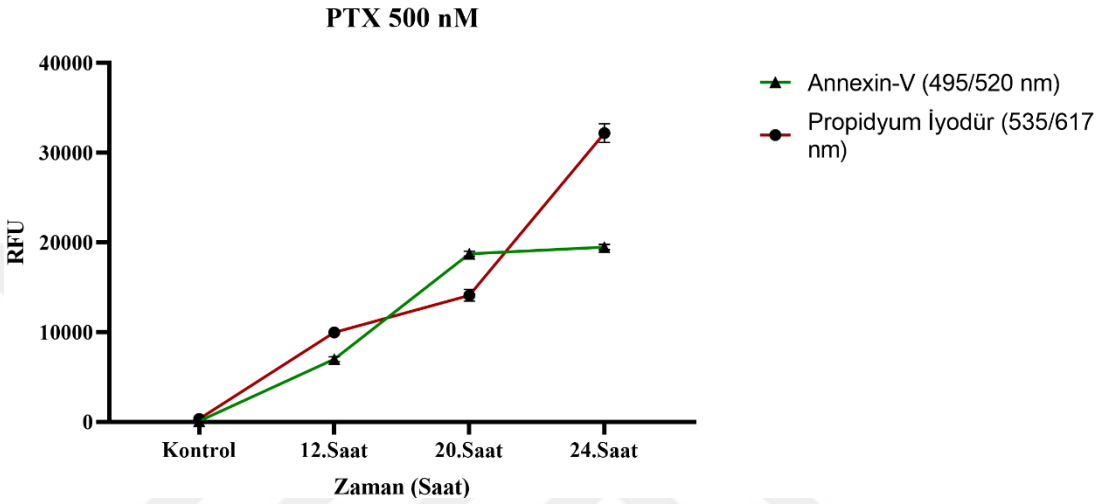
Hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına kuyu başına $5x10^3$ hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin büyümesi ve bölünme döngülerine girmesi için 24 saat boyunca %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosferli inkübatörlerde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrasında 500 nM PTX 12, 20 ve 24 saat boyunca hücrelere

uygulandı. Uygulama süresi sonunda besiyeri uzaklaştırıldı ve Anneksin-V, hoechst ve PI boyaları ortama eklenerek görüntüleme yapıldı. Floresan boyama görüntüleri piknotik nuklesuslar, apoptotik fragmentasyon, PI pozitif boyanan hücreler, Anneksin-V pozitif hücreler ve Anneksin-V/PI pozitif hücreler olarak 5 kategoride incelendi (Şekil 19). PTX uygulaması sonrasında hücrelerde zamana bağlı olarak Anneksin pozitif ve PI pozitif hücre yoğunluğunun arttığı gözlenmiştir. 12 saat uygulamada piknotik nükleuslar ve fragmentasyon oldukça az gözlenmiştir. Buna paralel olarak Anneksin pozitif hücre yoğunluğu oldukça azdır. 20 ve 24 saatlik uygulamalar sonrasında ise Anneksin-V pozitif hücre yoğunluğunda artışlar gözlenmiştir (Şekil 19). Fakat amacımız apoptozisin erken aşamasındaki intakt hücre membran yapısına yani Anneksin-V pozitif olup PI negatif hücrelerin olduğu zamanı tespit etmektir. Mikroplaka florometrik okuyucuda yapılan ölçümlere göre 20. saatte Anneksin-V hücre yoğunluğu maksimum seviyede olmakta ve aynı zamanda PI pozitif hücre yoğunluğu bu saatten sonra artmaktadır.



Şekil 19. Fosfatidilserinlerin floresan boyama yöntemiyle görüntülenmesi. Mikroskobik büyütme 20X.

Boyama ve kantitatif ölçüm sonuçlarına göre 20 saat PTX uygulaması hücrelerde apoptozisi uyardığı ve PI hücre yoğunluğuna bakıldığında ise hücre popülasyonunun çoğunluğunda erken apoptozisin varlığı gözlenmiştir (Şekil 20). Hatta akış sitometrisi sonuçlarında toplam hücre ölümünün %7,79 olduğu, apoptotik/canlı hücrelerin ise %91,18 olması bu sonuçları doğrulamaktadır.



Şekil 20. Floresan boyama sonuçlarının kantitatif olarak ölçülmesi.

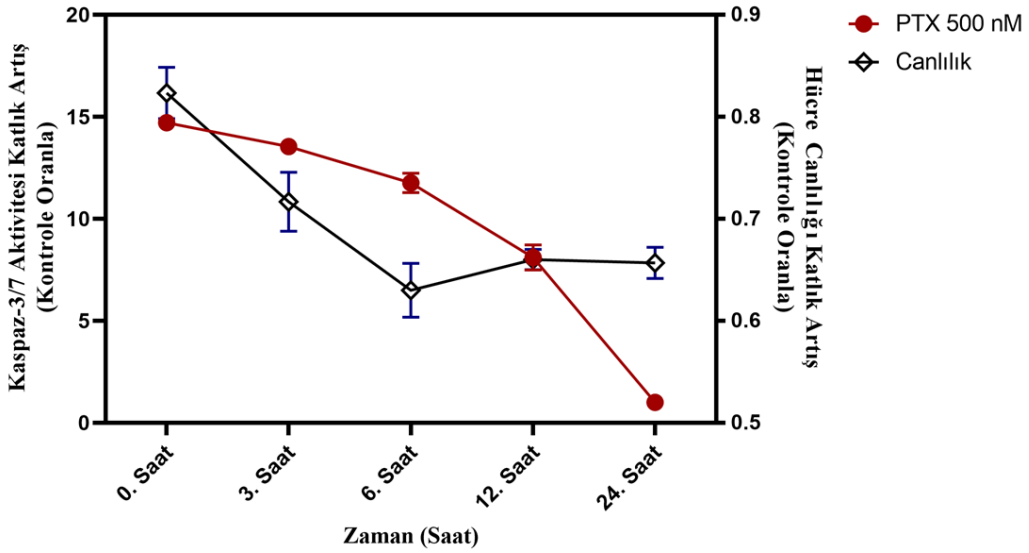
4.6. Anastatik Hücre Dönüşümünün Doğrulanması

Yapılan analizlerde A549 hücrelerinde 500 nM PTX konsantrasyonunun 20 saat uygulaması sonrasında ≥%99 hücre popülasyonunda kaspaz 3/7 aktivasyonuna bağlı apoptozisin uyarıldığı gösterilmiştir. Hatta bu hücrelerin ≥%91'i apoptotik/canlı hücre popülasyonuna sahiptir. Bu noktadan sonra A549 hücrelerinde apoptotik uyaran olan PTX' in ortamdan kaldırılmasıyla anastatik hücre dönüşümü incelenmiştir.

4.6.1. Anastatik Hücrelerdeki Aktif-Kaspaz 3/7 Seviyeleri

Hücreler 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarında kuyu başına $1x10^5$ hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin büyümesi ve bölünme döngülerine girmesi için 24 saat boyunca %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosferli inkübatörlerde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrasında 500 nM PTX uygulandı ve 20 saat süre sonunda PTX içeren besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Kuyular 1x PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra her kuyuya taze besiyeri eklenerek %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosferli inkübatörlerde 37°C'de

inkübasyona bırakıldı. Taze besiyeri eklenmesini takip eden 0, 3, 6, 12 ve 24 saat inkübasyon sonrasında kaspaz 3/7 aktiviteleri luminometrik mikro plaka okuyucuda ölçüldü. Anastatik hücrelerde apoptotik uyaranın ortamdan kaldırılması sonrasında kaspaz 3/7 aktivitesinin azalması beklenmektedir. Şekil 21'de görüldüğü üzere PTX'in ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra taze besiyerini eklenmesini takip eden 0. saatte maksimum seviyede kaspaz 3/7 aktivasyonu gözlenmiştir. Ayrıca hücrelerde apoptotik uyaranın yokluğunda zamana bağlı olarak kaspaz 3/7 aktivitesinde azalmalar gözlenmiştir. Hatta taze besiyeri eklendikten 24. saat sonra kaspaz 3/7 aktivasyonu minimum seviyeye inmektedir (Şekil 21). PTX'in ortamdan uzaklaştırılmasından sonra hücre canlılığında kontrole göre katlık artışta azalmalar gözlenirken 6.saatten sonra hücre canlılığında yine kontrole oaranla katlık artışta artma görülmüştür.

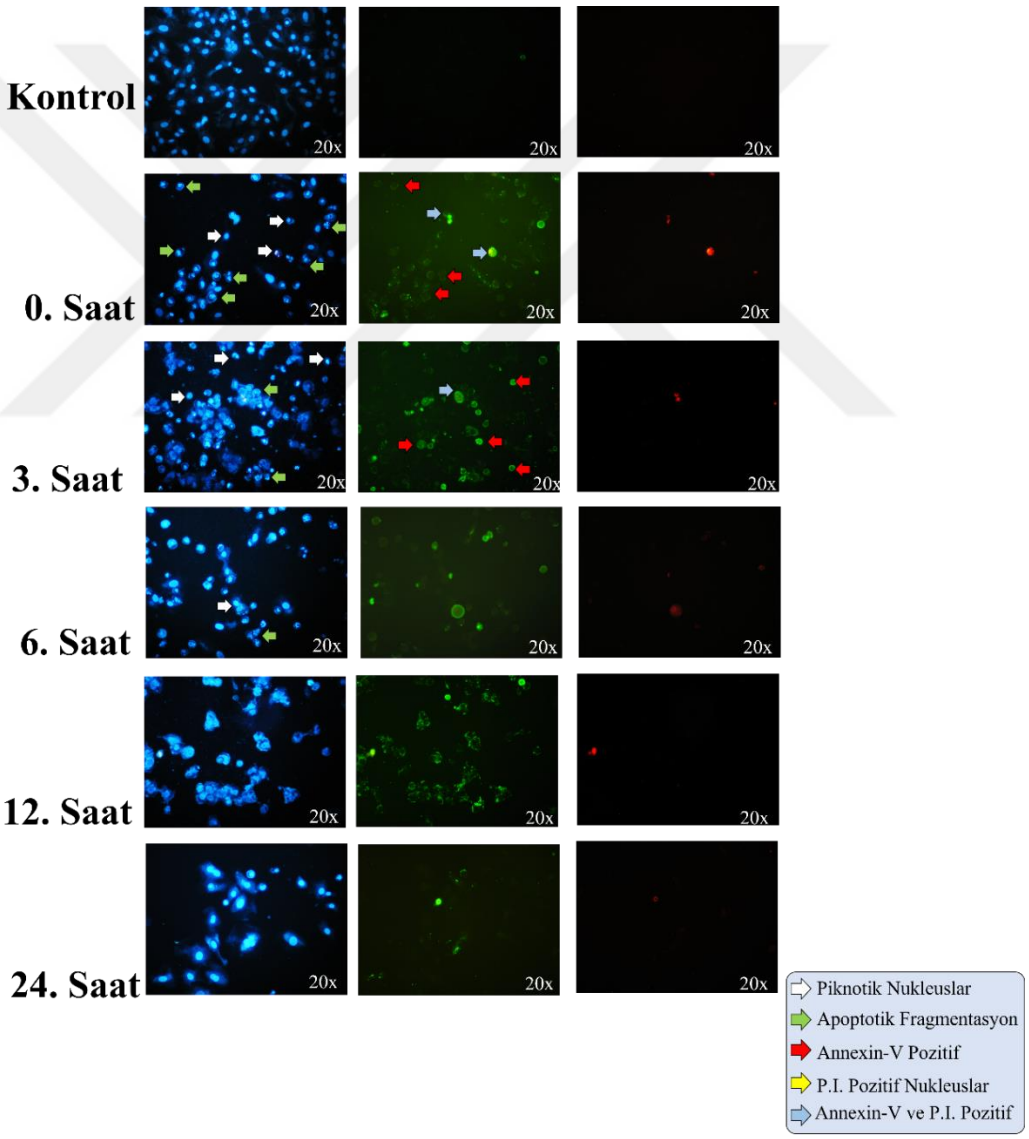


Şekil 21. PTX sonrası anastatik hücrelerdeki kaspaz 3/7 aktivite ve hücre canlılık analizi.

4.6.2. Anastatik Hücrelerdeki Anneksin-V Seviyeleri

Anastatik hücrelerde kaspaz 3/7 aktivitesinde azalmaya bağlı olarak fosfo azalmalar beklenmektedir. Bu amaçla hücreler 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarında kuyu başına $5x10^3$ hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin büyümesi ve bölünme döngülerine girmesi için 24 saat boyunca %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosferli inkübatörlerde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrasında 500 nM PTX uygulandı ve 20 saat süre sonunda PTX içeren besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Kuyular 1x PBS ile 3 defa

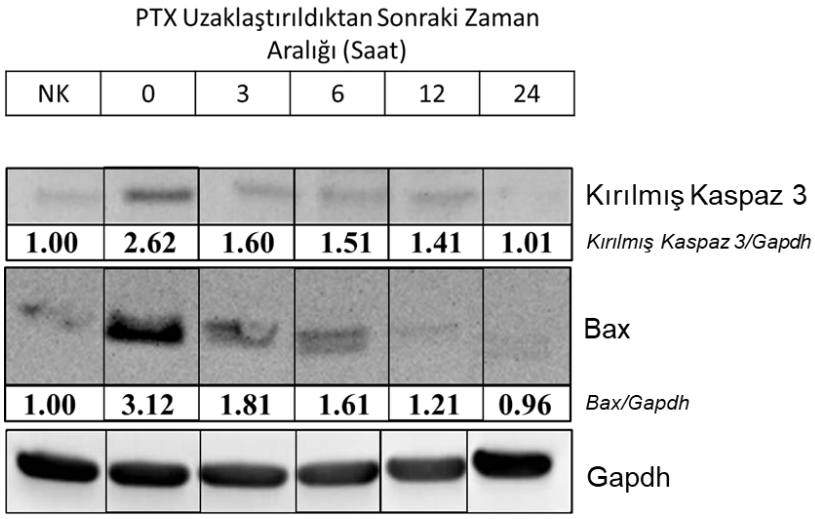
yıkandıktan sonra her kuyuya taze besiyeri eklenerek %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosferli inkübatörlerde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Taze besiyeri eklenmesini takip eden 0, 3, 6, 12 ve 24 saat inkübasyon sonrasında Anneksin-V, Hoecht ve PI boyaları eklenerek floresan mikroskop altında incelendi. Apoptotik uyaran olan PTX'in 20 saat uygulaması sonrası ortamdan uzaklaştırılması sonucu 0. saatte apoptozis belirteci olan piknotik nükleuslar ve Anneksin-V pozitif hücrelerin varlığı görülmektedir. Fakat apoptotik uyaranın kaldırılmasını takip eden diğer zaman aralıklarında piknotik çekirdek ve Anneksin-V pozitif hücre yoğunluğunda gözle görülür azalmalar tespit edilmiştir (Şekil 22).



Şekil 22. Anastatik hücrelerdeki Anneksin-V seviyelerinin incelenmesi. Mikroskobik büyütme 20X.

4.6.3. Anastatik Hücrelerdeki Moleküler Süreçlerin Protein Seviyesinde İncelenmesi

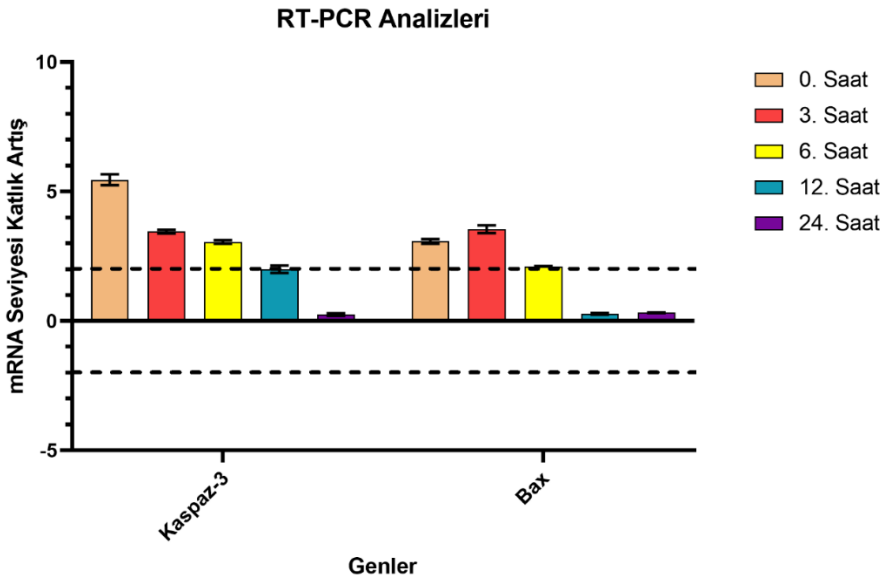
Apoptotik uyaranın ortamdan uzaklaştırılması sonrasında apoptozis sürecinde görevli protein belirteçlerinin azalması beklenmektedir. Bu amaçla hücreler 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarında kuyu başına $1x10^5$ hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin büyümesi ve bölünme döngülerine girmesi için 24 saat boyunca %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosferli inkübatörlerde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrasında 500 nM PTX uygulandı ve 20 saat süre sonunda PTX içeren besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Kuyular 1x PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra her kuyuya taze besiyeri eklenerek %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosferli inkübatörlerde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Taze besiyeri eklenmesini takip eden 0, 3, 6, 12 ve 24 saat inkübasyon sonrasında protein izolasyonları yapılarak kaspaz 3/7 ve Bax protein seviyeleri incelenmiştir. Zimojen kaspaz-3 başlatıcı kaspazlar tarafından aktif (kırılmış) kaspaz-3 formuna dönüşür. PTX apoptotik uyaranının ortamdan kaldırılmasıyla zamana bağlı olarak kırılmış kaspaz-3 seviyesinde azalmalar gözlenmiştir. Aynı şekilde içsel apoptotik yolakta görevli pro-apoptotik protein olan Bax'da zamana bağlı azalmıştır (Şekil 23). Tüm bu sonuçlar ışığında anastatik hücre dönüşümünün protein seviyesinde varlığı gösterilmiştir.



Şekil 23. Anastazis mekanizmasının protein seviyesinde incelenmesi. Eşit protein yüklemesi, GAPDH tarafından doğrulandı. Dansitometri, ImageJ yazılımı ile gerçekleştirildi ve gözlemlenen bantların yoğunluğunun GAPDH'a normalleştirilmiş ve 1.0'a ayarlanmış kontrollere göre nicelleştirilmiş dansitometrik analizler yapıldı. Veriler ortalama ±SD (n=3) olarak sunulmuştur.

4.6.4. Anastatik Hücrelerdeki Moleküler Süreçlerin Gen Seviyesinde İncelenmesi

Apoptotik uyaranın ortamdan uzaklaştırılması sonrasında apoptozis sürecinde görevli gen belirteçlerinin western blot sonucu ile korelasyon göstererek azalması beklenmektedir. Bu amaçla hücreler 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarında kuyu başına $150x10^3$ hücre olacak şekilde ekildi. Hücrelerin büyümesi ve bölünme döngülerine girmesi için 24 saat boyunca %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosferli inkübatörlerde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonrasında 500 nM PTX uygulandı ve 20 saat süre sonunda PTX içeren besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı. Kuyular 1x PBS ile 3 defa yıkandıktan sonra her kuyuya taze besiyeri eklenerek %5 CO_2 içeren şartlandırılmış atmosferli inkübatörlerde 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Taze besiyeri eklenmesini takip eden 0, 3, 6, 12 ve 24 saat inkübasyon sonrasında RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılarak RT-PCR ile kaspaz 3 ve Bax gen seviyeleri incelenmiştir. 500 nM PTX'e maruz kalan A549 hücrelerinde, apoptotik uyaran ortamdan kaldırıldıktan sonra meydana gelen gen ekspesyon değişimleri belirlendi. Kırılmış kaspaz-3 ve BAX genlerinin ekspresyonlarının zamana bağlı olarak anlamlı şekilde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 24). Tüm bu sonuçlar ışığında anastatik hücre dönüşümünün gen seviyesinde varlığı gösterilmiştir.



Şekil 24. Anastazis mekanizmasının gen seviyesinde incelenmesi. CT değerleri GAPDH'a göre normalize edilmiş olup kontrole göre katlık artış verilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p<0,05$, $p<0,01$, $p<0,001$ değerine göre belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ölmekte olan bir hücre, genel olarak kabul edilen 'dönüşü olmayan noktalara ulaştıktan sonra hücre ölümünün eşiğinden kurtulabilir mi? Bu soru, anastazis mekanizmasının ilk adımını oluşturmakla beraber bu tezin ortaya çıkmasına da neden olmuştur. Günümüzde anastazis mekanizmasına yönelik çalışmalar hız kazanmış ve birçok hücre soyunda bu mekanizma araştırılmıştır (Seervi ve ark., 2019; Sun ve ark., 2017; Tang ve Tang, 2018; Tang ve ark., 2017). Anastazis mekanizmasında apoptozisin tersine çevrilmesini incelemek için öncelikle apoptozun indüklenmesi ve indükleyicinin çıkarılmasından sonra apoptozisin tersine çevrilmesini sağlamak önemlidir (Tang ve ark., 2017).

Bizde bu tez çalışmasında A549 hücre soyu kullanarak PTX tedavisi sonrasında anastatik hücreleri elde etmeyi amaçladık. Bu amaca yönelik ilk olarak, PTX uygulaması sonrasında A549 hücre soylarında doz yanıtına bakıldı ve LC_{80}, LC_{50} ("lethal concentration"), TGI_{50} ("Total Growth Inhibition") ve GI_{50} ("Growth Inhibition") konsantrasyonları belirlendi (Şekil 15). PTX, çok çeşitli katı tümörlere ve çeşitli hematolojik malignitelere karşı yüksek etkinliği nedeniyle en yaygın kullanılan kemoterapötik ilaçlardan biridir. Şu anda KHDAK, meme kanseri, yumurtalık kanseri ve AIDS ile ilişkili Kaposi sarkomunun tedavisi için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onay almıştır (Weaver, 2014). PTX'in *in vitro* ve *in vivo* KHDAK hücrelerinde ve çeşitli hücre hatlarında doza ve zamana bağlı olarak sitotoksik bir etkiye neden olduğu rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2019; Duan ve ark., 2017). Nitekim, growth rate analizi sonucunda elde ettiğimiz verilerin literatürle uyumlu olduğu ve PTX'in, uygulanan konsantrasyona ve zamana bağlı olarak A549 hücrelerinin büyümelerini engellediği görülmüştür (Şekil 15). Canlılık analizi SRB'ye ek olarak ATP yöntemiyle de doğrulanmıştır. Bunun nedeni, ATP'nin, en hassas, en hızlı hücre canlılık analizi olması ve diğer canlılık analizi yöntemlerine göre artefaktlara daha az eğilimli olmasıdır (Riss ve ark., 2016). Buna göre, GI_{50}, TGI, LC_{50} ve LC_{80} değerleri hesaplanmıştır. Bu sayede PTX'in A549 hücrelerinde hangi konsantrasyonda apoptozisi indüklediği belirlenmiştir. A549 hücreleriyle yapılan bir çalışmada, PTX'in (0-32 μM), doza bağlı bir şekilde A549 hücrelerinde sitotoksik bir etkiye neden olduğu rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2019). Yine farklı bir çalışmada, PTX'in, A549 hücrelerine yönelik sitotoksik etkinliği MTT canlılık analizi ile araştırılmış ve buna göre, PTX'e maruz kalan hücrelerin tipik bir doza

bağlı eğri sergilediği görülmüştür. Aynı çalışmanın sonucu olarak PTX konsantrasyonuna göre A549 hücrelerinin canlılıklarında anlamlı azalmaların olduğu görülmüştür (Duan ve ark., 2017).

Anastatik hücreleri elde etmek için tüm ileri analizlerde LC_{80} konsantrasyonu kullanıldı. Çünkü anastazis sürecindeki temel prensip, hücrelerin potansiyel olarak öldürücü doza maruz kalmasıdır. Bu sayede hücrelerde tam anlamıyla bir kaspaz aktivasyonu gerçekleşmiş olur (Sun ve ark., 2017). Yapılan çalışmalarda, çeşitli sitotoksik ajanların subletal ($\leq IC_{50}$ değerinin altındaki) konsantrasyonları ile apoptozis indüklendikten sonra hücre restorasyonu araştırılmıştır. Fakat, subletal konsantrasyonlar sınırlı mitokondriyal membran permeabilizasyonuna yol açarak, hücre ölümünün tetiklenmesi için yetersiz olan sınırlı kaspaz aktivasyonuna neden olmaktadırlar. Sınırlı kaspaz aktivitesinin neden olduğu DNA hasarına bağlı olarak genomik instabilite, hücresel transformasyon ve tümör oluşumunun indüklenmesi gözlendiğinden, bu hücrelerin programlanmış bir mekanizma ile yaşama dönmedikleri düşünülmektedir (Ichim ve ark., 2015). Bu nedenle anastazis sürecine ilişkin çalışmalarda olduğu gibi apoptotik indükleyicinin öldürücü ("letal") konsantrasyonu seçilmiştir (Seervi ve ark., 2019; Sun ve ark., 2017; Tang ve ark., 2009; Tang ve ark., 2015; Tang ve Tang, 2018; Tang ve ark., 2017).

Bu noktadan sonra LC_{80} PTX konsantrasyonunun hangi zaman aralığında maksimum kaspaz-3/7 enzim aktivasyonuna neden olduğu belirlendi (Şekil 16). PTX'in özellikle β -tübülin heterodimerlerinden kararlı mikrotübüllerin birleşmesini uyararak hücre döngüsünün G2/M-fazında tutuklanmasıyla hücre bölünmesini önlediği ve sonuç olarak hücrelerde apoptotik hücre ölümünün uyarıldığı bilinmektedir. Apoptotik uyarım sadece mikrotübül stabilizasyonuyla değil PTX tarafından apoptotik modülatör genlerin indüklenmesiylede gerçekleşmektedir. Ayrıca paklitakselin apoptotik etkisi maruziyetin konsantrasyonuna ve süresine bağlı olarak değişmektedir. Yaptığımız enzim aktivite çalışmalarında 20 saat 500 nM PTX tedavisi sonunda kaspaz-3/7 aktivitesinin maksimum seviyeye çıktığı ve devam eden tedavi saatlerinde aynı paternin korunduğu gözlenmiştir (Şekil 16). Maruziyet süresine bağlı olarak değişen apoptotik indüksiyon farklı çalışmalarda belirtilen zamana bağlı etki mekanizmasını doğrulamaktadır. Hatta akış sitometrisi analizlerinde 20 saat süreyle 500 nM PTX tedavisi sonunda %98,97 apoptotik hücre oranının gözlenmesi kaspaz-3/7 enzim aktivite sonuçlarını desteklemektedir (Şekil

17). Kaspaz-3/7 aktivitesi apoptozis sürecinde kondanse kromatin yapıları ve flippazlardaki fonksiyon kaybı sonucu PS'lerin hücre membranının dış yüzeyine transloke olması gibi bir dizi reaksiyonu tetiklemektedir. Floresan boyama analizlerinde de bu süreçler net bir şekilde gözlenmiştir (Şekil 18, 19, 20). Hatta 20 saatlik PTX uygulamasında bu süreçlerin pik noktaya ulaştığı gösterilmiştir (Şekil 18). Anastazis üzerine yapılan araştırmalarda tez çalışmamızda olduğu gibi hücrelerde apoptotik belirteçlerin (kaspaz-3/7 aktivasyonu, kondanse kromatin yoğunlaşması, PS translokasyonu v.b.) gözlendiği noktalardan apoptozis süreci tersine çevrilerek hücreler yaşamı seçebilmektedir. HeLa hücrelerinde apoptotik indükleyici olan jasplakinolidin 3 saatlik uygulanması sonrasında ortamdan uzaklaştırılıp canlı hücre görüntüleme sistemleriyle izlenmiştir. 48 saatlik süre sonunda hücrelerde apoptotik biyobelirteçlerin (kaspaz-3/7 aktivasyonu) azalarak en sonunda sağlıklı fenotipin sağlandığı bildirilmiştir (Tang ve ark., 2009). Primer fare karaciğer hücrelerinde %4,5 konsantrasyonunda etanol ile apoptozisin uyarılması sonrasında indükleyici ortamdan uzaklaştırıldıktan 24 saat sonra hücrelerin normal fenotiplerini kazanarak apoptotik ölümden geri döndükleri gösterilmiştir (Tang ve ark., 2017). 500nm PTX tarafından apoptotik uyarım gerçekleştikten sonra PTX'in ortamdan uzaklaştırılmasını takip eden sürelerde apoptotik belirteçlerin azalarak A549 hücrelerinin ölümden yaşama dönüşü görülmüştür. PTX'in uzaklaştırılması sonrasında kaspaz-3/7 enzim aktivitesinin zamanla bazal seviyeye kadar inmesi (Şekil 21) ve bunu takip eden Anneksin pozitif hücrelerin azalması (Şekil 22) A549 hücrelerinin yaşama doğru döndüğünün belirteçleridir. Hatta floresan boyama analizlerinde 24. saat sonunda kromatin yoğunluğunun normal olarak izlenmesi ve nükleus morfolojisinin sağlıklı hücrelerde olduğu gibi normal fenotipe dönmesi anastazis sürecini görsel olarak takip edilebilir kılmıştır (Şekil 22). Ek olarak, apoptozisle ölen hücrelerin kaspaz-3 aktivitesine rağmen hayatta kalması, aynı hücrelerin kendilerini yenileyebilmesini hatta taze besiyerinden sonra çoğalabilmesini gerektirir. Bu varsayımdan sonra PTX'in ortamdan uzaklaştırılmasıyla kaspaz 3 enzim aktivitesine ek olarak ATP canlılık analizi ile hücre canlılığı ölçüldü (Şekil 21). Buna göre, PTX'in ortamdan çıkarıldıktan sonra 6 saate kadar hücre canlılığında azalma gözlenirken 6.saatten sonra kontrole göre canlılıkta bir katlık artış görülmüştür. Bu da varsayımın doğru olduğunu ve kaspaz 3 aktivasyonundan kurtulan hücrelerin tekrar çoğaldığını göstermiştir. Yapılan çalışmalarda da geri gelen hücrelerin onkojenik transformasyonla

daha agresif ve invaziv bir yapıda oldukları gösterilmiştir (Seervi ve ark., 2019; Tang ve ark., 2018; Tang ve ark., 2012; Tang ve ark., 2009).

Apoptozis mekanizması her ne kadar farklı sinyaller tarafından tetiklensede mekanizma temelde iki süreçle son bulur. Mitokondri membran potansiyelinde bozulma ve konakçı hücreleri dakikalar içinde yok edecek etkili kaspaz proteaz aktivasyonu. Mitokondriyal hasar veya kaspaz aktivasyonu tek başına hücre ölümünü başlatmak için yeterlidir (Galluzzi ve ark., 2012; Riedl ve Shi, 2004). Sadece kaspaz-3/7 aktivasyonu değil MOMP değişimininde bir apoptoz başlangıç noktası olduğu ve bu olaydan sonra hücrenin hayatta kalmasının imkânsız olduğu bilinmekteydi. Fakat anastazis sürecinde bu tür yıkıcı olaylara rağmen, hücrenin MOMP'dan sonra normal işlevini geri kazanabileceği ve geri yükleyebileceği doğrulanmıştır (Sun ve ark., 2017; Tang ve Tang, 2018; Tang ve ark., 2015).Western blot analizlerinde (Şekil 23) pro-apoptotik aileye ait Bax protein seviyelerinin indükleyicinin ortamdan kaldırılması sonucu kaspaz-3/7 protein seviyesiyle korelasyon sağlayacak şekilde azalması A549 hücrelerinin MOMP değişimini tersine çevirebildiklerini göstermektedir. Kaspaz aktivasyonu sonrasında letal doz apoptotik indükleyicinin kaldırılmasıyla otofajide kavşak rollere sahip SQSTM1 ve ATG12 gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir (Sun ve ark., 2017). Bu durumun muhtemelen sitozolik sitokrom c'nin ve hasarlı mitokondrinin otofaji yoluyla anastatik hücreler tarafından elimine edilmesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Hatta kaspaz kaskadı yokluğunda, ATG12'nin yukarı regülasyonu sitozolik sitokrom c'nin hızlı eliminasyonu ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca hücreler tarafından oksidatif strese ve zararlı ısıya yanıt vermek için üretilen şaperonlardan HSP27 ve HSP70'in ekspresyon seviyelerinde artışlar gözlenmiştir. Hem HSP27 hem de HSP70 şaperonları, mitokondri tarafından sitokrom c salgılanmasını önlediğine yönelik çalışmalar (Santos ve ark., 2017) düşünüldüğünde anastatik hücrelerin MOMP'ini iyileştirmek için çoklu sinyal yolaklarını aktif etmektedir (Tang ve ark., 2017). Apoptozisin tersine çevrilmesi sonucu A549 hücrelerinde kaspaz-3 ve Bax'ın PCR ile zamana bağlı gen ekspresyon analizi gerçekleştirildi. Buna göre, kaspaz-3 ve Bax genlerinin ekspresyonlarında zamana bağlı bir azalmanın gerçekleştiği görüldü. Nitekim Western Blot analizlerinde de aynı şekilde kırılmış kaspaz-3 ve Bax protein ekspresyonlarındaki azalma, hücrelerin 0. saatteki apoptotik indüksiyondan kurtulduğunu

göstermektedir. Tüm bu sonuçlar birbiriyle uyumlu olup anastatik hücre dönüşümünün protein ve gen seviyesinde varlığı gösterilmiştir.

Bu tez çalışması, A549 hücrelerinin PTX'in neden olduğu apoptozisten kurtulabileceğini ortaya koymaktadır. KHDAK hücrelerinin (A549), PTX'e bağlı apoptotik hücre ölümünü tersine çevirerek geri geldiği ve geri gelen bu (anastatik) hücrelerin mekanizmasının protein ve gen seviyesinde varlığı *in vitro* olarak gösterilmiştir. Elde edilen veriler, ileri analizler için umut vaat etmektedir. Söz konusu anastatik hücrelerde gelişen ilaç direnci, klinik uygulamada tedavi başarısızlığının nedenlerinden biri olabilir. Ek olarak, kaspaz aktivasyonundan sonra hücrelerin geri dönmesi, genetik instabilite ve artan mutasyon yükü ile sonuçlanabilir. Daha ileri analizler (in vivo, biyoinformatik, vb.), anastatik hücrelerde onkojenik transformasyon, metastaz ve kemorezistans gibi mekanizmaların daha ayrıntılı araştırılmasına olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Abdelhafez, E. M. N., Ali, S. M. N. A., Hassan, M. R. E., Abdel-Hakem, A. M. (2019). Apoptotic Inhibitors as Therapeutic Targets for Cell Survival. In: E. S. Istifli, & H. B. Ila (Eds.), Cytotoxicity- Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds. *IntechOpen*. https://doi.org/10.5772/intechopen.85465

Akbay, E. A., Koyama, S., Carretero, J., Altabef, A., Tchaicha, J. H., Christensen, C. L., Mikse, O. R., Cherniack, A. D., Beauchamp, E. M., Pugh, T. J., Wilkerson, M. D., Fecci, P. E., Butaney, M., Reibel, J. B., Soucheray, M., Cohoon, T. J., Janne, P. A., Meyerson, M., Neil Hayes, D., Shapiro, G. I., Shimamura, T., Sholl, L. M., Rodig, S. J., Freeman, G. J., Hammerman, P. S., Dranoff, G., Wong, K. K. (2013). Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discovery*, 3(12):1355-1363. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0310

Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2):171. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81334-3

Beau-Faller, M., Ruppert, A. M., Voegeli, A. C., Neuville, A., Meyer, N., Guerin, E., Legrain, M., Mennecier, B., Wihlm, J. M., Massard, G., Quoix, E., Oudet, P., Gaub, M. P. (2008). MET gene copy number in non-small cell lung cancer: Molecular analysis in a targeted tyrosine kinase inhibitor naïve cohort. *Journal of Thoracic Oncology*, 3(4):331-339. https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318168d9d4

Berger, M. F., Mardis, E. R. (2018). The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 15(6):353-365. https://doi.org/10.1038/s41571-018-0002-6

Bergethon, K., Shaw, A. T., Ou, S. H. I., Katayama, R., Lovly, C. M., McDonald, N. T., Massion, P. P., Siwak-Tapp, C., Gonzalez, A., Fang, R., Mark, E. J., Batten, J. M., Chen, H., Wilner, K. D., Kwak, E. L., Clark, J. W., Carbone, D. P., Ji, H., Engelman, J. A., Mino-Kenudson, M., Pao, W., Iafrate, A. J. (2012). ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *Journal of Clinical Oncology*, 30(8):863-870. https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.6345

Berthenet, K., Weber, K., Ichim, G. (2020). Sometimes even apoptosis fails: implications for cancer. *Molecular and Cellular Oncology*, 7(6):1-3. https://doi.org/10.1080/23723556.2020.1797430

Bildik, A., Bayar, İ. (2018). Inhibition of Apoptotic Pathways in Cancer. *Turkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 9(2):42-51. https://doi.org/10.5336/vetsci.2018-62141

Brentnall, M., Rodriguez-Menocal, L., De Guevara, R.L., Cepero, E., Boise, L. H. (2013). Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis. *BMC Cell Biology*, 14, 32. https://doi.org/10.1186/1471-2121-14-32

Brunet, C. L., Gunby, R. H., Benson, R. S. P., Hickman, J. A., Watson, A. J. M., Brady, G. (1998). Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable from the appearance of apoptotic markers. *Cell Death and Differentiation*, 5(1):107-115. https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400334

Bu, S., Wang, R., Pan, Y., Yu, S., Shen, X., Li, Y., Sun, Y., Chen, H. (2017). Clinicopathologic Characteristics of Patients with HER2 Insertions in Non-small Cell Lung Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 24(1):291-297. https://doi.org/10.1245/s10434-015-5044-8

Cardarella, S., Ogino, A., Nishino, M., Butaney, M., Shen, J., Lydon, C., Yeap, B. Y., Sholl, L. M., Johnson, B. E., Jänne, P. A. (2013). Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 19(16):4532-4540. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0657

Chen, S., Zhang, Z., Zhang, J. (2019). Emodin enhances antitumor effect of paclitaxel on human non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Drug Design, Development and Therapy*, 13:1145. https://doi.org/10.2147/DDDT.S196319

Costantini, S., Budillon, A. (2020). New prognostic and predictive markers in cancer progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22):1-4. https://doi.org/10.3390/ijms21228667

Derman, B. A., Mileham, K. F., Bonomi, P. D., Batus, M., Fidler, M. J. (2015). Treatment of advanced squamous cell carcinoma of the lung: A review. *Translational Lung Cancer Research*, 4(5):524-532. https://doi.org/10.3978/j.issn.2218-6751.2015.06.07

Deveraux, Q. L., Reed, J. C. (1999). IAP family proteins- Suppressors of apoptosis. *Genes and Development*, 13(3):239-252. https://doi.org/10.1101/gad.13.3.239

Duan, Z., Chen, C., Qin, J., Liu, Q., Wang, Q., Xu, X., Wang, J. (2017). Cell-penetrating peptide conjugates to enhance the antitumor effect of paclitaxel on drug-resistant lung cancer. *Drug Delivery*, 24(1):752-764. https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1321060/SUPPL_FILE/IDRD_A_1321060_SM9396.DOCX

Edkins, S., O'Meara, S., Parker, A., Stevens, C., Reis, M., Jones, S., Greenman, C., Davies, H., Dalgliesh, G., Forbes, S., Hunter, C., Smith, R., Stephens, P., Goldstraw, P., Nicholson, A., Tsun, L. C., Velculescu, V. E., Siu, T. Y., Suet, Y. L., Stratton, M. R., Futreal, P. A. (2006). Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. *Cancer Biology and Therapy*, 5(8):928-932. https://doi.org/10.4161/cbt.5.8.3251

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4):495-516. https://doi.org/10.1080/01926230701320337

Endoh, H., Yatabe, Y., Kosaka, T., Kuwano, H., Mitsudomi, T. (2006). PTEN and PIK3CA Expression Is Associated with Prolonged Survival after Gefitinib Treatment in EGFR-Mutated Lung Cancer Patients. *Journal of Thoracic Oncology*, 1(7):629-634. https://doi.org/10.1097/01243894-200609000-00006

Fearnhead, H. O., Rodriguez, J., Govek, E. E., Guo, W., Kobayashi, R., Hannon, G., Lazebnik, Y. A. (1998). Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(23):13664-13669. https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13664

Fontana, F., Anselmi, M., Limonta, P. (2022). Molecular Mechanisms of Cancer Drug Resistance: Emerging Biomarkers and Promising Targets to Overcome Tumor Progression. *Cancers*, 14(7). https://doi.org/10.3390/cancers14071614

Fujimoto, J., Wistuba, I. I. (2014). Current concepts on the molecular pathology of non-small cell lung carcinoma. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 31(4):306-313. https://doi.org/10.1053/j.semdp.2014.06.008

Galluzzi, L., Kepp, O., Kroemer, G. (2012). Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(12):780-788. https://doi.org/10.1038/nrm3479

Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., … Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*, 25(3), 486–541. https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4

Garon, E. B., Rizvi, N. A., Hui, R., Leighl, N., Balmanoukian, A. S., Eder, J. P., Patnaik, A., Aggarwal, C., Gubens, M., Horn, L., Carcereny, E., Ahn, M.-J., Felip, E., Lee, J.-S., Hellmann, M. D., Hamid, O., Goldman, J. W., Soria, J.-C., Dolled-Filhart, M., Rutledge, R. Z., Zhang, J., Lunceford, J. K., Rangwala, R., Lubiniecki, G. M., Roach, C., Emancipator, K., Gandhi, L. (2015). Pembrolizumab for the Treatment of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 372(21):2018-2028. https://doi.org/10.1056/nejmoa1501824

Graziani, G., Szabó, C. (2005). Clinical perspectives of PARP inhibitors. *Pharmacological Research*, 52(1 SPEC. ISS.):109-118. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.02.013

Güleş, Ö., Eren, Ü. (2008). Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19(2):73-78

Hacker, G. (2000). The morphology of apoptosis. *Cell and tissue research*, 301(1):5-17. https://doi.org/10.1007/s004410000193

Hafner, M., Niepel, M., Chung, M., Sorger, P. K. (2016). Growth rate inhibition metrics correct for confounders in measuring sensitivity to cancer drugs. *Nature Methods*, (13):521-7. https://doi.org/10.1038/nmeth.3853

Herbst, R. S., Morgensztern, D., Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature, Nature Publishing Group*, 553:446-454. https://doi.org/10.1038/nature25183

Hilario, E., Cañavate, M., Lacalle, Jaione., Alonso-Alconada, D., Lara, Idoia., Alvarez-Granda, L., Alvarez, A. (2010). Cell death. A comprehensive approximation. Delayed cell death. In: A. Méndez-Vilas and J. Díaz (Eds.), *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*, 1025-2032.

Ichim, G., Lopez, J., Ahmed, S. U., Muthalagu, N., Giampazolias, E., Delgado, M. E., Haller, M., Riley, J. S., Mason, S. M., Athineos, D., Parsons, M. J., vandeKooij, B., Bouchier-Hayes, L., Chalmers, A. J., Rooswinkel, R. W., Oberst, A., Blyth, K., Rehm, M., Murphy, D. J., Tait, S. W. G. (2015). Limited Mitochondrial Permeabilization Causes DNA Damage and Genomic Instability in the Absence of Cell Death. *Molecular Cell*, 57(5):860-872. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.018

Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature reviews. Cancer*, 2(4):277-288. https://doi.org/10.1038/nrc776

Inceboz, M., Goker Bagca, B., Caner, A., Gündüz, C. (2021). Anastasis in Glioblastoma, Brain Cancer Stem, and Brain Stem Cells. *Journal of Basic and Clinical Health Sciences*, 5(1):14-21. https://doi.org/10.30621/jbachs.854986

Jiang, X., McKinley, E. T., Xie, J., Li, H., Xu, J., Gore, J. C. (2019). In vivo magnetic resonance imaging of treatment-induced apoptosis. *Scientific Reports*, 9(1). https://doi.org/10.1038/s41598-019-45864-y

Kawano, O., Sasaki, H., Endo, K., Suzuki, E., Haneda, H., Yukiue, H., Kobayashi, Y., Yano, M., Fujii, Y. (2006). PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients. *Lung Cancer*, 54(2):209-215. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2006.07.006

Kempf, E., Rousseau, B., Besse, B., Paz-Ares, L. (2016). KRAS oncogene in lung cancer: focus on molecularly driven clinical trials. *European Respiratory Review*, 25(139):71-76. https://doi.org/10.1183/16000617.0071-2015

Kenis, H., Zandbergen, H. R., Hofstra, L., Petrov, A. D., Dumont, E. A., Blankenberg, F. D., Haider, N., Bitsch, N., Gijbels, M., Verjans, J. W., Narula, N., Narula, J., & Reutelingsperger, C. P. (2010). Annexin A5 uptake in ischemic myocardium: demonstration of reversible phosphatidylserine externalization and feasibility of

radionuclide imaging. *Journal of Nuclear Medicine*, 51(2):259-267. https://doi.org/10.2967/jnumed.109.068429

Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4):239-257. https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33

Knowles, P. P., Murray-Rust, J., Kjær, S., Scott, R. P., Hanrahan, S., Santoro, M., Ibáñez, C. F., McDonald, N. Q. (2006). Structure and chemical inhibition of the RET tyrosine kinase domain. *Journal of Biological Chemistry*, 281(44):33577-33587. https://doi.org/10.1074/jbc.M605604200

Lazebnik, Y. A., Cole, S., Cooke, C. A., Nelson, W. G., Earnshaw, W. C. (1993). Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: A model system for analysis of the active phase of apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 123(1):7-22. https://doi.org/10.1083/jcb.123.1.7

Le, G. T., Abbenante, G. (2005). Inhibitors of TACE and Caspase-1 As Anti-inflammatory Drugs. *Current Medicinal Chemistry*, 12(25):2963-2977. https://doi.org/10.2174/092986705774462851

Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4):491-501. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81590-1

Lim, P. T., Goh, B. H., Lee, W. L. (2022). Taxol: Mechanisms of action against cancer, an update with current research. In: M. K. Swamy, T. Pullaiah, Z. S. Chen (Eds.), *Paclitaxel: Sources, Chemistry, Anticancer Actions, and Current Biotechnology* 47-71. https://doi.org/10.1016/b978-0-323-90951-8.00007-2

Lipson, D., Capelletti, M., Yelensky, R., Otto, G., Parker, A., Jarosz, M., Curran, J. A., Balasubramanian, S., Bloom, T., Brennan, K. W., Donahue, A., Downing, S. R., Frampton, G. M., Garcia, L., Juhn, F., Mitchell, K. C., White, E., White, J., Zwirko, Z., Peretz, T., Nechushtan, H., Soussan-Gutman, L., Kim, J., Sasaki, H., Kim, H. R., Park, S. Il, Ercan, D., Sheehan, C. E., Ross, J. S., Cronin, M. T., Jänne, P. A., Stephens, P. J. (2012). Identification of new ALK and RET gene fusions from colorectal and lung cancer biopsies. *Nature Medicine*, 18(3):382-384. https://doi.org/10.1038/nm.2673

Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1998). Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94(4):481-490. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81589-5

Macerelli, M., Caramella, C., Faivre, L., Besse, B., Planchard, D., Polo, V., Ngo Camus, M., Celebic, A., Koubi-Pick, V., Lacroix, L., Pignon, J. P., Soria, J. C. (2014). Does KRAS mutational status predict chemoresistance in advanced non-small cell lung

cancer (NSCLC)?. *Lung Cancer*, 83(3):383-388. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.12.013

Majtnerová, P., Roušar, T. (2018). An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports*, 45(5):1469-1478. https://doi.org/10.1007/s11033-018-4258-9

Masuda, H., Zhang, D., Bartholomeusz, C., Doihara, H., Hortobagyi, G. N., Ueno, N. T. (2012). Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 136(2):331-345. https://doi.org/10.1007/s10549-012-2289-9

Mazières, J., Rouvière, D., D. Milia, J., Filleron, T., Zalcman, G., Biondani, P., Besse, B., Barlesi, F., Léna, H., Monnet, I., Thiberville, L., Pecuchet, N., Crinò, L., Cappuzzo, F., Dingemans, A. M. C., Smit Sacha I Rothschild, E. F., Spirig, C., Diebold, J., Gautschi, O., Dziadziuszko, R., Wolf, J., Thomas, R. K., Leenders, F., Heuckmann, J. M. (2015). Crizotinib therapy for advanced lung adenocarcinoma and a ROS1 rearrangement: Results from the EUROS1 cohort. *Journal of Clinical Oncology*, 33(9):992-999. https://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.3302

Messam, C. A., Pittman, R. N. (1998). Asynchrony and commitment to die during apoptosis. *Experimental Cell Research*, 238(2):389-398. https://doi.org/10.1006/excr.1997.3845

Mirzayans, R., & Murray, D. (2020). Intratumor Heterogeneity and Therapy Resistance: Contributions of Dormancy, Apoptosis Reversal (Anastasis) and Cell Fusion to Disease Recurrence. *International journal of molecular sciences*, 21(4):1308. https://doi.org/10.3390/ijms21041308

Mocanu, M. M., Baxter, G. F., Yellon, D. M. (2000). Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: Protection against lethal reperfusion injury. *British Journal of Pharmacology*, 130(2):197-200. https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703336

Mohammed, R. N., Khosravi, M., Rahman, H. S., Adili, A., Kamali, N., Soloshenkov, P. P., Thangavelu, L., Saeedi, H., Shomali, N., Tamjidifar, R., Isazadeh, A., Aslaminabad, R., Akbari, M. (2022). Anastasis: cell recovery mechanisms and potential role in cancer. *Cell Communication and Signaling*, 20(1):1-9. https://doi.org/10.1186/s12964-022-00880-w

Opdenbosch, N. V., Lamkanfi, M. (2019). Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*, 50(6):1352-1364. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.05.020

Paik, P. K., Drilon, A., Fan, P. D., Yu, H., Rekhtman, N., Ginsberg, M. S., Borsu, L., Schultz, N., Berger, M. F., Rudin, C. M., Ladanyi, M. (2015). Response to MET inhibitors in patients with stage IV lung adenocarcinomas harboring met mutations causing exon 14 skipping. *Cancer Discovery*, 5(8):842-850. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-1467

Pikor, L. A., Ramnarine, V. R., Lam, S., Lam, W. L. (2013). Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer*, 82(2):179-189. https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.07.025

Pirker, R. (2020). Chemotherapy remains a cornerstone in the treatment of nonsmall cell lung cancer. *Current Opinion in Oncology*, 32(1):63-67. https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000592

Popescu, N. C., King, C. R., Kraus, M. H. (1989). Localization of the human erbB-2 gene on normal and rearranged chromosomes 17 to bands q12-21.32. *Genomics*, 4(3):362-366. https://doi.org/10.1016/0888-7543(89)90343-1

Ricciardi, G. R. R., Russo, A., Franchina, T., Ferraro, G., Zanghì, M., Picone, A., Scimone, A., Adamo, V. (2014). NSCLC and HER2 between lights and shadows. *Journal of Thoracic Oncology*, 9(12):1750-1762. https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000379

Riedl, S. J., Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(11):897-907. https://doi.org/10.1038/nrm1496

Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., Minor, L. (2016). Cell Viability. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., (Eds.), *Assay Guidance Manual Assays*.

Rudin, C. M., Brambilla, E., Faivre-Finn, C., Sage, J. (2021). Small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, 7(1). https://doi.org/10.1038/s41572-020-00235-0

Samuels, Y., Velculescu, V. E. (2004). Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle*, 3(10):1221-1224. https://doi.org/10.4161/cc.3.10.1164

Santos, T. G., Martins, V., Hajj, G. (2017). Unconventional Secretion of Heat Shock Proteins in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5):946. https://doi.org/10.3390/ijms18050946

Schmidt, L., Duh, F. M., Chen, F., Kishida, T., Glenn, G., Choyke, P., Scherer, S. W., Zhuang, Z., Lubensky, I., Dean, M., Allikmets, R., Chidambaram, A., Bergerheim, U. R., Feltis, J. T., Casadevall, C., Zamarron, A., Bernues, M., Richard, S., Lips, C. J. M. (1997). Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nature Genetics*, 16(1):68-73. https://doi.org/10.1038/ng0597-68

Seervi, M., Sumi, S., Chandrasekharan, A., Sharma, A. K., SanthoshKumar, T. R. (2019). Molecular profiling of anastatic cancer cells: potential role of the nuclear export pathway. *Cellular Oncology*, 42(5):645-661. https://doi.org/10.1007/s13402-019-00451-1

Segeritz, C. P., Vallier, L. (2017). Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, 151-172. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6

Sekaran, S. D., Leow, S.-S., Abobaker, N., Tee, K. K., Sundram, K., Sambanthamurthi, R., Wahid, M. B. (2010). Effects of oil palm phenolics on tumor cells in vitro and in vivo. *African Journal of Food Science*, 4(8):495-502.

Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*, 22(4):526-539. https://doi.org/10.1038/cdd.2014.216

Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J., Haber, D. A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(3):169-181. https://doi.org/10.1038/nrc2088

Shepherd, F. A., Domerg, C., Hainaut, P., Jänne, P. A., Pignon, J. P., Graziano, S., Douillard, J. Y., Brambilla, E., Le Chevalier, T., Seymour, L., Bourredjem, A., Le Teuff, G., Pirker, R., Filipits, M., Rosell, R., Kratzke, R., Bandarchi, B., Ma, X., Capelletti, M., Soria, J. C., Tsao, M. S. (2013). Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutation subtype in early-stage resected non–small-cell lung cancer in four trials of adjuvant chemotherapy. *Journal of Clinical Oncology*, 31(17):2173-2181. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.1390

Shoemaker, R. H. (2006). The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer*, 6(10): 813-823.

Sholl, L. M. (2015). Biomarkers in lung adenocarcinoma: A decade of progress. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 139(4):469-480. https://doi.org/10.5858/arpa.2014-0128-RA

Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. CA: *A Cancer Journal for Clinicians*, 72(1):7-33. https://doi.org/10.3322/CAAC.21708

Silke, J., Hawkins, C. J., Ekert, P. G., Chew, J., Day, C. L., Pakusch, M., Verhagen, A. M., Vaux, D. L. (2002). The anti-apoptotic activity of XIAP is retained upon mutation of both the caspase 3- and caspase 9-interacting sites. *Journal of Cell Biology*, 157(1):115-124. https://doi.org/10.1083/jcb.200108085

Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. Nature reviews. *Molecular Cell Biology*, 20(3), 175–193. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8

Škubník, J., Pavlíčková, V., Ruml, T., Rimpelová, S. (2021). Current perspectives on taxanes: Focus on their bioactivity, delivery and combination therapy. *Plants*, 10(3):1-35. https://doi.org/10.3390/plants10030569

Soengas, M. S., Alarcón, R. M., Yoshida, H., Giaccia, A. J., Hakem, R., Mak, T. W., Lowe, S. W. (1999). Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science*, 284(5411):156-159. https://doi.org/10.1126/science.284.5411.156

Solary, E., Bertrand, R., Kohn, K., Pommier, Y. (1993). Differential induction of apoptosis in undifferentiated and differentiated HL-60 cells by DNA topoisomerase I and II inhibitors. *Blood*, 81(5):1359-1368. https://doi.org/10.1182/blood.v81.5.1359.bloodjournal8151359

Spranger, S., Gajewski, T. F. (2018). Mechanisms of Tumor Cell-Intrinsic Immune Evasion. *Annual Review of Cancer Biology*, 2:213-228. https://doi.org/10.1146/annurev-cancerbio-030617-050606

Strasser, A., & Vaux, D. L. (2020). Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer. *Molecular Cell*, 78(6):1045-1054. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.05.014

Sun, G., Guzman, E., Balasanyan, V., Conner, C. M., Wong, K., Zhou, H. R., Kosik, K. S., Montell, D. J. (2017). A molecular signature for anastasis, recovery from the brink of apoptotic cell death. *Journal of Cell Biology*, 216(10):3355-3368. https://doi.org/10.1083/jcb.201706134

Sun, G., Montell, D. J. (2017). Q&A: Cellular near death experiences-what is anastasis?. *BMC Biology*, 15(1):92. https://doi.org/10.1186/s12915-017-0441-z

Tait, S. W., Parsons, M. J., Llambi, F., Bouchier-Hayes, L., Connell, S., Muñoz-Pinedo, C., & Green, D. R. (2010). Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Developmental Cell*, 18(5):802-813. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.03.014

Tang, H. L., Yuen, K. L., Tang, H. M., Fung, M. C. (2009). Reversibility of apoptosis in cancer cells. *British Journal of Cancer*, 100(1):118-122. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604802

Tang, H. M., Fung, M. C., Tang, H. L. (2018). Detecting anastasis in vivo by caspasetracker biosensor. *Journal of Visualized Experiments*, (132). https://doi.org/10.3791/54107

Tang, H. M., Jr, C. C. T., Fung, M. C., Tang, H. L. (2022). Transcriptomic study of anastasis for reversal of ethanol-induced apoptosis in mouse primary liver cells. *Scientific Data 9*. https://doi.org/10.1038/s41597-022-01470-8

Tang, H. M., Jr, C. C. T., Fung, M. C., Tang, H. L. (2017). Molecular signature of anastasis for reversal of apoptosis. *F1000Research*, 6(0):43. https://doi.org/10.12688/f1000research.10568.1

Tang, H. M., Tang, H. L. M. (2018). Anastasis: Recovery from the brink of cell death. *Royal Society Open Science*, 5(9):180442. https://doi.org/10.1098/rsos.180442

Tang, H. L., Tang, H. M., Hardwick, J. M., Fung, M. C. (2015). Strategies for tracking anastasis, a cell survival phenomenon that reverses apoptosis. *Journal of Visualized Experiments*, (96). https://doi.org/10.3791/51964

Tang, H. L., Tang, H. M., Mak, K. H., Hu, S., Wang, S. S., Wong, K. M., Wong, C. S. T., Wu, H. Y., Law, H. T., Liu, K., Talbot, C. C., Lau, W. K., Montell, D. J., Fung, M. C. (2012). Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Molecular Biology of the Cell*, 23(12):2240-2252. https://doi.org/10.1091/mbc.E11-11-0926

Tateishi, M., Ishida, T., Mitsudomi, T., Sugimachi, K. (1991). Prognostic implication of transforming growth factor α in adenocarcinoma of the lung-an immunohistochemical study. *British Journal of Cancer*, 63(1):130-133. https://doi.org/10.1038/bjc.1991.26

Thai, A. A., Solomon, B. J., Sequist, L. V., Gainor, J. F., Heist, R. S. (2021). Lung cancer. *The Lancet*, 398(10299):535-554. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00312-3

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

Turner, J. G., Dawson, J., & Sullivan, D. M. (2012). Nuclear export of proteins and drug resistance in cancer. *Biochemical Pharmacology*, 83(8):1021-1032. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.12.016

Ulukaya, E., Acilan, C., Ari, F., İkitimur, E., Yilmaz, Y. (2011). A Glance at the methods for detection of apoptosis qualitatively and quantitatively. *Turkish Journal of Biochemistry*, 36(3):261-269.

Vringer, E., & Tait, S. W. G. (2019). Mitochondria and Inflammation: Cell Death Heats Up. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 100. https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00100

Wali, J. A., Masters, S. L., Thomas, H. E. (2013). Linking metabolic abnormalities to apoptotic pathways in beta cells in type 2 diabetes. *Cells*, 2(2):266-283. https://doi.org/10.3390/cells2020266

Weaver, B. A. (2014). How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell*, 25(18):2677-2681. https://doi.org/10.1091/MBC.E14-04-0916/ASSET/IMAGES/LARGE/2677FIG1.JPEG

Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., Currie, A. R. (1980). Cell Death: The Significance of Apoptosis. *International Review of Cytology*, 68(C):251-306. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62312-8

Xiaochuan, L., Jiangyong, Y., Ping, Z., Xiaonan, W., Lin, L. (2020). Clinical characteristics and prognosis of pulmonary large cell carcinoma: A population-based retrospective study using SEER data. *Thoracic Cancer*, 11(6):1522-1532. https://doi.org/10.1111/1759-7714.13420

Xu, Y., So, C., Lam, H. M., Fung, M. C., Tsang, S. Y. (2018). Apoptosis Reversal Promotes Cancer Stem Cell-Like Cell Formation. *Neoplasia*, 20(3):295-303. https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.01.005

Yamamoto, H., Shigematsu, H., Nomura, M., Lockwood, W. W., Sato, M., Okumura, N., Soh, J., Suzuki, M., Wistuba, I. I., Fong, K. M., Lee, H., Toyooka, S., Date, H., Lam, W. L., Minna, J. D., Gazdar, A. F. (2008). PIK3CA mutations and copy number gains in human lung cancers. *Cancer Research*, 68(17):6913-6921. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5084

Ying, M., Zhu, X. X., Zhao, Y., Li, D. H., Chen, L. H. (2015). KRAS mutation as a biomarker for survival in patients with non-small cell lung cancer, A meta-analysis of 12 randomized trials. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 16(10):4439-4445. https://doi.org/10.7314/APJCP.2015.16.10.4439

Zhang, J. H., Xu, M. (2000). DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Research*, 10(3):205-211. https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290049

Zhou, H. Z., Swanson, R. A., Simonis, U., Ma, X., Cecchini, G., Gray, M. O. (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 hyperactivation and impairment of mitochondrial respiratory chain complex I function in reperfused mouse hearts. *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology*, 291(2):H714-H723. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00823.2005