T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

VALPROİK ASİT VE BAİCALEİN KOMBİNASYONUNUN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA SİTOTOKSİK/APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

VIDA REZAYIFAR

KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DR. ÖĞR. ÜYESİ. NAZLIHAN AZTOPAL

İSTANBUL -2021

T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

VALPROİK ASİT VE BAİCALEİN KOMBİNASYONUNUN AKCİĞER KANSERİ HÜCRE SOYLARINDA SİTOTOKSİK/APOPTOTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

VIDA REZAYIFAR

KANSER BİYOLOJİSİ VE FARMAKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DR. ÖĞR. ÜYESİ. NAZLIHAN AZTOPAL

İSTANBUL -2021

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "Valproik asit ve Baicalein Kombinasyonunun Akciğer Kanseri Hücre Soylarında Apoptotik/ Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması" adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Vida REZAYIFAR

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarımda danışmanlığımı üstlenen ve eğitimim düzenli işleyişi amacıyla özveri gösteren ve desteğini, bilgisini ve tecrübesini hiçbir zaman benden esirgemeyen çok değerli danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Nazlıhan AZTOPAL'a,

Laboratuvar ve yüksek lisansım boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan ve yol gösteren çok değerli hocalarım Prof. Dr Engin ULUKAYA'ya ve Dr. Öğr. Üyesi Didem KARAKAŞ ZEYBEK'e,

Çalışmalarım boyunca benden desteklerini esirgemeyen Merve ERIKSA'ya ve Melda SARIMAN'a,

Her zaman arkamda duran ve eğitimim için maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen ve bugünlere gelmemde emeği olan çok sevgili aileme tüm içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

Vida REZAYIFAR

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI……..……..ii
ETİK BEYANI iii
TEŞEKKÜR.....iv
İÇİNDEKİLER.....v
TABLO LİSTESİ viii
ŞEKİL LİSTESİ.....ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ. .....*xi*
ÖZET.....xvi
ABSTRACT.....xvii
GİRİŞ 1
1. GENEL BİLGİLER..... 2
1-1. KANSERİN AYIRT EDİCİ ÖZELLİKLERİ 2
1-1-1. Akciğer Kanseri 7
1-1-1-1. Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi..... 8
1.1.2. KHDAK için Tedavi Seçenekleri 13
1.1.2.1. Ameliyat..... 13
1.1.2.2. Adjuvant Tedavi 13
1.1.2.2.1. Kemoterapi..... 13
1.1.2.2.2. Işın Tedavi 13
1.1.2.2.3. Biyobelirteçler 14
1.1.2.2.4. İmmün Tedavi..... 14
1.2. Hücre Ölüm Mekanizmaları 14
1.2.1. Apoptozis 14
1.2.1.1. Apoptozun Üç Ana Yolu 16
1.2.2. Nekroz..... 20
1.2.2.1. Apoptozis ve Nekroz Arasındakı Farklılıklar..... 20
1.2.3. Nekroz Benzeri Hücre Ölüm Mekanizmaları 20
1.2.3.1. Metyozis..... 20
1.2.3.2. Nekroptoz..... 21
1.2.3.3. NETozis..... 21

1.2.3.4. Pironekroz 21
1.2.3.5. Piroptoz 22
1.2.4. Diğer Hücre Ölüm Mekanizmaları 24
1.2.4.1. Otofajik hücre ölümü 24
1.2.4.2. Otozis 24
1.2.4.3. Feroptozis 24
1.2.4.4. Entozis 24
1.2.4.5. Paraptozis 24
1.3. Kullanılan Kimyasallar 24
1.3.1. Baicalein 24
1.3.2. Valproik Asit 27
2. MATERYAL METOD 30
2.1. MATERYAL 30
2.1.1. Kimyasal Maddeler 30
2.1.2. Sarf Malzemeler 31
2.1.3. Kullanılan Cihazlar 32
2.2. METOT 33
2.2.1. Bileşiklerin Hazırlanması 33
2.2.2. Hücre Kültürü Ve Besiyerleri 33
2.2.3. Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması 33
2.2.4. Hücre Soylarının Pasajlanması 33
2.2.5. Hemositometre İle Hücrelerin Sayımı 34
2.2.6. Hücre Stoklanması 34
2.2.7. Sulforhodamine B (SRB) Canlılık Testi 34
2.2.8. Akım Sitometri Analizleri 37
2.2.8.1. Anneksin V-FITC Analizi 37
2.2.8.2. Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Analizi 38
2.2.9. Migrasyon (Yara İyileşmesi) Testi 39
2.2.10. İstatistiksel Analiz 39
3. BULGULAR 40
3.1. SRB Canlılık Testi Bulguları 40
3.1.2. Baicalein'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi 40

3.1.2. Valproik Asit'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi 41
3.1.3. Kombinasyon Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi 41
3.2. Hücre Ölümü Analiz Bulguları 52
3.2.1. Anneksin V-FITC Testi Bulguları 52
3.2.2. Kaspaz 3/7 Aktivitesi 53
3.3. Kombinasyon Uygulamasının Hücrelerin Migrasyon Yeteneği Üzerine Etkisinin İncelenmesi 54
4. TARTIŞMA 56
5. SONUÇ 59
KAYNAKÇA 60
İNTİHAL RAPORU 94

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1: Skuamöz hücre karsinomada en çok saptanan mutasyonlar. 12
Tablo 2.1: AnneksinV/7-AAD boyama analizi. 38
Tablo 2.2: Kaspaz3/7 aktivitesinin analizi. 38
Tablo 3.1: A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Baicalein uygulaması sonrası GI_{50} (anti proliferatif etki), TGI (sitostatik etki) ve LC_{50} (sitotoksik etki) değerleri. 40
Tablo 3.2: A549 ve BEAS-2B hücrelerinde VPA uygulaması sonrası GI_{50} (anti proliferatif etki), TGI (sitostatik etki) ve LC_{50} (sitotoksik etki) değerleri. 41
Tablo 3.3: A549 ve BEAS-2B hücrelerinde 24 saat kombinasyon uygulaması sonrası Kombinasyon İndeks Değerleri. 45
Tablo 3.4: A549 ve BEAS-2B hücrelerinde 48 saat kombinasyon uygulaması sonrası Kombinasyon İndeks Değerleri. 48
Tablo 3.5: A549 ve BEAS-2B hücrelerinde 72 saat kombinasyon uygulaması sonrası Kombinasyon İndeks Değerleri. 51
Tablo 3.6: A549 ve BEAS-2B hücrelerinde IC_{50} ve IC_{90} değerleri. 52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1: Kanserin ayırt edici özellikleri. 7
Şekil 1.2: Akciğerin temel anatomisi ve 4 temel akciğer kanseri için genelde saptanmış bölgeler. 8
Şekil 1.3: Akciğer adekarsinomada belirlenen sürücü gen mutasyonları 11
Şekil 1.4: Akım sitometri yöntemiyle gösterilen PS translokasyonu 15
Şekil 1.5: Apoptozun üç ana yolu 19
Şekil 1.6: Nekroz benzeri hücre ölüm tipleri. 21
Şekil 1.7: Piroptoz, hücre ölümünde kaspaz-3'a bağlı hücre ölümünü gösteren moleküler mekanizma; klasik ve klasik olmayan yolların şematik diyagramı 23
Şekil 1.8: Baicalein'in kimyasal yapısı. 25
Şekil 1.9: HDAC inhibitörlerin saptanmış kombinasyon mekanizmaları 29
Şekil 3.1: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde Baicalein uygulaması sonrası hücre canlılığının doz ve zamana bağlı şekilde değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. 40
Şekil 3.2: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde VPA uygulaması sonrası hücre canlılığının doz ve zamana bağlı şekilde değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. 41
Şekil 3.3: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 24 saat kombinasyon uygulaması sonrası hücre canlılığının doza bağlı şekilde değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. 43
Şekil 3.4: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 24 saat kombinasyon uygulaması sonrası hücrelerin morfolojik görüntüleri (×4). 44
Şekil 3.5: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 24 saat kombinasyon uygulaması sonrası doz-etki eğrileri. 45
Şekil 3.6: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 48 saat kombinasyon uygulaması sonrası hücre canlılığının doza bağlı şekilde değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir.. 47
Şekil 3.7: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 48 saat kombinasyon uygulaması sonrası hücrelerin morfolojik görüntüleri (×4). 47
Şekil 3.8: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 48 saat kombinasyon uygulaması sonrası doz-etki eğrileri. 48
Şekil 3.9: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 72 saat kombinasyon uygulaması sonrası hücre canlılığının doza bağlı şekilde değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir.. 49
Şekil 3.10: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 72 saat kombinasyon uygulaması sonrası hücrelerin morfolojik görüntüleri (×4). 50
Şekil 3.11: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 72 saat kombinasyon uygulaması sonrası doz-etki eğrileri. 51
Şekil 3.12: A549 hücrelerinde VPA (2mM), BAİ (100uM) ve kombinasyon uygulaması sonrası Anneksin V pozitifliğinin değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik hücre yüzde

değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (a: Canlı hücreler; b: Erken apptotik hücreler; c: Geç apoptotik hücreler; d: Nekrotik hücreler). 53
Şekil 3.13: A549 hücrelerinde VPA (2mM), BAİ (100uM) ve kombinasyon uygulaması sonrası Kaspaz 3/7 aktivitesinin değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik hücre yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (a: Canlı hücreler; b: Erken apptotik hücreler; c: Geç apoptotik hücreler; d: Nekrotik hücreler). 54
Şekil 3.14: A549 hücrelerinde VPA (0.5mM), BAİ (25uM) ve kombinasyon uygulaması sonrası yara iyileşme süreci (0-96 saat). 55

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
7-AAD	: 7-Amino Aktinomisin D
ABCA1	: ATP Bağlayıcı Kaset Taşıyıcı
ADC	: Adenokarsinoma
AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
ALK	: Anaplastik Lenfoma Kinaz
ALK	: Anaplastik Lenfoma Kinaz
Apaf1	: Apoptotik Proteaz Aktifleştirici Faktör 1
APC	: Antijen Sunan Hücreler
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
ATF6	: Etkinleştirici Transkripsiyon Faktörü 6
ATM	: Ataksi Telejiektazi Mutasyona Uğramış Geni
ATP	: Adenozin Tri Fosfat
ATR	: Ataksia Telenjiektazi ve İlgili protein
ATRA	: All-Trans Retinoik Asit
BAD	: Bcl-2 ile İlişkili Ölüm Destekleyicisi
BAİ	: Baicalein
BAX	: Bcl-2 ile İlişkili X Proteini
Bcl-2	: B Hücre Lenfoma 2
BİD	: BH3 Etkileşimli Domaini Ölüm Agonisti
Bmf	: Bcl-2 Değiştirici Faktör
BOK	: Bcl-2 ile İlişkili Yumurtalık Öldürücü
BS	: *Scutellaria baicalensis*
CAD	: Kaspazla Aktive olan Deoksiribonükleaz
CARD	: Kaspaz Aktifleştirme ve Güçlendirme Domaini
CDC25A	: Hücre Bölünme Döngüsü 25 A
CDK	: Siklin Bağımlı Kinaz
CDKI	: CDK İnhibitörleri

CDKN2A	: Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü 2A
CHK2	: Kontrol Noktası Kinaz 2
CHOP	: C/EPP Homolog Proteini
C-SRC	: Proto-onkogen tirozin -protein Kinaz SRC
CTL	: Sitotoksik T Hücreleri
CTLA4	: Protein 4 İlişkili Sitotoksik T Lenfositler
DD	: Ölüm Domaini
DDP	: Sisplatin
DDR2	: Diskoidin Domaini Reseptör tirozin kinaz 2
DISC	: Ölüme Neden olan Sinyal Kompleksi
DNA	: Deoksi Ribo Nükleik Asit
DNA-PK	: DNA Bağımlı Protein Kinazlar
DNMTI	: DNA Metil Transferaz İnhibitörü
DR	: Ölüm Reseptörü
Drp1	: Dinamin ile İlgili Protein 1
E/M	: Epitelyal/Mezenkimal
ECM	: Hücre Dışı Matriks
EGFR	: Epitelyal büyüme faktörü reseptörü
EMT	: Epitelyal- Mezenkimal Dönüşüm
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERK Kinaz	: RAS ile İndüklenen Hücre Dışı Sinyalleri Düzenleyen
FADD	: FAS İlişkili Ölüm Domaini Proteini
FAS L	: FAS Ligandı
FDA	: Gıda ve İlaç İdaresi
FGFR1	: Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 1
FHIT	: Kırılgan Histidin Triad Proteini
GADD-34	: DNA Hasar Proteini 34
GDP	: Guanozin Di Fosfat
GSDMD	: Gasdermin D
GSDME	: Gasdermin E

GTP	: Guanozin Tri Fosfat
HDAC	: Histon Dasetilaz
HDAI	: Histon Deasetilaz İnhibitörü
HER2	: İnsan Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü 2
HPV	: İnsan Papiloma Virüsü
HRAS	: Harvey Sıçan Sarkom Virüsü
ICAD	: Kaspazla Aktive olan Deoksiribonükleaz İnhibitörü
ICI	: İmmün Kontrol Noktaları İnhibitörleri
IRE1	: İnozitol Gerektiren Enzim 1
JAK	: Janus Kinaz
JNK	: C-Jun Terminal Kinaz
K	: Potasyum
KHAK	: Küçük Hücreli Adeno Karsinoma
KHDAK	: Küçük Hücre Dışı Adeno Karsinoma
KRAS	: Kirsten Sıçan Sarkoma Onkogenik Homologu
LKB1	: Karaciğer Kinaz B1
LOX	: Lipo Oksijenaz
MAPK	: Mitogen Aktifleştirici Protein Kinaz
MBF	: Mlu1 Bağlayıcı Faktör
MCI-1	: Mitokondriyal Kompleks 1
MDSCS	: Myeloid Kökenli bastırıcı Hücreler
MET	: Mezenkimal-Epitelyal Dönüşüm
MHC	: Majör Histo Kompatibilite Kompleksi
MMP2	: Matriks Metalo Proteinaz 2
MMP9	: Matriks Metalo Proteinaz 9
MtDNA	: Mitokondriyal DNA
MTOR	: Rapamisin Protein Kompleksinin Memeli Hedefi
Na	: Sodyum
NAD	: Nikotin Amid Adenin Di Nükleotid
NADPH	: Nikotin Amid Adenin Di Nükleotid Fosfat
NET	: Nötrofil Hücre Dışı Tuzak

NF-KB	: Nükleer Faktör Kappa B
NK	: Doğal Katiller
NRAS	: Nöroblastoma RAS Viral Onkogen Homologu
P13K	: Fosfatidil İnozitol 3 Kinaz
PAD4	: Protein Arginin Deaminaz 4
PARP	: Poli ADP Ribo Polimeraz
PCD	: Programlanmış Hücre Ölümü
PD-1	: Programlanmış Hücre Ölüm Proteini 1
PDGFRA	: Trombosit Kökenli büyüme faktörü reseptörü
PD-L1	: Programlanmış ölüm ligandı 1
PERK	: Protein kinaz RNA benzeri endoplazmik retikulum kinaz
PIP2	: Fosfatidil inozitol 4,5- bis fosfat
PIP3	: Fosfatidil inozitol 3,4,5-tri fosfat
PS	: Posfatidilserin
PTEN	: Fosfataz ve tensin homolog proteini
RAF	: Seri şekilde hızlandırılmış fibrosarkoma
RASSF1A	: RAS ilişkili protein 1 izoformu domaini
RB	: Retinoblastoma
RET	: Transfeksiyon sırasında yeniden düzenlenen gen
SBRT	: Stereotaktik vücut radyasyon tedavisi
SOX2	: Cinsiyet belirleme bölgesi kutu 2
STAT	: Sinyal dönüştürücü transkripsiyon proteini
STK11	: Serin Teronin kinaz 11
TCA	: Tri karboksilik asit
TGFB	: Dönüştürücü büyüme faktörü B
TKI	: Tirozin kinaz inhibitörü
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TNFR	: Tümör nekroz faktör reseptörü
TNFRS25	: DR3, ölüm reseptörü 3
TRADD	: TNFR1-1ilişkili ölüm domaini
TRAIL	: TNF ilişkili apoptozis indükleyici domain

Treg	: Düzenleyici T hücreleri
TSA	: Trikostatin
TSP1	: Trombospondin 1
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VPA	: Valproik asit
ZEB1	: Çinko parmak E-kutu bağlayıcı homeobox 1

ÖZET

Rezayifar, V. (2021). Valproik Asit ve Baicalein Kombinasyonunun Akciğer Kanseri Hücre Soylarında Sitotoksik/Apoptotik Etkilerinin Araştırılması. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Dünyadaki en yaygın malignitelerden biri olan akciğer kanseri, kanser ile ilişkili ölümlerde birinci sırada yer alır. Valproik asit (VPA) bir anti-epileptik olarak klinikte uzun süredir kullanılmaktadır ve bir HDAC inhibitörü olarak hem mono terapi hem de kombinasyon terapide etkinliği birçok ajan varlığında araştırılmıştır. Ancak, akciğer kanserinde, VPA'nin mono terapide sitotoksisitesi etkileyici değildir. Baicalein (BAİ)'in çeşitli kanserlerde sitotoksik etkisi tanımlanmıştır ve kombinasyon tedavilerde önemli biyoaktif tavır sergileyen doğal bir bileşiktir. Bu nedenle, çalışmamızda, VPA ve BAİ'yi birlikte kullanarak sitotoksik aktiviteyi arttırmak ve hücre ölümünü uyarmak amaçlanmıştır. Mevcut tez çalışmasında, Valproik asit ve Baicalein kombinasyonunun A549 ve BEAS-2B akciğer hücre soylarındaki etkisininin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, A549 ve BEAS-2B akciğer hücre soylarında, VPA ve BAİ'nin hücre canlılığı üzerine etkisi SRB canlılık testi ile değerlendirildi ve büyüme eğrisi oluşturularak GI_{50}, TGI ile LC_{50} değerleri hesaplandı. VPA ve BAİ'nin eşlenik dozları ile 24-72 saat kombinasyon çalışmaları gerçekleştirildi. Bu analizlerin sonucunda kombinasyon indeksi değerleri belirlendi ve IC_{90}'a en yakın doz (100uM+2mM), A549 hücre hattında sinerjizm ve BEAS-2B hücre hattında antagonist etki sergilediği gözlendi. Bu sebeple, 24-48 saat Anneksin V -FITC ve Kaspaz 3/7 aktivitesi gibi apoptotik analizleri bu doz ile gerçekleştirildi. Bu analizler sonrası kombinasyon tedavinin A549 hücre hattında erken ve geç dönem apoptotik hücre yüzdesi zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Ayrıca, IC_{50} değerine en yakın kombinasyon dozu (25uM+0.5mM) hücrelerin migrasyon yeteneğini araştırmak için seçildi. Kombinasyon tedavi uygulanan hücrelerde, ajanların tek başına etkisine kıyasla, yara kapanma hızında belirgin bir değişiklik gözlenmedi. Sonuç olarak bu kombinasyon modelinin farklı kanser hücre soylarında denenerek klinik translasyonu için etki alanlarının genişletebileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Akciğer kanseri, Valproik asit, Baicalein, Hücre ölümü.

ABSTRACT

Rezayifar, V. (2021). Investigation of Cytotoxiıc/Apoptotic Effect of Valproic Acid and Baicalein Combination in Lung Cancer Cell Lines. Istinye University, Institute of Health Science, Cancer Biology and Pharmacology. Master Thesis. Istanbul.

Lung cancer, one of the most common malignancies in the world, ranks first in cancer-related deaths. Valproic acid (VPA) has been used clinically for a long time as an anti-epileptic and its efficacy as an HDAC inhibitor in both monotherapy and combination therapy has been investigated in the presence of many agents. However, its cytotoxicity as monotherapy is not impressive in lung cancer. The cytotoxic effect of baicalein (BAI) has been described in various cancers and is a natural compound that exhibits an important bioactive attitude in combination therapies. Thus, in the present study, we aimed to increase the cytotoxic activity of VPA and BAI by combination therapy and stimulate cell death. For this purpose, the SRB viability test was performed to examine the effect of VPA and BAI on cell viability of A549 and BEAS-2B cells, and GI50, TGI, and LC50 values were calculated to obtain a growth curve. Following 24-72 hours combination studies, combination index values were determined and it was observed that the dose closest to IC90 (100uM+2mM) showed synergism in the A549 cell line and antagonism in the BEAS-2B cell line. Thus, 24-48 hours apoptotic analyzes such as Annexin V -FITC and Caspase 3/7 activity were performed with the relevant dose. As a result, the percentage of early and late apoptotic cells increased by combination therapy with time in the A549 cell line. The combination dose closest to the IC_{50} value (25uM+0.5mM) obtained in this cell line was chosen to investigate the migration ability of the cells. No significant change in wound healing was observed in cells treated with the combination treatment compared to the effect of agents alone. In conclusion, this combination strategy can be tested in different cancer cell lines and may expand the domains for clinical translation.

Keywords: Lung cancer, Valproic acid, Baicalein, Cell death.

GİRİŞ

Akciğer kanseri dünya çapında en sık rastlanan kanser türüdür (Torre ve ark., 2016). Akciğer kanseri dünyada kanser ilişkili ölümlerde birinci sıradadır. Yılda 1.8 milyon akciğer kanseri teşhis edilir ve 1.6 milyon kişi bu kanser sebebiyle hayatını kaybeder (Ferlay ve ark., 2015). Bu türünün iki bilinen alt tipi vardır: Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK). Bu alt tiplerden KHDAK daha yaygın bir kanser tipidir ve adenoma karsinoma, skuamöz hücre karsinoması ve büyük hücreli akciğer karsinom bu alt tipinin en çok tespit edilen vaka tipidir (Bertoncello, 2021). Akciğer kanserini azaltmak için birçok tedavi türü kullanılmıştır ama henüz terapi seçenekleri azdır bu yüzden immün tedavi, kemoterapi, cerrahi, ışın tedavi ve hedefe yönelik tedavi gibi çeşitli tedavi seçenekleri kullanılmıştır. Bu tedaviler genelde tam biyolojik karakter gösteren hastalarda kullanılan pahalı, limitli ve çeşitli yan etkileri olan tedavilerdir. Bu yüzden moleküler mekanizmasını araştırmak ve ona göre kombine tedavi geliştirmek yeni bir umut olabilir (Cukier ve ark., 2017; Kroschinsky ve ark., 2017). Bu araştırmada, flavonoid bir bileşik olan Baicalein ve kısa zincirli yağlı asit olan Valproik asit (VPA) kullanılacaktır. Baicalein, otofaji arttıran, invazyon ve metastazı inhibe eden, anti-kanser, anti-inflamtuar, anti-viral, anti-proliferatif, ayrıca hücre döngüsünü durdurma, anti-hipersensitif, ateş düşürücü, anti-anjiyojenez, anti- fibroz, anti-mikrobiyal özelliklere sahiptir (Cathcart, 2016; Bie ve ark., 2017; Deng ve ark., 2020). Anti-kanser etkisi birçok kanserde, örneğin mesane, akciğer, meme, yumurtalık, karaciğer, kolon, gastrik, pankreas, prostat saptanmıştır (Cathcart, 2016; Deng ve ark., 2020). VPA FDA-onaylı bir HDAC (histon deasetilaz) inhibitörüdür ve en önemli hedefe yönelik tedavi ajanlarından biridir çünkü kanserde HAT (histon asetil transferaz) ve HDAC (histon deasetilaz) dengesinde değişiklikler görünür (Santini ve ark., 2007). HDAC'lar kanser hücrelerinde fazla eksprese olarak karsinojen proteinlerin ekspresyonunu değiştirir ve anti-kanser genleri baskılar ve böylece tümör ilerler (Mottet ve Castronovo., 2008). VPA hücre döngüsünü durdurur, farklılaşmayı uyarır ve tedavi yanıtını arttırır, metastaz ve anjiyogenezi inhibe eder (Diederich ve ark., 2010). HDAC inhibitörleri tek veya kombine olarak epigenetik düzelticiler, sitotoksik kemoteapi ajanları ve immün inhibitörler ile beraber uygulanabilir. Örneğin, VPA, DNA metil transferaz inhibitörü (DNMTi), All trans retinoik asit (ATRA) ve birçok ajan ile beraber

kullanılmıştır (Brodie ve Brandes.,2014). Bu tez kapsamında ise gerçekleştirilen literatür taramaları sonucunda Valproik asit ve Baicalein kombinasyon tedavisinin Apoptotik/ sitotoksik etkisi üzerine herhangi bir çalışma ile karşılaşılmamıştır. Bu amaçla, A549 akciğer kanseri hücre hattı (KHDAK) kullanılarak hücre canlılığı üzerine etkisi ve kombinasyon etkinliği (sinerjistik, aditif veya antagonistik) değerlendirilmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

Kanser toplumda önde gelen sağlık sorunları arasında yer alır ve dünya çapında ikinci ölüm sebebi olarak saptanmıştır (Siegel ve ark., 2013). Doku düzeyinde gerçekleşen çeşitli bir hastalık grubudur ve bu durum teşhis ve uygun tedaviyi zorlaştırır (Meacham ve Morrison., 2013; Fisher ve ark., 2013). Meme, tiroit, kolon, uterin korpus, bronş, rektum ve akciğer kanseri kadınlarda daha yaygın görülürken erkeklerde daha çok prostat, bronş, idrar kesesi, akciğer ve rektum kanser türleri saptanmıştır (Siegel ve ark, 2016). Hücre fonksiyonu çeşitli gen mutasyonları sonucunda değişir ve kanser oluşturabilir. Çevredeki kimyasal maddeler dolaylı ya da doğrudan karsinojen rolü oynayarak hücre çekirdeği ve sitoplazmasına etki ederek genetik mutasyonlara yol açabilir (Poon, 2014; Cumberbatch ve ark., 2015). Diğer karsinojen faktörler arasında bakteri, radyasyon ışınları ve virüsler yer alır. Kanser önemli genlerin işlevini değiştirir ve hücresel ilişkileri etkiler. Bu yüzden hücre döngüsü etkilenir ve aşırı proliferasyon ile sonuçlanır (Cigudosa ve ark., 1999; Seto ve ark., 2010). Bu süreçte, proto-onkogenlerin geçirdikleri çeşitli mutasyonların sonucunda onkogenlere dönüşmesi rol oynar ve hücre için önemli tehlike arz eder (Shtivelman ve ark.,1985). Ayrıca nükleozom pozisyonu histon modifikasyonları, DNA metilasyonu kanserde rol oynayan önemli epigenetik modifikasyonlar arasındadır (Álvarez-Buylla ve ark., 2008; Portela ve Esteller., 2010).

1.1. KANSERİN AYIRT EDİCİ ÖZELLİKLERİ

Kanserin 10 temel ayırt edici özelliği vardır: **(Şekil 1.1)**.

1- Büyüme sinyali özerkliği: Normal hücreler bölünmek için büyüme faktörlerinden gelen sinyallere duyarlıdır. Bu sinyaller hücre sayısı, yapı ve fonksiyonunu kontrol etmek için hücre döngüsü ve büyümesini gözetlerler. Ancak, kanser hücreleri bu sinyallere bağımlı değildir ve bağımsız bir şekilde bölünebilir. Kanser hücreleri büyüme faktörü kısıtlamasına aşırı hassastır ve büyüme faktörleri yolakları kısa devre yaparak

düzensizleşmiştir (Hynes ve MacDonald., 2009; Lemmon ve Schlessinger., 2010). Bu nedenle, proliferatif sinyalleşme yeteneği kazanabilirler. Kanser hücreleri tümör ilişkili stromadaki destekleyici normal hücreleri uyarlamak adına sinyal gönderirler ve onlarda büyüme faktörü ile kanser hücrelerini besleyerek karşılık verir (Bhowmick ve ark., 2004; Cheng ve ark., 2008).

2- Büyümeyi inhibe eden sinyallerden kaçma: Normal hücreler homostaziyi korumak amacıyla hücre büyümesini baskılayan inhibitör sinyallere yanıt verirler (Mosesson ve ark., 2008; Wertz ve Dixit., 2010) fakat kanser hücreleri bu sinyallerden kaçarlar. Örneğin retinablastoma (Rb) gibi tümör baskılayıcı bir genden kaçar çünkü bu gen büyüme ve çoğalmayı durum normalleşmeye kadar durdurur (Lipinski ve Jacks., 1999). p15, p16 anti-onkogenler siklin kinaz CDK4'ü inhibe ederek E2F'i baskılar ve proliferasyonunu durdurur. HPV virüsü bu yolu baskılayarak kansere yol açabilir. Gen bekçisi diye tanımlanan p53 en önemli büyüme inhibitörlerinden biridir ve mutasyonu birçok kanserde saptanmıştır. Isı şoku proteinlerinin azalması, oksidatif stres, DNA hasarı ve onkogenlerin etkisiyle etkinleşebilir ve DNA hasarına bağlı olarak içsel ve dışsal apoptozis yolaklarını tetikleyebilir (Vousden ve Lane., 2007).

3- Bağışıklık sisteminden kaçma: İmmün sistemi kanser hücrelerini yok edebileceği için kanser hücreleri bu yanıttan kaçarlar. Ayrıca kanser hücreleri immün sistemi uyarmazlar, bu bağışıklığa yanıt verebilir ya da yıkıma müdahale edebilirler (Vajdic ve van Leeuwen., 2009). Kanser hücreleri bu yönde MHC sınıf I ya da sınıf II kaybı (metastaz döneminde değiştirebilir), FASL ekspresyonunu ile lenfositlerin öldürmesi ve GFB- IDO gibi sitokin ve immün etkinleştiren enzimlerin salgılanması gibi mekanizmalar sayesinde bağışıklık sisteminin tümöre erişimini kısıtlar. Son yapılan araştırmalar lenf ya da tümör dokusundaki dendritik hücrelerinde immün sistemden kaçışta rol oynadığı anlaşılmıştır (Polak ve ark., 2009). Ayrıca miyeloid kökenli baskılayıcı hücreler (MDSCS) ve Treg'ler gibi immün baskılayıcıları etkinleşerek sonuçta CTL'lerin azalmasına yol açar (Ostrand-Rosenberg ve Sinha., 2009; Mougiakakos ve ark., 2010).

4- Sınırsız çoğalma potansiyeline sahiptirler (Telomeraz aktivitesi): Normal hücreler hücre sayısı iki katına çıktığı zaman yaşlanırlar. Bunun sebebi DNA replikasyonu esnasında, kromozom uçlarında bulunan telomerlerin (heksa nükleotidlerden oluşurlar) dönüşümsüz şekilde kısalmasıdır. Bu sebeple yaşlılık adı

verilen süreç başlar, hücre yaşar ama yayılamaz ve hücre ölümüne doğru gider. Kanser hücreleri telomer uzunluklarını telomerik uçlarına telomer tekrar segmentleri ekleyen ve telomeraz diye tanımlanan DNA polimeraz aktivitesi sayesinde korurlar. Bu sebeple sınırsız büyüme potansiyeline sahip olurlar. Bu enzimin etkinliği tümör yararınadır çünkü apoptozis ve yaşlanmaya karşı dirençli kılar. Enzimin baskılanması ise telomerlerin kısalması ve sınırsız proliferasyonu engeller (Zhang ve ark.,2004; Blasco., 2005; Ince ve ark., 2007).

5- İnflamasyonu arttırırlar: Birçok tümör, inflamatuar immün sistem hücreleri içerirler. İnflamasyon, immün sistemin doğal bir tepkisidir ve kanserin temel özelliklerinden biridir. İnflamatuar hücreler, proliferasyonu, pro-anjiojenik faktörleri, hücre ölümünü sınırlayan yaşam faktörlerini ve Epitelyal-mezenkimal dönüşümü (EMT)indükleyen sinyalleri artırırlar. Ayrıca inflamatuar hücreler tarafından salgılanan ROS mutajenik özelliğe sahiptir ve kanserin kötü huylu tümöre gelişimini hızlandırabilir (Colotta ve ark., 2009; DeNardo ve ark., 2010).

6- İnvazyon ve metastaz: Normal hücreler vücuttaki yerlerini korurlar ama kanser hücrelerinin migrasyonu en önemli ölüm nedenlerinden biridir (Cavallaro ve Christofori., 2004; Berx ve van Roy., 2009)**.** EMT embriyonik gelişimini kolaylaştıran bir çeşit fenotip dönüşümüdür. Embriyogenez döneminde epitelyal hücreler bağlantı ve polaritesini kaybeder ve mezoderm gibi göçmen mezenkimal hücrelere dönüşürler (Nieto ve ark., 2016). MET yani mezenkimal-epitelyal dönüşüm; böbreklerin embriyonik gelişimi sırasında mezenkimal hücrelerin böbrek epiteline farklılaşması ile nefrogenezi oluştururlar (Hay ve Zuk., 1995). Yetişkinlerde patofizyoloji, doku fibrozu, yara iyileşmesi ve kanser ilerlemesinde rolü vardır (Kalluri., 2009; Kalluri ve Weinberg., 2009). Kanser hücrelerinde; hipoksik durumlar, ECM komponentleri, ekzozom ve hepatosit büyüme faktörü, transforming büyüme faktörü üyeleri ve fibroblast büyüme faktörü gibi çözünebilir faktörler EMT'yi düzenleyebilir (Saitoh, 2015). E-kadherin baskılanması birçok kötü huylu tümörde Zeb1 ailesi, snail ailesi ve twist gibi EMT transkripsiyon faktörleri tarafından transkripsiyonel veya post transkripsiyonel ve epigenetik düzeyde düzenlenir ve böylece agresif fenotipe sahip bir tümör ortaya çıkarırlar. (Horiguchi ve ark., 2012; Saitoh., 2018). Hücresel plastisite EMT ve MET fenotipleri arasında gerçekleşir ve kanser ilerlemesinde rol oynar. EMT'de mezenkimal faktörler artar, hücreler komşu hücrelerden ayrılır, hücre dışı matrikse daha rahat

bağlanır, polaritesini kaybeder, aktin stress liflerinin yeniden düzenlenmesi sonucunda iğ formu kazanır ve hareket özelliği artar. Böylece invazyon ve metastaz'da rol oynar (Scheel ve Weinberg., 2012; Jie ve ark., 2017).

Metastaz epitelyal özelliklerini kaybetmiş ve mezenkimal özellikler kazanmış kanser hücreleri tarafından gerçekleşir. Bu yüzden geride kalan herhangi bir epitelyal karakter sahip hücreler toplu hücre göçü gerçekleştirir ve ECM ye bağlanması artar (Yu ve ark., 2013). Bu yüzden E/M karakterine sahip hücreler; yani EMT'yi tamamlamamış hücreler metastaz için daha yüksek risk taşırlar (Lintz ve ark., 2017). Toplu migrasyonda hücre-hücre bağlantısı korunur çünkü hala epitelyal adezyon molekülleri eksprese olmaya devam ederler. Ama tekli migrasyonda ya da mezenkimal migrasyonda hücreler fibroblast benzeri morfolojilere sahiptirler ve integrin ilişkili hücre -ECM bağlantısına bağımlıdırlar. Hareket özelliği kazanmış hücreler lenf ve kan damarlarına hücum edip intravazasyon gerçekleştirirler. Kan dolaşımında hayatta kalmaya çalışırlar ve bu hücreler uzak organlara ekstravazasyon yaparak ulaşırlar (Jie ve ark., 2017). İkincil bölgede de MET gerçekleştirir ve epitelyal özellikleri tekrar elde edip ikincil tümörü oluştururlar. EMT sonrası ikincil tümörü oluşturan kanser hücrelerinin hareketlilikleri artar, kemoterapi ilaçları ve çeşitli stresler dirençlidir, yaşlanma ve anoikisi inhibe etme özellikleri kazanırlar, kanser kök hücre ve bağışıklık baskılayıcı özellikler sayesinde daha agresif bir fenotip gösterirler (Nieto.,2017; Furuya ve ark., 2017).

7- Anjiogenez (yeni kan damarlarının oluşumu): Normal hücreler besin ve oksijen sağlamak için kan damarlarına bağımlıdırlar ama bu damarların mimarisi yetişkin bir bireyde az-çok sabit durumdadır. Kadınların üreme döngüsünde ve yara iyileşmesi şartlarında anjiogenez geçici olarak başlayabilir ama kanser hücreleri bu neoplastik yapının hayatta kalması ve çoğalabilmesi için anjiogenezi indüklerler. Besin ve oksijene daha rahat erişimin yanı sıra karbon dioksit tahliyesi ve metabolik atık için tümör anjiogenez yani tümör ile ilişkili neo vaskülarizasyon'a yani yeni kan damarlarının filizlenmesine ihtiyaç duyarlar. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) anjiogenezi indükleyen ve trombospondin (TSP1) anjiogenez baskılayan faktörlerden en önemlisidir (Ferrara, 2009; Olive ve ark., 2009). Kanser hücreleri hâlihazırda bulunan damarlara yakın pozisyonda büyürler ve onları da tümöre dahil ederler. Damarların etrafındaki adezyon molekülleri tarafından desteklenirler. Tümör içindeki zayıf hidrodinamik güçler sızdıran kan damarlarını oluşturur ve bu sıvı akışı tümör beslenmesinde önemli rol oynar.

Ayrıca, bazı neoplastik hücrelerin endotelyal hücre özelliklerini taklit edip kanallar oluşturduğuna dahil bazı kanıtlar elde edilmiştir (Folberg ve ark., 2000).

8- Genomik kararsızlık ve mutasyonlar: Genomik veri değişikliği kanserin temel özelliklerindendir. Hatalı DNA onarımı bu istikrarsızlığa neden olabilir (Negrini ve ark., 2010; Salk ve ark., 2010)**.**

9- Hücre ölümünden kaçış: Normal hücreler DNA hasarından sonra apoptozis'e yönelirler ve bu sayede vücuttan atılırlar ama kanser hücreleri apoptozis'den kaçarak hayatta kalmayı başarırlar. Apoptozisi indükleyen stres faktörleri arasında onkogen sinyalleşme, DNA hasarı ve hiper metilasyon büyük önem arz ediyor (Lowe ve ark., 2004; Adams ve Cory., 2007). Kanser hücreleri Bcl-2 ailesini yeniden düzenler böylece anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu artırarak pro-apoptotiklerin ekspresyonunu azaltır. Ayrıca ölüm reseptör sinyallerini ve p53 gibi tümör baskılayıcı proteinlerin fonksiyonunu bozar ve kaspazları düzensizleştirerek ölüm sürecinden kaçar, çoğalır, kendini geliştirir ve kemoterapiye karşı direnç gösterir (Pistritto ve ark., 2016).

10- Enerji metabolizmasını yeniden düzenler: Kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalması biyosentetik ve yakıt artışını gerektirir bu sebeple enerji metabolizmasını kontrol edip yeniden ayarlar. Kanser hücreleri biyosentetik ara maddeleri elde etmek için oksijen varlığında bile glikolizi (aerobik gikoliz) tercih ederler (Warburg, 1956a).

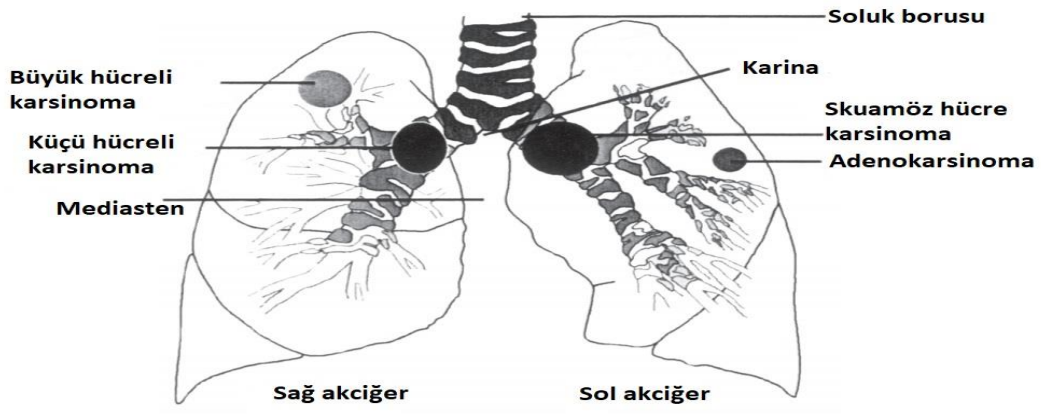


Şekil 1.1: Kanserin ayırt edici özellikleri (Hanahan ve Weinberg., 2011).

1.1.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri kadın ve erkeklerde en ölümcül kanserler arasındadır. Akciğer tanısı konan hastaların yarısından fazlası bir yıl içinde hayatını kaybediyor ve 5 yıllık sağ kalım oranı %16.8 civarındadır (Samet, 2005). Bu kanserin iki ana alt tipi, KHAK ve KHDAK, vardır. KHAK %15-20 ve KHDAK %80-85 oranında yaygındır. KHDAK, skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinom olarak üç ana gruba ayrılır **(Şekil 1.2)**. Adeno karsinom KHDAK'nin %40 oluşturur. Bu kanser daha çok sigara içenlerde saptansa da sigara içmeyenlerde de sık olarak görülmüştür (Travis ve ark., 2005; Ohta ve ark., 2006). Diğer KHDAK türlerine göre daha yavaş büyür. Skuamöz hücre karsinoması %30-%35 oranında görünür ve ikinci yaygın KHDAK türüdür. Sigara içenlerde bronş tüplerindeki

epitelyal hücrelerindeki skuamöz hücrelerinin erken varyasyonu nedeniyle sık olarak görülebilir (Kenfield ve ark., 2008). Büyük hava yollarını etkileyen merkezi bir tümördür. Büyük hücreli karsinom %5-10 üçüncü yaygın KHDAK ve agresif bir şekilde farklılaşmış türüdür (Brambilla ve ark., 2004). Kesin tanı için küçük biyopsi kullanılamaz ve tümörün tamamamını ıincelemek gerekir (Bombí ve ark., 2002).



Şekil 1.2: Akciğerin temel anatomisi ve 4 temel akciğer kanseri için genelde saptanmış bölgeler (Cersosimo, 2002).

1.1.1.1. Akciğer Kanserinin Moleküler Biyolojisi

Akciğer kanserinin moleküler temeli heterojen ve karmaşıktır. Moleküler düzeyde farklılıkları anlamanın asıl amacı tanı, prognoz ve tedaviye sağladığı katkıdır. Epigenetik değişiklikler, tümör baskılayıcı genlerin engellenmesi ve büyüme arttırıcı genlerin aktivasyonu ile akciğer kanser gelişiminde rol oynayan içsel faktörlerdir. Akciğer kanserine neden olan bu biyokimysal yolaklar tedavi geliştirme amacıyla kullanılır. Birçok kötü huylu tümörde olduğu gibi akciğer kanserinde de epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), kirsten sıçan sarkoma onkogenik homoloğu (KRAS), ALK, BRAF, MEK-1, HER 2, MET ve transfeksiyon sırasında düzenlenmiş (RET) gibi büyümeyi destekleyici proteinlerde nokta mutasyonlar veya yapısal yeniden düzenlenme sonucu ortaya çıkan genetik değişiklikler sonucu gen amplifikasyonu ve beraberinde onkogen aktivasyonu gerçekleşir. Ayrıca tensin homojisine sahip fosfataz (PTEN), p53 ve LKB-1 gibi tümör baskılayıcı genlerin genetik değişiklikler sonucu baskılanması görünebilir (Lynch ve ark., 2004; Larsen ve Minna., 2011). KHDAK'de promotör hipo/ hiper metilasyonu ve bazı kodlamayan miRNA'lar gibi epigenetik değişiklikler gercekleşebilir. Örneğin CDKN2A, FHIT, APC, P16 ve RASSF1A'ler CpG bölgelerinde metilasyona maruz kalırlar (Tessema ve Belinsky., 2008; Leng ve ark., 2012). KHDAK

adenokarsinimada ki en önemli gen değişikleri EGFR, KRAS, ALK, PI3K /AKT /MTOR ve PTEN'dir **(Şekil 1.3)** (Baser ve ark., 2006).

KRAS: KRAS proto-onkogen ailesinin (NRAS-KRAS-HRAS) bir üyesidir ve hücre proliferasyonu, farklılaşması ve sağ kalımı düzenlemekte önemli bir rol oynar. (Downward., 2003) Bunlar arasında en yaygın olan KRAS mutasyonudur ve HRAS ve NRAS mutasyonları nadir görünür (Krapcho ve ark.,2016**).** KRAS'daki aktifleştirici mutasyonlar adeno karsinoma vakalarının %25-40 oluşturur ve en yaygın mutasyonlardan biri olarak tanımlanır fakat büyük hücreli kasinom ve KHAK'da yok ya da nadir olarak görünür (Sequistve ark., 2011; Rekhtman ve ark., 2012**).** Bu mutasyon erkeklerde kadınlarla kıyasla ve sigara tüketen bireylerde daha sık rastlanır (Ding ve ark.,2008). Normal şartlarda RAS proteinleri GDP bağlı ve inaktiftir fakat büyüme faktörü reseptörlerinin aktifleşmesi sonucunda GTP'ye bağlanır ve aktifleşirler. RAS-GTP aktifleşmesi mitogenle aktif olan protein (MAPK), RAS/RAF/MEK/MAPK ve PI3K /AKT/mTOR birçok aktivasyonu da beraberinde getirir. KRAS çeşitli büyüme faktörleri tarafından indüklenen sinyal transdüksiyonünü ortadan kaldırarak büyüme faktörü vasıtasıyla gerçekleşen sinyalleşme ihtiyacını ortadan kaldırır. GTPaz aktifleştirici mutasyonlar sayesinde RAS-GTP'nin GDP'ye dönüşümü ve inaktivasyonu engelleyerek büyüme destekleyici yolaklarının sinyalini artırır (Karnoub ve Weinberg., 2008). RAS/RAF/MEK/MAPK sinyal transdüksiyon kaskadı birçok akciğer kanserinde rol oynar.

EGFR: Kanser hücreleri kanser kök hücreden kaynaklanırlar ve egzojen ve endojen yollardan kendi kendilerine büyüme sinyali yeterliliğine sahiptirler. Amfiregulin ve epiregulin gibi EGFR lignd'ları bu egzojen sinyaller arasındadır. EGFR'de endojen sinyaller ise etkinleştirici mutasyonlar sonucu ortaya çıkarlar (Knudson, 1978). EGFR hücre dışı ligand bağlama domaini ve hücre dışı komponentler ile beraber bir trans membran proteini olan tirozin kinazı içerir **(**Prenzel ve ark., 2001). EGFR ligandına bağlandıktan sonra gönderdiği sinyal transdüksiyon sayesinde Tirozin kinaz reseptörleri liganlarına homo ve hetero dimerizasyonla bağlanır ve aktifleşir. Ayrıca tetiklenen bu sinyal transdüksiyonu PI3K/AKT/mTOR, RAS/RAF/MAPK ve JAK/STAT yollarını tetikler. Farklılaşma, proliferasyon, sağ kalım, neo vaskülarizasyon, metastaz, invazyon ve invitro da onkogenik transformasyon dahil olmak üzere birçok onkogenik mekanizmada rolü alırlar. Artmış EGFR aktivitesi artmış tirozin kinaz aktivitesini de

beraberinde getirir (Scagliotti ve ark., 2004; Ji ve ark., 2006). Bu mutasyon ADC'de skuamöz ve KHAK göre daha sık görünür; kadınlar, gençler ve sigara öyküsü olmayan kişilerde daha az rastlanır (Yip ve ark., 2013; Ding ve ark., 2008). Erlotinib ve gefitinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri adenokarsinoma akciğer kanserinde EGFR'nin mutasyon sonucu tirozin kinaz reseptörü ekspresyonunu artırdığı için bu inhibitörler kullanılabilir ve tedavinin etkili sonuçlar gösterdiği saptanmıştır (Lynch ve ark., 2004; Paez ve ark., 2004).

HER2 (insan epidermal büyüme faktörü reseptötü): EGFR ile beraber ERBB reseptör ailesinin bir üyesi olarak tirozin kinaz reseptörünü kodlar. Diğer ERBB aile üyelerinin aksine liganda direk bağlanmak yerine ligand bağlı üyelere heterodimer oluşturarak bağlanmayı tercih eder (Tzahar ve ark., 1996**).** JAK/STAT ve PI3K/MAPK gibi çeşitli sinyal iletim yollarını etkinleştirir. % 1.6-4 oranında KHDAK'de etkinleştirici mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyon daha çok adenokarsinoma hücre hatları, KRAS ve EGFR mutasyonu içeren tümörlerde ve kadınlarda, sigara öyküsü olmayan hastalarda daha sıkça görünebilir (Shigematsu ve ark., 2005; Tomizawa ve ark., 2011)

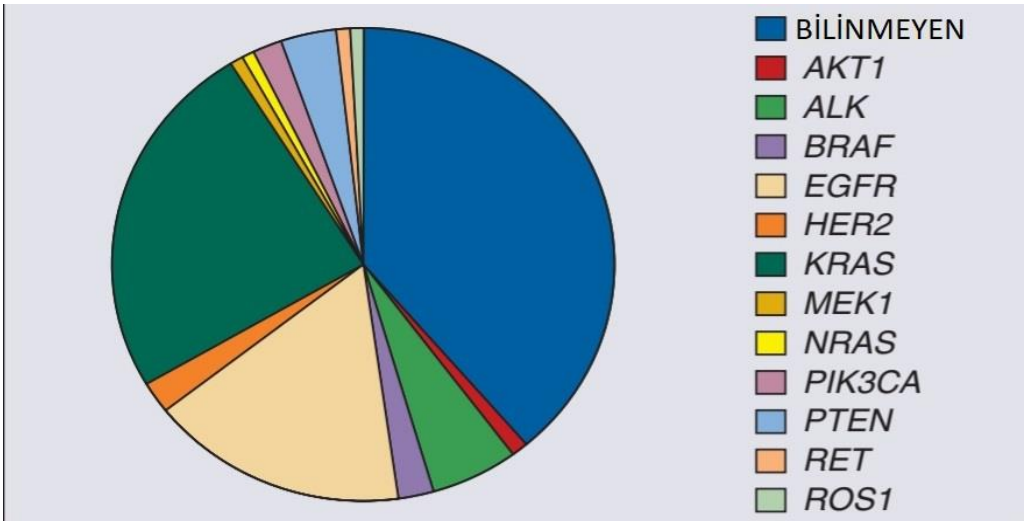
BRAF: KRAS proteinin downstream efektörü olan ve MAPK sinyal transdüksiyonunun aktifleşmesiyle sağ kalım ve hücre proliferasyonunda rolü olan serin teronin kinaz proteinini kodlar (Davies ve ark., 2002)**.** Ayrıca MEK1 ve MEK2 fosforile eder ve ELK1 ve C-JUN gibi büyüme destekleyici proteinleri düzenler (Downward, 2003). BRAF mutasyonu daha çok melanomada görünse de KHDAK'de de bu mutasyon tespit edilmiştir.

PI3K/AKT/mTOR: PI3K (fosfatidil inzitol 3 kinazlar) ana katalitik bir birim ve hücre içi lipid kinazlardır. Bu protein PIK3CA geni tarafından kodlanır. Hem KHDAK ve hem KHAK'de bu değişiklik saptanmıştır (Papadimitrakopoulou ve ark., 2012). Sağ kalım, hücre proliferasyonu, adezyon, harekette rolü olan ve farklılaşma düzenlenmesinde rolü olan önemli bir sinyal transdüksiyon yoludur. HER2, EGFR, vaskülar endotelyal büyüme faktörü reseptörü, insülin benzeri büyüme faktörü reseptörleri ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörleri gibi çeşitli membrandaki tirozin kinaz reseptörlerinin aktifleşmesiyle etkin forma gelir. Aktifleşmiş tirozin kinazlar PI3K'ı membrana alınır ve fosfatidilinozitol 4,5_ bis fosfat (PIP2) fosforile ederek fosfatidilinozitol 3,4,5-tri fosfate (PIP3) dönüştürür. PIP3, AKT'yi 3-fosfoinozitid bağımlı kinaz 1(PI3K) ve serin teronin kinaz olan mTOR vasıtasıyla fosforile olduğu

membrana alır. AKT nin aktif forma dönüşümü hücre sağ kalım ve proliferasyonu ile ilişkili tüberskleroz 2 ve Bcl-2 etkinleştirir. RAS ile beraber RAS/RAF/MEK/MAPK etkileşimi PI3K direkt aktifleştirebilir**.** Akciğer karsinogenezde KRAS, EGFR, PI3K/AKT aktivasyonu gibi çeşitli değişiklikler rol oynar. PTEN gibi tümör baskılayıcı genlerin engellenmesi ya da negatif yönde düzenlenmesi PIK3A amplifikasyonu neden olabilir. PI3K/AKT/mTOR mutasyonu KHDAK de dahil birçok kanserde görünmüştür (Cully ve ark., 2006; Papadimitrakopoulou ve ark., 2012).

ALK (Ana plastik lenfoma kinaz): ALK tirozin kinaz reseptörünün yeniden düzenlenmesi akciğer kanserinde meydana gelen değişikliklerden biridir. ALK aktivasyonu RAS/RAF/MAPK, JAK3-STAT3 ve PI3K /AKT sinyal yolları aracılığıyla apoptozisi inhibe ederek proliferasyonu artırır (Shaw ve Solomon., 2011). ALK nin yeniden düzenlenmesi KHDAK'nin %4'ünde ve özellikle adenokarsinomada, gençlerde ve sigara öyküsü olmayan bireylerde sıklıkla görünür (Koivunen ve ark., 2008**;** Shaw ve ark., 2009).

TP53: KHDAK'de daha çok sigara öyküsü olan veya sigara dumanına maruz kalanlarda daha sık karşılaşılır. Bu mutasyon sigara içenlerde polisiklik aromatik hidrokarbonların CpG dinükleotid bölgelerinde G-T transversiyonu ve sigara öyküsü



olmayan hastalarda G-A transversiyonu şeklinde görünür. Bu mutasyon EGFR ve KRAS mutasyonlarıyla ilişkilidir (Kosaka ve ark., 2004).

Şekil 1.3: Akciğer adekarsinomada belirlenen sürücü gen mutasyonları (Baser ve ark., 2006).

Skuamöz hücre karsinoma MET, PI3K/AKT/mTOR, PIK3CA, FGFR1, PTEN, LKB (STK11), P16/RB ve DDR2 en yaygın gerçekleşen mutasyonlardır **(Tablo1.1)** (Cooper ve ark., 2013).

Tablo 1.1: Skuamöz hücre karsinomada en çok saptanan mutasyonlar.

Skuamöz hücre karsinomada en çok saptanan mutasyonlar	
MET	hepatosit büyüme faktörü reseptörü Zarda tirozin kinaz reseptörünü kodlayan bir proto- onkogendir (Sadiq ve Salgia., 2013). Ligandına bağlandıktan sonra reseptör homodimerizasyonu, kinaz etkinleşmesi ve RAS/RAF/ MEK/MAPK, PI3K/AKT ve C-SRC kinaz aşağı DNA sinyal yoluyla gerçekleştirir. MET in amplifikasyonu TKIs ile ilişkilidir TKIs sayesinde EGFR yolunun engellendiği takdirde sinyal transdüksiyonuyla PI3K/AKT yolunu fosforile edip aktif tutarak devam ettirir (Engelman ve ark., 2007; Bean ve ark.,2007; Cappuzzo ve ark., 2009).
FGFR1	SOX, FGFR1 ve PDGFRA gibi bazı somatik gen amplifikasyonları skuamöz hücre karsinomada görünebilir (Cancer Genome Atlas Research Network., 2012; Tran ve ark., 2013). FGFR1 (fibroblast büyüme faktörü reseptörü membranındaki bir tirozin kinaz reseptörü olarak PI3Kve MAPK aktivasyonundan faydalanarak hücre proliferasyonunda katkıda bulunur (Turner ve Grose., 2010). Bu reseptör amplifikasyonu skuamöz hücre karsinoma ve adenokarsinoma gibi KHDAK hücre hatlarında onkojenik etkiye neden olabilir ayrıca %20 skuamöz hücre karsinomada görünürken, Adenokarsinomada pek sık karşılaşılmaz (Dutt ve ark., 2011; Tran ve ark., 2013).
DDR2	diskoidin domain reseptörü Skuamöz hücre karsinoma vakalarının %3.8'i oluşturur. DDR2 kolajene bağlanarak hücre proliferasyonu ve sağ kalım düzenlenmesinde rolü olan tirozin kinaz reseptörünü kodlar. İn vitro da desatinib ile tedaviye yanıt gösterdiği tespit edilmiştir (Ikeda ve ark., 2002; Hammerman ve ark., 2011).
SOX2	Bir transkripsiyon faktörü olarak akciğer gelişiminde proksimal epitelyal hava yollarını düzenler. HDAC 1/2 bu gelişimin gerçekleşmesi için SOX2 ekspresyonunu düzenler (Bertoncello, 2016).
PTEN	Lipid ve proteini kodlayarak PI3K/AKT/mTOR sinyal yolunda PI-(3,4,5)-trifosfat defosforile ederek etkisiz hale getirir. PTEN bir tümör baskılayıcı gen olarak işlevi baskılandığı takdirde AKT/proteinini ligand'a bağlanma gerekliliğinden bağımsız kılarak ve sınırsızca aktifleşirler (Cully ve ark., 2006). Skuamöz hücre kanserinde adenomakarsinoma kıyasla daha sık görünür. Ayrıca sigara tüketen kişilerde daha yaygın (Marsit ve ark., 2005).
$P16^{INK4A}$-SİKLİND1-CDK4	RB proteinini kodlayarak hücre döngüsünü G1-S aşamasında durdurarak düzenleyen bir tümör baskılayıcı gendir (Harbour ve ark., 1988). Bu mutasyon küçük hücreli akciğer karsinomada. Küçük hücre dışı akciğer kanseriyle kıyasla yaklaşık 9 kat daha yaygındır (Larsen ve Minna.,2011). SiklinD1, CDK4 ve siklin bağımlı kinaz P16 inhibitörü (CDKN2A) değiştirerek TGS'leri baskılar (Raso ve Wistuba., 2007). $P16^{INK4A}$-RB proteininin siklin D1 bağımlı fosforilasyonunu baskılayarak hücre döngüsünde G1-S kontrol noktasından geçişine izin vermez (Trimarchi ve Lees., 2002).

1.1.2. KHDAK için Tedavi Seçenekleri

1.1.2.1. Ameliyat: Evre I, II ve III olan hastalarda ameliyatı tolere edebiliyorsa ameliyatla rezekte olabilen tümör çıkartılır. Lobu ya da tümör içeren bölüm tamamen çıkarılabilir (Howington ve ark., 2013). Tümörün rezekte olabilme kapasitesini tanımlamak adına görüntüleme çalışmaları ve biyopsi kullanmanın yanı sıra hastanın diğer ameliyata uygun kılan faktörleri değerlendirilir (Collaborative Group., 1995). Rezeksiyon kapasitesi olmayan hastalarda eş zamanlı kemoradyasyon ve sıralı kemoradyasyon seçenekleri kullanılabilir (Sause ve ark., 1995; Herscher ve ark., 1999).

1.1.2.2. Adjuvant Tedavi: Rezeksiyon ameliyatı geçirmiş bazı hastalarda nüks riskini azaltmak amacıyla uygulanan bir tedavidir. Adjuvant tedavi kemoterapi, ışın tedavi, immün tedavi ve hedefe yönelik tedavi seçeneklerinden oluşur (Riely ve ark., 2009).

1.1.2.2.1. Kemoterapi: Yeni teşhis koyulmuş hastaların %40 evre IV aşamasındadırlar. Hastalıkla bağlantılı olumsuz olayları azaltmak ve hayatta kalma tedavinin en önemli hedefidir. 0-1 başarı durumundaki hastalar sisplatin, karboplatin gibi platin bazlı ilaçlar paklitasel, dosetaksel, gemsitabin, irinotekan ve pemetreksed ile beraber kullanılabilir (Kelly ve ark., 2001; Scagliotti ve ark., 2002). Pemetreksed adeno karsinoma'da kullanılabilir. Yapılan çalışmalar kombine tedavinin tekli tedaviyle kıyasla daha etkili olduğu gösterilmiştir. Başarı durumu 2 olan hasta grubu için platin bazlı olmayan tek bir ilaç kullanılır (Gridelli ve ark., 2004). Kemoterapi bu hastalarda olumsuz etki gösterebilir; eğer 4 tedavi döngüsü sonrası hala tümör küçülmediyse ve ilerlediyse tedavi durdurulur (Scott ve ark.,2007; Pisters ve ark., 2007). Başarı durumu 3-4 olan hastalar sitotoksik tedaviden hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde azalttığı için hiç fayda görmez.

1.1.2.2.2. Işın Tedavi: Bu tedavi kanser hücrelerindeki DNA'ya hasar vermek amacıyla kullanılır. Bu tedavi belirli bölgelerdeki tümörleri kontrol ederek ortadan kaldırır. Göğüste lokalize olmuş cerrahide rezeksiyon kapasitesi olmayan hastalarda veya ameliyat ve kemoterapiye yanıt vermeyen hasta grubunun yaşam kalitesini arttırmak amacıyla yapılan bir palyatif bakımdır (Amini ve ark., 2014). Erken evrelerdeki akciğer lenf nodüllerine yakın metastaz içermeyen ve küçük nodüllere sahip KHDAK hastaları için streotaktik vücut ışın tedavi diye adlandırılan (SBRT) yöntem kullanılabilir. Bu yöntem sayesinde iyi lokalize olmuş bir tümör tespit edilebilir. Evre I hasta grubu için

ameliyata ihtiyaç duyulmadan bu yöntemden faydalanarak iyi sonuçlar gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca sağ kalım oranı 2 yıl daha fazla ve maliyeti daha uygunundur (Fakiris ve ark., 2009; Grutters ve ark., 2010).

1.1.2.2.3. Biyobelirteçler: Kişiselleştirilmiş tıptan faydalanarak tümör hücrelerindeki molekülleri hedefleyerek hastanın yaşama süresini artırabiliriz (Riely ve ark., 2009).

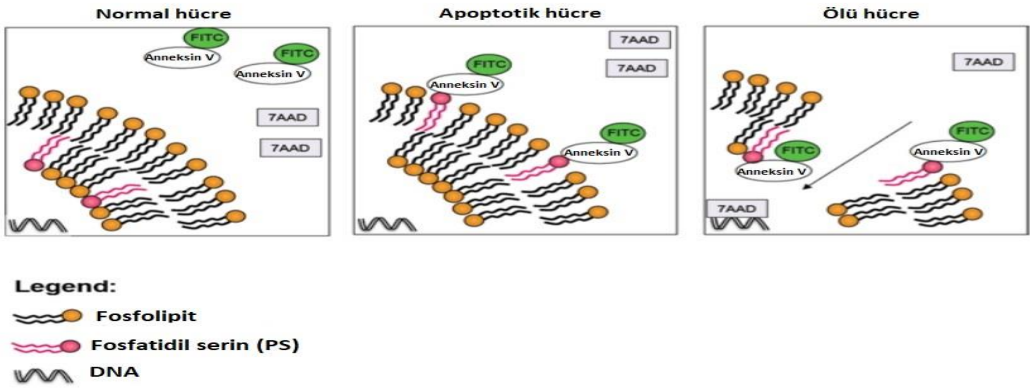
1.1.2.2.4. İmmün Tedavi: Vücudun kendi bağışıklık sistemini kullanarak kanserle savaşıdır. Kanser hücreleri ve sağlıklı hücre arasında ortak özellikler bulunabilir. Bu nedenle kanser hücreleri immün sistemden kaçar ve ayırt edilemez. Bu tedavi yardımıyla immün sistemin etkinliğini arttırarak kanser hücrelerinin kaçmalarını önleyebilir, yayılma ve büyümeleri baskılanabilir (Dieu-Nosjean., 2008; Zhuang ve ark., 2010). Bu tedavide yeni stratejilerden biri kanser hücrelerinin bağışıklık sisteminden kaçmasına yardımcı olan CTLA4 (sitotoksik lenfosit ilişkili antijen 4) reseptör inhibitörü, PD-1 (programlanmış hücre ölümü -1) ve onun ligandı olan PD-L1 gibi düzenleyici mekanizmalar hedeflenmektedir. Bu kontrol noktaları immün sistemi tarafından hasarlı dokuları koruma amacıyla patojene tepkisini arttırır (Pardoll, 2012). İpilimumab (anti-CTLA4), özellikle hastalığın III ve IV evresinde olan hastalar için paklitaksel, karboplatin, PD-1 ve PD-L1 inhibitörü olan doksotaksel, Nivolumab ve Mk-3475 ilaçları kullanılabilir (Borghaei ve ark., 2015; Kazandjian ve ark., 2016). Aşı geliştirmek immün tedavide amaçlanan yeni seçenekler arasındadır.

1.2. Hücre Ölüm Mekanizmaları

1.2.1. Apoptozis

Apoptozis gen seviyesinde düzenlenen programlanmış hücre ölümüdür. Gelişim veya DNA hasarı meydana geldiği zaman hasarlı hücreleri ortadan kaldırır (Fuchs ve Steller., 2011). Apoptozis birçok sinyalden oluşan karmaşık bir yolaktır (Wong, 2011). Apoptotik hücrelerde karakteristik bir sitoplazmik hücre küçülmesi, hücre zarının tomurcuklanması, fosfatidilserin (PS)'in membaının dış kısmına translokasyonu, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu yaşanır (Häcker, 2000; Saraste ve Pulkki., 2000). PSler'in dışarı translokasyonu hücrenin pro-inflamatuar yanıttan bağımsız olarak makrofajlar tarafından tespit edilmesini sağlar ve böylece fagositozunu hızlandırır

(**Şekil 1.4)** (Hengartner, 2001). Apoptozis'in daha geç evrelerinde memran tomurcuklanır, sitoplazmik organellerin zar bütünlüğü kaybedilir (Kroemer ve ark., 2005). Kaspazlar apoptozisi yürüten özel sistein aspartat proteazlardir (Li ve Yuan., 2008). Birçoğunun da apoptozis'de rolü olmak üzere toplamda 14 kaspaz tanınmıştır (Chen ve Wang., 2002)**.** Apoptotik hücre ölümünde, hücresel bileşenlerin kesiminde rol oynayan kaspazlar başlatıcı kaspazlar (2,8,9,10) ve yürütücü kaspazlar (3,6,7) diye iki gruba ayrılır (Thornberry ve Lazebnik., 1998**).** İnaktif zimojen ya da pro-kaspaz olarak üretilen başlatıcı kaspazlar otomatik proteoliz yardımıyla aktifleşirler (Nicholson., 1999). Aktifleştikten sonra yürütücü kapsızları özel olarak kesip aktifleştirirler (Stennicke ve Salvesen., 2000). Bu aktif yürütücü kaspazlar hücre iskeleti proteini (aktin), DNA onarımında görev alan Poli ADP Riboz polimeraz (PARP) ve nükleer zar proteini laminin parçalarlar (Jänicke ve ark., 1998; Boulares ve ark., 1999; Okinaga ve ark., 2007). Plazma membran asimetrisi, kromatin yoğunlaşması ve hücresel kabarcık oluşumu gibi Morfolojik değişikleri beraberinde getirir (Degterev ve ark., 2003). Apoptozis (yıkım) ve mitoz (proliferasyon) bir denge içindedirler. Bu dengenin herhangi bir sebepten dolayı bozulması patojenezi beraberinde getirebilir. AIDS, hepatit C, nörodejeneratif bozukluklar, insülin bağımlı tip 1 diyabet, miyokard enfarktüsü ve atroskleroz artmış apoptozis veya kanser ve oto immün hastalıklar azalmış apoptozis aktivitesi sonucu ortaya çıkabilir (Ulukaya ve ark., 2011).



Şekil 1.4: Akım sitometri yöntemiyle gösterilen PS translokasyonu (Zimmermann ve Mayer., 2011).

1.2.1.1. Apoptozun Üç Ana Yolu

Dışsal apoptozis yolu: Ölüm reseptörleri tarafından indüklenebilir (Thiery ve ark., 2010). Hücre yüzeyindeki reseptör etkileşimi sayesinde başlar. Bu reseptörler TNFR (tümör nekroz faktörü reseptörü) süper ailesinin üyesidirler (Guicciardi ve Gores., 2009). Ölüm reseptörleri yapısal olarak hücre içi DD (death domain) diye tanımlanan protein-protein etkileşim domaini tarafından belirlenirler (Fulda ve Debatin., 2003). Daha geniş spektrumlu ölüm reseptör- ligand sinyal yolları arasında (TNFR alfa- TNFR-1), Fas (APO-1, CD 95)- FasL, TRAILR1 (DR4)- TRAIL, TRAILR2 (DR5- TRAIL yer alır. Eğer bu reseptör ilgili ligandlar tarafından uyarılırsa reseptör oligomerizasyon ve sitoplazmik DD'yi ortaya çıkarmak ve diğer DD içeren proteinler ile homotipik bir etkileşim sağlamak amacıyla konformasyonal değişiklikler geçirir (Degli-Esposti., 1999; Guicciardi ve Gores., 2009). Reseptör ve ligand olgomerizasyonu sonucu reseptör aktifleşir ve adaptör proteinlere bağlanır. TRADD ve FADD gibi adaptör proteinler başlatıcı pro-kapsızların ölüme neden olan sinyal kompleksi (DISC) ile sonuçlanmasını sağlar. Sonuç olarak pro-kaspaz'in konsantrasyonu artar ve karşılıklı aktivasyon desteklenir (Boatright ve Salvesen., 2003). Örneğin ölüm reseptörlerinden biri olan FAS; lenfoidal, akciğer, miyokardiyal, karaciğer ve bazı tümör hücrelerinde bulunur. Ligandı FASL olarak tanımlanır ve NK ve sitotoksik T hücrelerinde bulunur (Pan ve ark., 1997; Collison ve ark., 2009). Toksik epidermal nekroliz, yemek borusu kanseri, metastatik kolon kanseri, hepatosellüler karsinom, sarkoma, çoklu miyelom, nazal lenfoma ve hodgkin olmayan lenfoma da FASL artışı gözlemlenebilir (Viard ve ark.,1998; Kanda ve ark., 1999). TNFR'in ölüm domaini (TRADD) ve FAS'in ölüm domaini (FADD) arasındaki etkileşim sonrası (Pan ve ark., 1997; Collison ve ark., 2009) ölüm reseptörleri kaspaz kaskadını pro-kaspaz 8 aktivitesiyle başlatır. kaspaz 8; iki yolu izleyebilir (Martin ve ark., 1998). İlk olarak yürütücü kaspazları kırarak kaspaz 3'ü aktifleştirebilir ya da ikinci yolu seçerek Bid ve diğer pro-apoptotik proteinleri kırabilir. Kırılmış ve aktifleşmiş Bid sitozolden mitokondriye transloke olur ve böylece sitokrom C salınımını indükler (Collison ve ark., 2009). Sitokrom C salınımı apoptozomu oluşturur ve yürütücü kaspazlar diğer çoklu domaine sahip Bak-Bax'i etkinleştirir (Paoli ve ark., 2013). TNFR-1 ve DR3, FADD ve TRADD ve DR-4 ve DR-5, FADD adaptör molekülünden faydalanarak kaspaz 8'i aktifleştirebilir (**Şekil 1.5(a))** (Kischkel ve ark., 2000; Sprick ve ark., 2000)**.**

İçsel apoptozis yolu: İçsel faktörler apoptozis'de önemli rolü olan mitokondriyal aktiviteye neden olurlar (Degli-Esposti., 1999). Genotoksik artış, DNA hasarına yol açar ve p53 indükler. P53, Bcl-2 ailesinin üyesidir (Basu ve ark., 1998). Bcl-2 ailesi pro-apoptotikler ve anti-apoptotikler şeklinde iki gruba ayrılır. Pro-apoptotikler apoptozisi indüklerler. Bax, Bcl, x5, Bad, Bim, Bok, Bmf, Bak, Bid ve Noxa proteinlerinden oluşurlar. Pro-apoptotikler BH1-BH2-BH3 domaini içeren Bax-Bak- Bok veya sadece BH3 domaini içeren Bid- Bad- Bim- Mbf- Bik ve Noxa iki alt gruba ayrılırlar. Buna ek olarak sadece BH3 domaini içerenler Bid ve Bim dahil olmak üzere aktivatörler ve Bad- Mbf- Bik ve noxa dahil olmak üzere hassaslaştırıcılar diye gruplandırırlar. Sadece aktivatörler direkt oligomerizasyona neden olup apoptozisi başlatırlar ve hassaslaştırıcılarda bu özellik bulunmaz. Anti-apoptotik grup apoptozisi baskılar ve mitokondri zarının bütünlüğünü korur ve sitokrom C salınımını engelleyerek hücrenin ölümünü önlerler (Fletcher ve Huang., 2006; Leber ve ark., 2010) ve Bcl-2, Bcl-xl ve MCI-1 üyelerinden oluşurlar (Burlacu, 2003).

Hücre içi ROS oksidatif genom ya da mitokondri membranında hasara yol açar ve böylece apoptozis indüklenebilir (Kannan ve Jain., 2000). Seramid zar ile ilişkili bir apoptozis aktivatörüdür. Zarın hasarına yanıt olarak sfingomiyelinaz aktivasyonunu artırır (Tepper ve ark., 2000; Pettus ve ark., 2002). Işın tedavi (Haimovitz-Friedman ve ark., 1994), hipertermi -vücut ısısının artışı- (Moulin ve ark., 2007), hidrojen peroksit (Yu ve ark., 2000) ve ultra viyole radyasona maruziyet (Magnoni ve ark.,2002) zarın hasar görmesine ve sonuçta seramid ve sfigomiyelinaz artışına yol açabilir (YEN ve ark., 2001). Bu seramid artışı morfolojik değişikliklere neden olurken (Wang ve Youle., 2009). Apoptozis'in iç yolağında rol alan diğer faktör AIF'dir. Mitokondriden salınarak kaspaz bağımsız apoptozis'e yol açabilir (Hunot., 2001).

İçsel apoptozis mekanizması nasıl gerçekleşir: Herhangi bir DNA hasarı meydana geldiyse p53 fosforile olup aktifleşir ve böylece G1 fazında hücre döngüsünü durdurarak DNA'sını onarmak için hücreye zaman sağlar. Eğer DNA hasarı onarılmazsa p53 bir pentamer yapı oluşturarak Bax ekspresyonunu arttırarak Bcl-2/Bax oranını değiştirir (Lechner ve Laimins., 1994; Forte ve Luftig., 2009). JNK, ATR, ATM, DNA-PK ve chk2 kinazlar p53 fosforilize edip etkinleştirebilir (Alarcon-Vargas ve Ronai.,2002). Sitokrom C mitokondriyal zarın iç kısmında yer alır ve elektron zincir transferinde rol oynar ve salınması geri dönüşümsüzdür (Kluck ve ark., 1997). Sitokrom

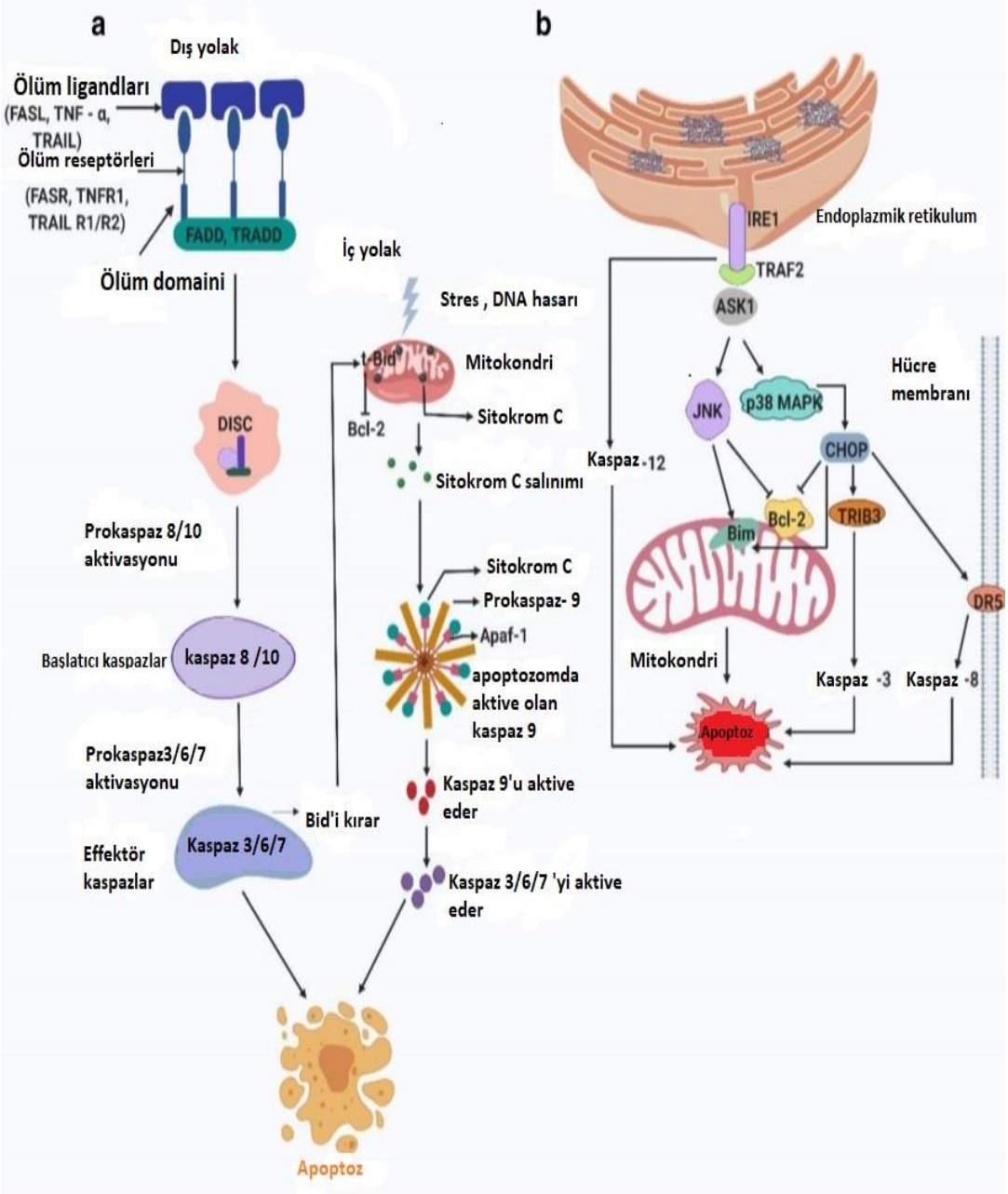
C ve sitoplazmik protein ve apoptotik proteaz aktifleştirici faktör -1 (apaf-1) bağlanır ve ATP ile beraber apoptozom kompleksini oluştur. Bu kompleks pro-kaspaz 9'ü aktifleştirerek kaspaz 9'a dönüştürür. Aktif kaspaz 9 pro-kaspaz 3'ü aktif ederek effektör bir kaspaz olan kaspaz 3'a dönüştürür (Li ve ark., 1997). Sonra bu aktif kaspaz ICAD (kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz inhibitörü)'nu in aktifleştirir böylece CAD serbest kalır ve buda kromatin yoğunlaşması, DNA kırılması gibi karakteristik özelliklere yol açar (Enari ve ark., 1998).

Bazı granzim diye tanımlanan serin proteaz enzimler NK ve sitotoksik T hücreleri tarafından perforin sayesinde zarı delerek hücre içerisine bırakılır. Granzim A; DNA kırılması ve set kompleksi sayesinde kaspaz bağımsız apoptozis'e yol açar. Granzim B pro-kaspaz 9 ve pro-kaspaz 3 aktivasyonundan yararlanarak ROS artırır ve böylece kaspaz bağımlı apoptozis'e yol açar **(**Lieberman, 2010; Martinvalet, 2015).

Endoplazmik retikulum stres yolu: Enfeksiyon, açlık, brefeldin-tunikamisin ve tapsigargin gibi kimyasal maddeler ve hipoksi endoplazmik retikulumun salgılama fonksiyonlarında yanlış katlanmış ya da katlanmamış proteinler gibi homostatik olmayan değişikliklere neden olur ve hücre ölümüne yol açar (Iurlaro ve Muñoz-Pinedo., 2016). Eğer ER' da yanlış protein katlanması gerçekleşirse, katlanmamış proteinler yanıt yolunu başlatırlar böylece genel protein sentezi durdurulur ve doğru katlanmış proteinlerin yerini katlanmamış proteinler ile değiştirir. Protein kinaz RNA benzeri endoplazmik retikulum kinaz (PERK), proestazın eski formuna getirmeye çalışan etkinleştirici transkripsiyon faktörü 6 (ATF6) ve inozitol gerektiren enzim 1 (IRE1) bu yolun üç ana bileşeni arasında yer alır. Eğer hücre bu işlemde başarısız olursa ve katlanmamış proteinler kalıcılığı çözülmezse hücre apoptozis'e doğru ilerler. IRE1; TNF reseptör ilişkili faktör 2-apoptozis sinyali düzenleyici kinaz 1 kompleksı, P38- MAPK sinyal kaskadı ve c-Jun N-terminal kinaz 1denfaydalanaranak

apoptozisi indükler (Yoneda ve ark., 2001). JNK yolunun aktivasyonu Bim gibi pro- apoptotikleri etkinleştirmesine neden olur ve Bcl-2 gibi anti-apoptotikleri baskılayarak apoptozis'e yol açar. C/EPP homolog proteini (CHOP), MAPK-38 yolu tarafından aktifleşerek apoptozisi kolaylaştırır. CHOP kaspaz 3 aktivatörü tribble homolog3 tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör proteini, hücre durdurucu ve DNA hasar proteini 34 (GADD-34), ölüm reseptörü 5 (DR5) ve kaspaz 8 ilişkili apoptozu bu pro-

apoptotiklerin ekspresyonunu artırarak indükler. ER stres yolu Parkinson, Alzheimer, retinit, glokom, makula dejenerasyonu, pigmentosa, inflamatuar hastalıklar, metabolit hastalıklar ve tümörgenez'de gözlenmiştir (**Şekil 1.5(b))** (Sano ve Reed., 2013)**.**



Şekil 1.5: Apoptozun üç ana yolu (Nirmala ve Lopus., 2020).

1.2.2. Nekroz

Dışardan gelen kimyasal ve fiziksel etkenler iyon dengesini bozar ve nekrozu indükler. DNA tamir enzimi PARP; NAD kaybına neden olur böylece ATP eksikliği iyon pompasını yetersiz kılar sonuç olarak hücre sıvı toplar ve organeller şişer, membran bütünlüğü kaybedilir ve hücre ozmotik basınç nedeniyle patlar. Nekroz sonucunda hücre içeriği dışarıya salınır ve inflamasyon yanıta yol açarak fagosit hücreler tarafından ortadan kaldırılmasını kolaylaştırır (Golstein ve Kroemer., 2007; Nicotera ve Melino., 2004).

1.2.2.1. Apoptozis ve Nekroz Arasındakı Farklılıklar

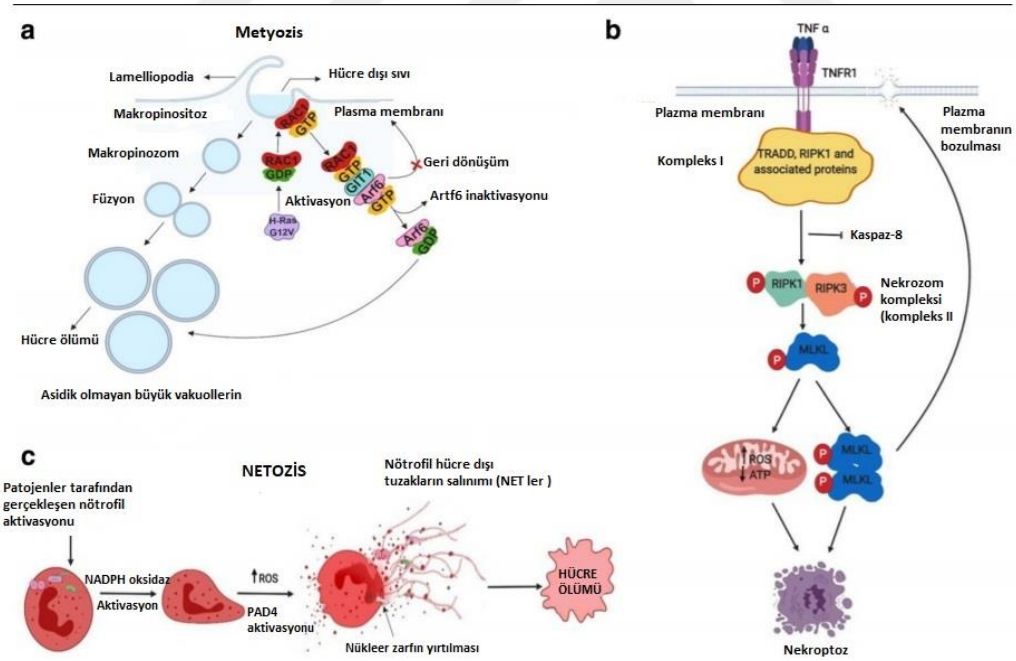
Nekroz patolojik koşullarda meydana gelir. Bu ölüm tipinde hücre aşırı sıvı akışı sebebiyle şişer, kromatin formu daha çok görünür ve normal hücrelere benzeyebilir (Saraste ve Pulkki., 2000). Nekrozda hasarlı hücrenin zar bütünlüğü kaybedilir ve hücre parçalandığı için hücre içeriğinin dışarı salınması inflamatuar reaksiyona neden olur (Nathan ve Ding., 2010). Fakat apoptozis patolojik ve fizyolojik durumlarda ortaya çıkabilir. Yani sağlıklı veya hastalık durumunda görünebilir. Apoptozis'de hücre zar bütünlüğünü korur ve zarda bleb diye adlandırılan tomurcuklar gibi morfolojik değişiklikler meydana gelir. Apoptozis'de hücre küçülür ve kromatin yoğunlaşır, kümelenir ve kırılır; agaroz jel elektroforezde merdiven görünümü oluşturur (Montague ve Cidlowski., 1996). Hücre parçalanmaz fakat zar ve çekirdek içeren küçük apoptotik cisimler şeklinde görünebilir; bu nedenle inflamatuar yanıta gerek duyulmadan fagositler tarafından ortadan kaldırılır (Saraste ve Pulkki., 2000). Bu yüzden apopotozis'e sessiz ölüm denir (Nathan ve Ding., 2010). Apoptozis; genler, proteinler (LaCasse ve ark., 1998), iyonlar ve organeller (Gershonive ark., 2009) gibi çok sayıda modülatör tarafından düzenlenebilir (Nathan ve Ding., 2010).

1.2.3. Nekroz Benzeri Hücre Ölüm Mekanizmaları

1.2.3.1. Metyozis: Hücre komşu hücrelerden ayrılır ve içinde sıvı dolu vakuoller birikir ve kaspaz bağımsız hücre ölümüne yol açar. Bu vakuoller mikropinozomdan kaynaklanır ve tekli membranıyla birbirlerine bağlanırlar (Chi ve ark., 1999). RAS/GTPaz yolunu indüklerler **(Şekil 1.6(a)) (**Maltese ve Overmeyer., 2014**).**

1.2.3.2. Nekroptoz: Sikonin gibi ilaçlar veya bazı patojenler tarafından uyarlanır (Wada ve ark., 2015). Bu yolak reseptör etkileşimli protein kinaz 1 tarafından indüklenir (**Şekil 1.6(b))** (Mishra ve ark., 2018)**.**

1.2.3.3. NETozis: Bulaşıcı patojenlerden korumak amacıyla nötrofiller tarafından gerçeklesen bir hücre ölümüdür. Bu etkileşim sonucunda nötrofiller hücre dışı tuzak diye tanımlanan NET'leri serbest bırakırlar. NADPH bağlı bir hücre ölümüdür (Yipp ve Kubes., 2013). PAD4 diye tanımlanan protein- arginin deiminaz 4; NADPH oksidaz ve ROS artması sonucunda etkinleşir. Artmış ROS, miyeloperoksidaz ve elastaz gibi enzimlerden faydalanarak ve histonları sitruline ederek DNA yoğunluğunu azaltır ve sonuçta bu azalma ile ilgili sitoplazmik protein ve granüller hücre membranını yırtarak serbest kalır **(Şekil 1.6(c))** (Yang ve ark., 2015)**.**



Şekil 1.6: Nekroz benzeri hücre ölüm tipleri (Nirmala ve Lopus., 2020).

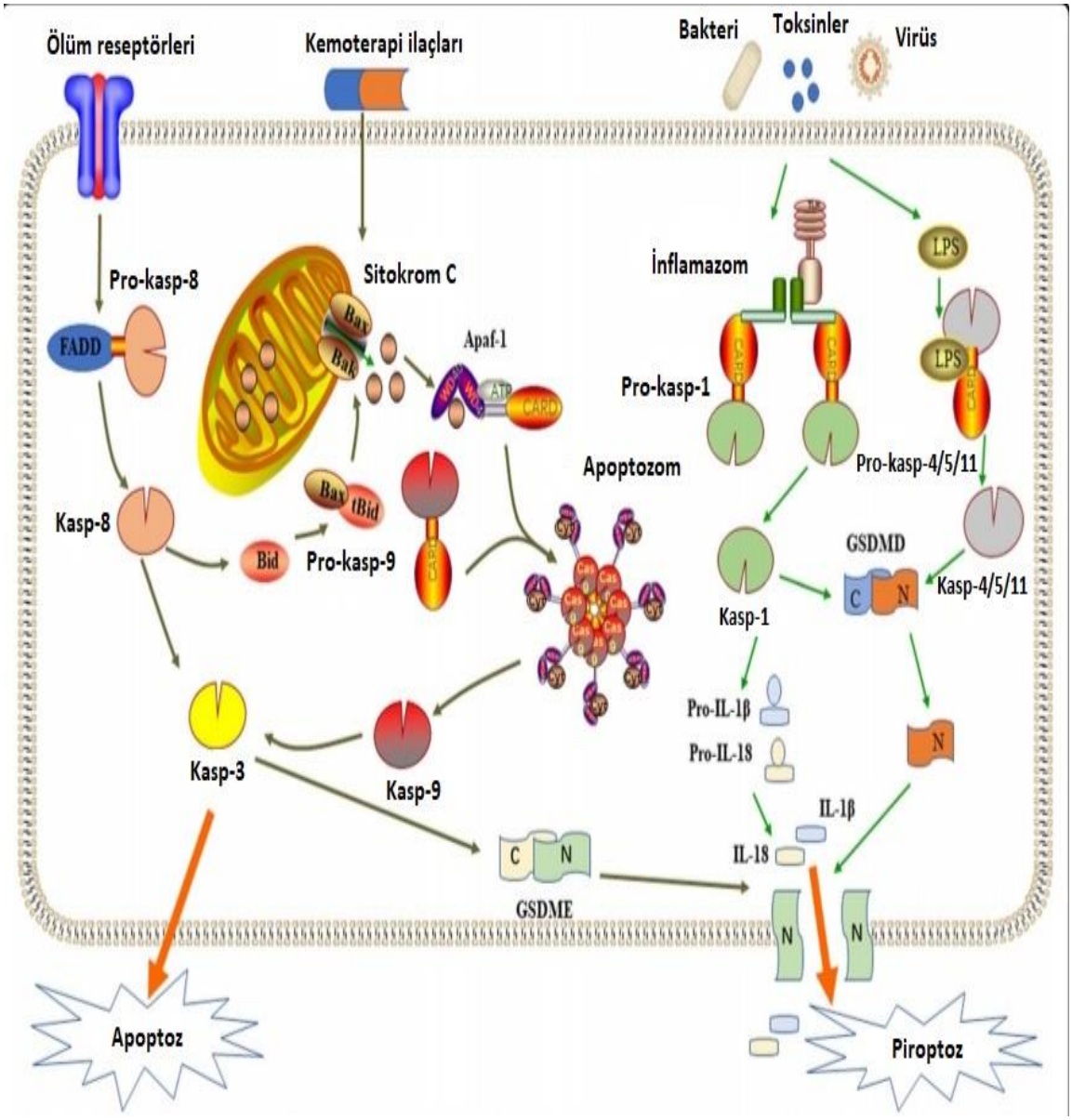
1.2.3.4. Pironekroz: Şigella flekseneri gibi patojenler tarafından uyarlanabilir (Khalili ve Radosevich.,2018). Kaspaz bağımsız bir yoldur ve NLRP3 tarafından gerçekleşir (Scaffidi ve ark., 2002).

1.2.3.5. Piroptoz: Programlanmış (PCD), pro-inflamatuar ve kaspaza bağlı bir ölüm mekanizmasıdır (Friedlander, 1986). İlk başlarda kaspaz 1 bağımlı programlanmış hücre ölümü diye tanımlanırdı (Cookson ve Brennan., 2001).

Ama şimdilerde GSDME (Gasdermin E) bağımlı piroptoz için iki temel alt yol bilinir**:**

- GSDME/kaspaz 3 bağımlı piroptoz yolu
- GSDMD bağımlı piroptoz yolu: Bu yol aşağıda belirtildiği gibi iki yoldan oluşur:
  a. Kaspaz 1 bağımlı klasik yol
  b. Kaspaz 4-5-11 bağımlı klasik olmayan yol

Kaspaz1/4/5/11(inflamatuar kaspazlar)'in effektör proteini GSDMD (Gasdermin D) 'dir. Klasik olmayan yolda kaspaz 4/5/11 sitoplazmadaki lipopolisakaridi kaspaz aktifleştirme ve güçlendirme domaini (CARD)'i sayesinde tespit edilir. Her iki alt yol sonucunda effektör protein kaspaz (klasik yolda kaspaz 1 ve klasik olmayan yolda kaspaz 4/5/11) aracılığıyla kırılır ve böylece GSDMD bağımlı piroptoz başlar. Kristali maddeler, sitotoksinler ve Adenozin trifosfat (ATP) gibi çeşitli anormal sinyaller tarafından indüklenebilir. Diğer yol kaspaz 3/GSDME bağımlı piroptoz sinyal yoludur. Kaspaz 3 aktivasyonu sonucu GSDME aktifleşir ve hücre zarında delikler açarak hücre şişmesi, yırtılması, inflamatuar faktörler hasarla ilişkili molekülleri salar (Man ve ark., 2017; Yu ve He., 2017). Piroptoz anormal bir hücre ölümü olarak inflamasyonu tetikler ve bu sebeple normal hücreleri öldürebilir. Piroptoz sekonder nekroz diye tanımlanabilir ve böylece apoptozis'de plazma zarının bütünlük kaybını özetler (Jiang ve ark., 2020). GSDME normal hücrelerde bir tümör baskılayıcı adayı olarak fazla eksprese olur. Böbrek kanseri, meme kanseri, cilt melanoma kanseri, yemek borusu kanseri ve akciğer kanseri hariç genelde tümör dokularında fazla eksprese olmazlar (Sun ve ark.,2006**).** Akciğer kanserinde paklitaksel ve sisplatin gibi ilaçlar Kaspaz 3'ü aktifleştirir ve böylece artmış GSDME'yi kırar ve piroptoza yol açar (Zhang ve ark., 2019). Yeni yapılan araştırmalar hedefe yönelik tedavide apoptozis'in iç yolağını etkinleştirerek GSDME'nin kaspaz 3 vasıtasıyla piroptoz ve ilaç etkisini artırabiliriz (Lu ve ark., 2018). Kemoterapi ilaçları ROS üretimini desteklerler ve kaspaz 3'ü aktifleştirerek GSDME'yi kırar ve piroptozu indükler (**Şekil 1.7)** (Li ve ark., 2019**).**



Şekil 1.7: Piroptoz, hücre ölümünde kaspaz-3'a bağlı hücre ölümünü gösteren moleküler mekanizma; klasik ve klasik olmayan yolların şematik diyagramı (Jiang ve ark., 2020).

1.2.4. Diğer Hücre Ölüm Mekanizmaları

1.2.4.1. Otofajik hücre ölümü: Hücre içi organel ve makro moleküllerin primer lizozomlarla kaynaşıp ve parçalanır. Bu yolda istenmeyen organel komponentleri geri dönüştürülür ve yeniden kullanılır. Önce organel membranı ER'un hücre dışı membranına yapışır ve primer lizozom birleşmesiyle sekonder lizozom yani otofagozom şekillenir, apoptotik cisimler görünmez ve DNA kırılmaz (Gozuacik Kimchi., 2007)**.**

1.2.4.2. Otozis: Otofaji geni bağımlı apoptotik olmayan bir hücre ölümüdür. Prinükleer boşluk genişlemesi, hücre şişkinliği, fazla otolizozom ve otofagozom, endoplazmik retikulum şişkinliği, elektron dolu bir mitokondri ve NA+/K+ ve ATP az artmış aktivitesi ökaryotlarda otozis özelliklerinden bazılarıdır (Liu ve ark., 2013; Kheloufi ve ark., 2015).

1.2.4.3. Feroptozis: Lipid peroksidaz ile başlayan ve demire bağımlı olan bir hücre ölümüdür (Mishra ve ark., 2018). AMPK aracılı beklin 1 fosforilizasyonu sonucunda plazma membran sistemini baskılar (Song ve ark., 2018). Norodejeratif hastalıklarda (Mishra ve ark., 2018) ve meme kanseri gibi kanserlerde tümörü desteklemek amacıyla görünebilir（Liu ve ark., 2018).

1.2.4.4. Entozis: Hücre içi hücre konfigürasyonu ve bir nevi hücresel yamyamlıktır (Overholtzer ve ark., 2007). Glikoz açlığı nedeniyle başlar ve bir hücre diğer bir hücreyi besin temin etmek için yutar. Bu yol E-kaderinden yaralanarak desteklenir (Wang, 2015).

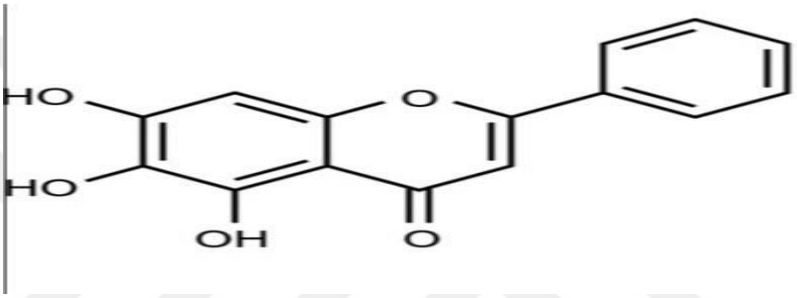
1.2.4.5. Paraptozis: Biyokimyasal mekanizması apoptozis'den farklı olan morfolojik olarak programlanmış hücre ölümüdür**.** İnsülin benzeri büyüme faktörü tarafından indüklenir (Kroemer ve ark., 2009; Sperandio ve ark., 2000).

1.3. Kullanılan Kimyasallar

1.3.1. Baicalein: *Scutellaria baicalensis* (BS) kökünden izole edilmiş bir flavonoid bileşiktir (**Şekil 1.8)**. Baicalein'in anti-kanser etkisi mesane, akciğer, meme, yumurtalık, karaciğer, kolon, gastrik, pankreas, prostat, osteo sarkoma ve lösemi dahil olmak üzere birçok kanserde saptanmıştır (Cathcart, 2016; Deng ve ark., 2020). Son araştırmalar baicalein'in tek veya kombine olarak doksorubisin gibi kemoterapi ilaçların indüklediği kardiyotoksisiteyi, Jun-N terminal kinazı (JNK) etkinleştirerek ve reaktif

oksijen türlerini (ROS) azaltarak önlediği gösterilmiştir (Chang ve ark., 2011). Ajanlar ila kombinasyonunda önemli biyoaktif tavır sergilediği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2013**).** Baicalein anti- inflamatuar, anti-proliferatif, pro-apoptotik, anti-metastatik (Deng ve ark., 2020) ve ateş düşürücü, anti-hipersensitif anti-anjiogenez, hücre döngüsü durdurma, (Cathcart., 2016) anti- fibroz, ve anti-mikrobial özellikleri de saptanmıştır (Bie ve ark., 2017; Wang ve ark., 2015). Ayrıca yüksek tansiyon ve kardiyo vasküler hastalıklara etki gösterdiği görünmüştür (Zhang ve ark., 2013).

Şekil 1.8: Baicalein'in kimyasal yapısı (Zhang ve ark., 2013).



Baicalein'in pro-apoptotik etkisi: Kanser ile mitokondri dinamiği yakın ilişki içindedir (Grandemange ve ark., 2009). Mitokondri hücre metabolizması, proliferasyonu, farklılaşma, sağ kalım ve apoptozis dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreçte rol oyar (Nunnari ve Suomalainen., 2012). Mitokondri bir dinamik ağ olarak normal hücre formu, yapısı fonksiyon ve miktarını korumak adına sürekli morfolojilerini değiştirir (Friedman ve Nunnari., 2014). Füzyon ve fizyon arasındaki denge onların morfolojileri ve mitokondriyal DNA dağılımını (mtDNA) belirler. Drp1 mitokondriyal fizyondan sorumlu proteindir ve onun aktivasyonu mitokondriyal füzyonunu indükler (Grandemange ve ark., 2009). Drp1 aracılı mitokondri fizyonu sumolasyon, fosforilasyon, ubikuitinasyon gibi post translasyon modifikasyonlar tarafından düzenlenir (Cereghetti ve ark., 2008; Twig ve ark., 2008). Otofaji ve apoptozis çeşitli stresler ile uyarlanır ve hücre kaderini belirler. İkisi de mitokondri fizyonuna neden olur (Martinou ve Youle., 2006). Ayrıca AMPK mitokondri fizyonu gibi çeşitli mitokondriyal hareketleri etkinleştirip apoptozisi ve otofajiyi destekler (Zhang ve ark., 2019; Zhang ve Lin., 2016). Apoptozis'de kaspaz aktivasyonu önemlidir ve Baicalein ile etkileşim sonucunda aktifleşen kaspaz 8 ve kaspaz 9 tarafından tetiklenen içsel ve dışsal yollar önemli bir effektör protein olan kaspaz 3 ile sonuçlanır (Ghobrial ve ark., 2005; Budihardjo ve ark., 1999). Kaspaz 3,8.9 aktivasyonu hücre içi apoptotik sinyal indüksiyonu, transdüksiyon

ve amplifikasyonunda önemli rol oynar (Ola ve ark., 2011). Ayrıca yapılan araştırmalarda Baicalein ile tedavide farklı zaman dilimlerinde kaspaz 3,8,9 aktivitesi gözlemlenmiştir. Özellikle kaspaz 3 ve 9 belirgin aktivasyonu Baicalein'in daha çok mitokondriyal bağımlı (içsel) apoptozis yolunu tetiklediğini göstermiştir (Zhang ve ark., 2013). Baicalein p53, TNF- alfa, NF-KB ve MAPK gibi çeşitli pro-apoptotik proteinleri ve apo ilişkili molekülleri düzenlenmesinde rol oynadığı saptanmıştır (Schwartz ve Shah., 2005). Baicalein'in apoptozis ile ilişkili nükleer yoğunlaşması, mitokondriyal aktivite ve hücre iskeletinin bütünlüğünün azalması ve apoptotik cisimlerin oluşumunu artırır (Cathcart ve ark., 2016).

Baicalein'in hücre döngüsünde etkisi: Hücre döngüsü düzenlenmesinde önemli rolü olan siklin bağımlı kinazlar (CDKs), CDK inhibitörleri (CDKIs) tarafından negatif şekilde düzenlenirler (Schwartz ve Shah., 2005). Çeşitli kanserlerde Baicalein'in farklı kontrol noktalarında hücre döngüsünü durdurduğu gösterilmiştir. Mesela osteosarkoma hücrelerinde yapılan çalışmalar Baicalein'in hücre döngüsünün dağılımını değiştirdiği gözlemlenmiştir; G0/G1fazının yüzdesini artırırken S fazını azaltır. Hücre döngüsünde önemli rol oynayan CDK1/CDK4, önemli bir tümör baskılayıcı protein olan retinoblastomayı düzenler. Baicalein CDK1/CDK4 miktarını azaltır bu yüzden G1 fazında hücre döngüsünü durdurur (Blagosklonny ve Pardee., 2002; Zhang ve ark., 2013).

Baicalein'in invazyon ve metastaz üzerinde etkisi: Mezenkimal hücrelerin invazyonunda önemli rol oynayan MMP2 (jelatinaz A) ve MMP9 (jelatinaz B) temel membranın en önemli bileşenlerinden biri olan jelatini indirgerler (Saengsoi ve ark., 2011; Cheng ve ark., 2012). Baicalein bu enzimlerin ekspresyonunu engelleyerek invazyon ve metastazda önemli rol oynar (Zhang ve ark., 2013).

Baicalein'in anti-proliferatif ve anti-anjiojenik etkisi: Baicalein ile yapılan zenograft modelleri mitotik aktivite ve anjiyogenezde önemli azalmalara yol açtığı saptanmıştır (Cathcart ve ark., 2016). Baicalein'in anti-proliferatif etkisi LOX (Lipo oksijenaz) inhibisyonu sonucu gerçekleştiği saptanmıştır (Tong ve ark., 2002). LOX birçok hücrede sağ kalım ve apoptozis'den sorumlu bir enzimdir (Tang ve ark., 1996). Baicalein'in anti-anjiojenik etkisi VEGF ekspresyonunu azaltmasından kaynaklanır (Behrens ve ark., 2008). Baicalein'in bu etkisi HUVEC hücrelerinde gösterilmiştir. Bir

CAM denemede VEGF tarafından indüklenen anjiojenik yanıtı önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (Liu ve ark., 2003).

Baicalein'in KHDAK'de saptanmış etkileri: Yapılan deneyler Baicalein'in skuamöz KHDAK'de FGFR, VEGF, MMP1, TEK ve ANGPT2; adenokarsinoma KHDAK'de VEGF, PDGFB, TGFBR, TEK ve ANGPT aşağı yönde düzenlendiği saptanmıştır. Baicalein'in tedavi sonrası KHDAK'de sağ kalımı artırdığı ve büyüme inhibitörü olduğu gösterilmiştir. *İn vivo* bir çalışmada, Baicalein ile tedavi sonrası CDC25A, E2F-1, CHEK -2 gibi hücre döngüsü genleri ve TNFRFS25 gibi apoptozis gen düzeylerini artırdığı gözlemlenmiştir (Cathcart ve ark., 2016).

1.3.2. Valproik Asit: VPA, (2 – Propil Pentanoik Asit) 40 yıldan fazla bir süredir anti-epileptik (Blaheta ve Cinatl., 2002)**,** bipolar bozuklukları, migren rahatsızlıkları için kullanılan bir ilaçtır (Michaelis ve ark., 2007). Son yıllarda önemli bir Histon deasetilaz inhibitörü (HDACI) olduğu'da gösterilmiştir (Fritsche ve ark., 2009; Wagner ve ark., 2015). Bugüne kadar 4 farklı I, II, III, IV kategoride yer alan toplamda 18 HDAC belirlenmiştir (Suraweera ve ark., 2018). HAT ve HDAC'lar kromatin yapısı ve gen transkripsiyonunu histonlardaki lizin amino asidini düzenleyerek kontrol ederler. HDAC'lar DNA hipermetilasyonu ile bağlantı içindedir ve geni susturur (Santini ve ark., 2007; Mottet ve Castronovo., 2008**).** Ayrıca HDAC'lar hücresel yolaklar, ısı şoku proteinleri ve DNA onarım proteinleriyle etkileşim içindedir (Bali ve ark., 2005; Kiweler ve ark., 2020). Akciğer, mesane, rahim ağzı, böbrek kanseri dahil olmak üzere birçok kanserde hastalığın ilerlemesini önlediği görülmüştür (Duenas-Gonzalez ve ark., 2008; Lan ve ark., 2015). FDA onaylı HDAC inhibitörü belinostat periferal T hücre lenfoma için, romidepsin deri T hücre lenfoma için ve panobinostat multipil myeloma için kullanılır (Grant ve ark., 2010; Sawas ve ark., 2015). Son yapılan araştırmalar VPA'nin kemoterapi direncini düzenlediğini ortaya koymuştur. Ayrıca topoizomeraz II (alfa/beta) ve p21'i düzenler (Das ve ark., 2007). HDAC bağımsız davranışıyla otofajiyi indüklediği ve kemoterapi hassasiyetini pozitif düzenlediği de saptanmıştır (Ji ve ark., 2015). Yeni anti-kanser ilaç geliştirme son zamanlarda kayda değer şekilde ilerleme kaydetmiş olsa bile maalesef akciğer ve kolon dahil olmak üzere birçok epitelyal kanserde hala kısmi etkinlik göstermektedir (Biran ve ark., 2011). Klinikte HDAC inhibitörü ajanlar hem tek (mono terapi) hem de sitotoksik kemoterapi ajanları, immün kontrol noktaları inhibitörleri (ICI), tirozin kinaz inhibitörleri, diğer epigenetik ajanlar ve ışın tedaviyle

beraber kombine olarak kullanılabilir (Mamdani ve Jalal., 2020). Pivaneks (Reid ve ark., 2004) vorinostat (Traynor ve ark., 2009), romidepsin (Schrump ve ark., 2008), entinostat klinik denemelerde monotedavi olarak KHDAK'de kullanılan HDAC inhibitörleridir (Ryan ve ark., 2005).

Akciğer kanseri tedavisinde yaygın olarak kullanılan sisplatin (DDP); ABCA1, ABCA3, ABCA7 ve ABCA10 taşıyıcılarına sahip hastalarda ilacı hücre dışına atar ve kemo terapi direncine neden olur (Oiso ve ark., 2014). VPA KHDAK'de ABC1'in negatif yönde düzenlenmesi ve HDAC sınıf I ailesi yani HDAC 1,2, 3ve 8'i inhibe ederek kemoterapiye hassasiyeti artırır (Chen ve ark., 2017)**.** VPA imatinib ile beraber Bcr-Abl pozitif losemi hastalarında, Bcr-Abl ekspresyonunu azaltır ve apoptozisi indükler (Morotti ve ark., 2006). Ayrıca Bcr-Abl'e direkt olmasada RAS/RAF/MEK/ERK kaskadını aktifleştirir (Blum ve Kloog., 2005). Bu özellikten faydalanarak RAS mutasyonu görünen birçok tümörde RAS inhibitörleri hücre proliferasyonu, farklılaşma ve ölümünde rol oynadıkları için önem taşırlar (McCubrey ve ark., 2007; Kloog ve ark., 2008). VPA bir HDAC inhibitörü ajan olarak, RAS inhibitörü ajan ile beraber kombine edilirse anti-kanser etkisin artığı gözlemlenmiştir (Biran ve ark., 2011). VPA tümör baskılayıcı RB ekspresyonunu artırır (Shankar ve Srivastava., 2008). Siklin D1 ve D2, C-MYC ve C-SRC gibi hücre prolifereasyonunda rolü olan genleri negatif yönde düzenler. Bu kombine tedavi direk hücre döngüsünü durdurmasada hücre döngüsünü düzenleyen proteinlerin ekspresyonunu azalttığı için hücre döngüsünün durdurmasına yol açar (Biran ve ark., 2011).

H4K12/H4K16 hipo asetilasyonu, H4K5/H4K8 hiper asetilasyonu ve H4K20 trimetilasyonu KHDAK'de görünen epigenetik değişiklikler arasındanlardır (van den Broeck, ve ark., 2008). Skuamöz hücre karsinomada daha çok HDAC3 aktivitesi artar (Bartling, B., 2005). Artmış HDAC3 ve HDAC1 ekspresyonu adeno karsinomada ve HDAC2 ekspresyonu KHDAK'de zayıf prognoz ile ilişkilidir (Osada ve ark., 2004; Minamiya ve ark., 2011; Enari ve ark., 2010; 2011). HDAC6 KHDAK'de Notch1 sinyal yolunu destekler ve bu yüzden hücre sağ kalım ve proliferasyonu artar (Deskin ve ark., 2020).

Örneğin: vorinostat ve trikostatin (TSA), HDAC inhibitörleri, beraber KHDAK tedavisinde iyi sonuçlar göstermiştir (Miyanaga ve ark., 2008). TSA ile beraber kullanılan

HDAC inhibitörleri hem dışsal ve hem de içsel apoptozis yolunu etkinleştirdiği gözlenmiştir (Kim ve ark., 2006). Vorinostat ile yapılan kombine tedavide ise siklin kinaz inhibitörü p21'i pozitif yönde düzenler, C-MYC ve bcl-2 ekspresyonunu azaltır ve G0/G1 fazında hücre döngüsünü durdurur (Li ve ark., 2011). Özellikle sigara ilişkili KHDAK'de HDAC inhibitörleri NF-KB aktivasyonu aracılığıyla TNF-alfaya duyarlılıklarını azaltırlar (Imre ve ark., 2006) ve böylece inflamatuar mikro çevreyi düzenlerler (**Şekil 1.9)** (Mamdani ve Jalal., 2020)**.**

Şekil 1.9: HDAC inhibitörlerin saptanmış kombinasyon mekanizmaları (Mamdani ve Jalal., 2020).



2. MATERYAL METOD

2.1. MATERYAL

2.1.1. Kimyasal maddeler

- Baicalein.

- Valproik asit.

- Fosfat tuz tamponu (PBS), Gibco.

- %0.05 Tripsin – Etilen Diamin Tetraasetik Asit (Tripsin -EDTA), Gibco, ABD.

- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma, Almanya.

- Tripan mavisi (%0,5), Biological industries.

- L- glutamin, Gibco.

- Fetal sığır serumu (FBS), Gibco.

- Rosewell Park Memorial Institute Medium (RPMI), Gibco.

- Penisilin- streptomisin Solüsyonu (10,000u/ml penisilin ,10mg/ml streptomisin), Gibco, ABD.

- Asetik asit, Isolab.

- Muse® Caspase-3/7 Assay Kit (Katalog No: MCH100108), Luminex Corporation.

-Muse® Annexin V & Dead Cell Assay Kit (Katalog No: MCH100101), Luminex Corporation.

- SRB (Sulforhodamine B), Santa Cruz, ABD.

- Trikoloroasetik asit, Sigma Aldrich.

- Tris Base, Sigma.

2.1.2. Sarf malzemeler

- 96 kuyulu flat plate, Costar.

- 6 kuyulu plate, Costar.

- 24 kuyulu plate, Costar.

- 25 cm^2 ve 75 cm^2 'lik flask, Thermo Scientific.

- ml'lik cam pastör pipetler, Isolab.

- 1000ul'lik pipet uçları, Biohit, Finlandiya.

- 100ul'lik pipet uçları, Biohit, Finlandiya.

- 10ul'lik pipet uçları, Biohit, Finlandiya.

- 5ml ve 10 ml hacimlerinde enjektörler, Genject.

- Kriyovial, Corning. ABD.

- Thoma lamı, Neubauer improved, Isolab.

- Otoklavlanabilir cam şişe, Isolab.

- Steril tek kullanımlık filtreler (0.2 mikron çapında). Orange Scientific.

- Steril santrifüj tüpleri (15ml, 50 ml), Nest, ABD.

- Serolojik pipetler (5ml, 10ml, 25ml, 50ml) CLEAR. line, Biosigma.

- Eppendorf tüpleri (0.5ml, 2ml, 5ml), Sigma- Aldrich Millipore®.

2.1.3. Kullanılan cihazlar

- Spektrofotometre -plate okuyucu, Spectrostar, BMG Labtech.

- Laminar hava kabini class II, Telstar, Biovanguard.

- Buzdolabı (+4^{o}C ve -20^{o}C), MPR-721- PE- Panasonic, Japonya.

- CO2 inkübatörü, MCO-230AIC-PE, Panasonic, Japonya.

- Muse Cell Analyzer, Merc Millipore Sigma, Kanada.

- Hassas terazi, ABJ-NM/ABS-N, KERN.

- Santrifüj, CF16RN, Hitachi, Japonya.

- -80^{o}C Buzdolabı, MDF- U5386S-PE, Panasonic, Japonya.

- Inverted mikroskop, Eclipse Ts2, Nikon.

- Vorteks, MX-F,Scilogex .

- Orbital shaker, Lab – Companion.

- Otoklav, OT90, Nüve.

- Çok kanallı pipet (200 ul), Brand.

- Kuru sterilizatör, MOV-212-PE, Panasonic, Japonya.

- Pipet seti (10ul, 20ul, 200 ul, 1000ul), Brand.

- Pipetör, Isolab.

2.2. METOT

2.2.1. Bileşiklerin Hazırlanması

VPA (Sigma-Aldrich, P4543) ve BAİ (Sigma-Aldrich, 465119) ticari olarak temin edilmiştir. VPA, ana stok 200mM olacak şekilde nükleaz içermeyen su ile hazırlandı ve alikotlanarak -20^{o}C'de saklandı. BAİ ise ana stok 50mM olacak şekilde DMSO'da hazırlandı ve alikotlanarak -20^{o}C'de saklandı. İlgili dozlar için dilüsyonlar besiyeri ile yapıldı.

2.2.2. Hücre Kültürü ve Besiyerleri

ATCC'den temin edilmiş olan ve laboratuvarımızda bulunan A549(CCL-185) akciğer kanseri hücre hattı ve BEAS-2B (CRL-9609) sağlıklı akciğer hücre hattı kriovial tüpler içinde -80^{o}C'de stoklandı.

Hücreler, kültürde uygun sayıya ulaşıncaya kadar %10 fetal bovine serum, 1X L-glutamin (2mM final) ve %1 Penisilin-G (100 u/ml)-Streptomisin (100 µg/ml) içeren RPMI 1640 (Gibco) besiyeri içerisinde ve 37^{o}C, %5 CO_2'li ortamda büyütüldü.

2.2.3. Hücre Soylarının Stoktan Çıkarılması

Hücreleri -80^{o}C'den çıkartılarak su banyosunda hızlı şekilde çözdürülür. Hücre süspansiyonu 15 ml'lik falkoma alınır ve dondurucu medyumu inhibe etme amacıyla %5 FBS, %1 penisilin-glutamin içeren 5ml RPMI (besiyeri) falkoma ilave edilir ve 5 dakika 800 rpm'de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatantı aspire edilir ve kalan pellet 1ml besiyeri eklenerek süspanse hale getirilir. 1ml hücre süspansiyonu 25cm^2 flaska alınır ve 4 ml hazırlanan besiyeri ilave edilerek 37^{o}C, %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edilir.

2.2.4. Hücre Soylarının Pasajlanması

Kullandığımız hücreler yüzeyi tamamen kapladıkları zaman pasaj işlemiyle yoğunluğu azaltılır. 25cm^2 flask içindeki besiyerini aspire edip 2ml 1X PBS ilave edilir. PBS yardımıyla flask'ın iç yüzeyi hücre kalıntılarından temizlendikten sonra hücrelerin yüzeyden ayrılması amacıyla 1ml 0.25 tripsin ilave edilir ve 5 dakika 37^{o}C, %5 CO_2 içeren ortamda inkübe edilir. Sürenin sonunda hücreleri mikroskopta yüzeyden ayrıldığını kontrol edip ve hücre zarının zarar görmemesi amacıyla flaskdaki tripsin %10

FBS, %1 penisilin-glutamin içeren 5 ml besiyeriyle (tripsin hacminin 5 katı kadar) inhibe edilir. Flask içindeki hücre süspansiyonunu 5dakika 800 rpm'de santrifüj edilir. Süre sonunda süper natant aspire edilir ve kalan pellete besiyeri eklenerek 75cm^2'lik flaska son hacim 10 ml olacak şekilde aktarılır. Hücreler 37ºC, %5 CO_2 ortamda inkübe edilir.

2.2.5. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücreler pasaj protokolü takip edilerek süspanse hale getirildi. Hücre sayım için 10ul hücre süspansiyonu 96 kuyulu pleyte aktarıldı ve üzerine eşit miktarda %0,5 tripan mavisi eklenerek homojen şekilde karışmaları sağlandı. Sonra hazırlamış olduğumuz 20ul'lik karışım 10'ar ul olacak şekilde hemositometri üzerine alınarak iki farklı alanda hücre sayımı yapıldı. Aşağıdaki formül kullanılarak 1 ml içerisindeki hücre sayısı belirlendi:

Konsantrasyon (hücre/ml)= Hücre sayısı × 10^4 × Dilüsyon (sulandırma katsayısı) / sayılan alan

2.2.6. Hücre Stoklanması

Hücreler (A549, Beas-2B) %70-80 konfluent hale geldiği zaman pasaj yapılarak hücre yoğunluğu azaltılır. Flasklarda bulunan bu adherent hücrelerin eski besiyerleri uzaklaştırılır ve 1× PBS ile yıkanılır. Sonra hücreleri yüzeyden kaldırmak için %0.05 Tripsin – EDTA solüsyonu kullanılır ve flasklar 5 dakika innkübatörde bekletilir. Süre sonunda, tripsini inhibe etmek için her flaska tripsinin 5 katı kadar besiyeri ilave edilir. Sonra hücreler 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak 800 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir. Sonra supernatant aspire edilerek pellet 1ml dondurucu medyum (%10 FBS, %10 DMSO, %80 RPMI) ile sulandırılır ve her kriovial içinde 2-2.5x10^6 hücre olacak şekilde dağıtılarak -80ºC'e kaldırılır.

2.2.7. Sulforhodamine B (SRB) Canlılık Testi

SRB yöntemi 1990 yılında gelişen ve yaygın olarak kullanılan bir sitotoksite belirleme metodudur. Bu yöntemde asidik özelliğine sahip SRB boyası TCA (Trikloroasetik asit) tarafından fiksse edilmiş hücrelerin protein bileşenlerine stoikiometrik şekilde bağlanır. Bağlanma oranı hücresel protein içeriği ile ilişkilidir.

Birçok örneği kısa zamanda test etme fırsatı sağlar, ekonomik bir yöntemdir ve basit ekipmanlar gerektirir (Skehan ve ark., 1990; Vichai ve Kirtikara., 2006).

SRB protokolü dört aşamadan oluşur:

- Hücrelerin ekilmesi ve tedavinin hazırlanması
- Hücrelere tedavi uygulamak ve etkileşimi göstermek amacıyla inkübe etmek
- İnkübasyon süresi sonunda hücreyi TCA ile fikse edip SRB ile boyamak
- SRB boyasının çözülmesi ve absorbans ölçümü

Bu amaçla hücreler 2000 hücre/100ul besiyeri olacak şekilde 96 kuyulu pleytte ekildi. Hücre ekiminden 24 saat sonra ilaç uygulaması yapıldı. BAİ (100-12.5uM) ve VPA (2- 0.25 mM) için farklı konsantrasyonlar seri dilüsyon yaparak hazırlandı ve 100 ul içinde uygulandı. Kontrol grubu olarak tedavi uygulanmamış hücreler kullanıldı. Sadece 200 ul besiyeri eklenmiş kuyular kör olarak kullanıldı. Tedavi uygulanan pleytler 24, 48 ve 72 saat süreyle 37^{o}C, %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda SRB testi her bir veri noktası için 3 farklı kuyucuk kullanılarak ve en az 2 bağımsız deney olacak şekilde gerçekleştirildi.

Bu aşamada, BAİ ve VPA varlığında hücrelerin büyüme profili belirlendi. Bu amaçla, öncelikle, ilaç uygulamadan önce hücrelerin absorbansı ölçüldü (Tz, sıfırıncı zaman). Daha sonra ilgili tedavi gruplarında doza ve zamana bağlı olarak anti-proliferatif, sitostatik veya sitotoksik etkileri değerlendirmek üzere GI_{50}, TGI ve LC_{50} parametreleri aşağıda belirtilen formüller kullanılarak hesaplandı:

- Tz değeri: Başlangıç (tedavi uygulanan an) hücre popülasyonunun absorbans değerini ifade etmektedir.
- C: İlgili tedavi süresi sonunda tedavi uygulanmamış hücrelerdeki (negatif kontrol) absorbans değerini ifade etmektedir.
- D: İlgili tedavi süresi sonundaki absorbans değerini belirtmektedir.
- GI_{50}: Tedavi sonrasında, kontrol hücrelerine kıyasla, hücre popülasyonunu maksimum %50 oranında azaltan konsantrasyonu (anti-proliferatif) göstermektedir ve "$100\times(D-Tz)/(C-Tz)=50$'' denklemi ile hesaplanmaktadır.

- TGI: Total büyüme inhibisyonuna (sitostatik etki) yol açan konsantrasyonu göstermektedir ve ‘‘100×(D−Tz)/(C−Tz)=0’’ denklemi ile hesaplanmaktadır.
- LC_{50}: Tedavi sonrasında ilk andaki hücre popülasyonunu %50 oranında azaltan konsantrasyonu (sitotoksik) göstermektedir ve ‘‘100×(D−Tz)/Tz=-50’’ denklemi ile hesaplanmaktadır.

Kombinasyon tedavi uygulaması için BAİ (100-12.5uM) ve VPA (2-0.25mM)’nın eşlenik dozları (100uM +2mM; 50uM +1mM; 25uM +0.5mM; 12,5uM +0.25mM) kullanıldı. Bu amaçla, hücreler 2000 hücre/100ul besiyeri olacak şekilde 96 kuyulu pleytte ekildi. Hücre ekiminden 24 saat sonra ilaç uygulaması yapıldı. Tedavi uygulanan hücreler 24, 48 ve 72 saat süreyle 37^{o}C, %5 CO_2’li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda SRB testi yapıldı ve % canlılık hesaplandı.

SRB yöntemi için, %1 asetik asit çözeltisi içerisinde %0.4 kütle/hacim olacak şekilde srb boyası hazırlandı. Hazırlanan boya +4^{o}C’de saklandı. TCA ise %50 kütle/hacim olacak şekilde distile su ile hazırlandı ve 4^{o}C’de saklandı. İnkübasyon suresi tamamlanmış 96‘lik pleyte fiksasyon işlemi 50 ul/kuyu TCA eklendi ve 1 saat +4^{o}C’de inkübe edildi. Sonra TCA kuyulardan uzaklaştırılıp 5 kez distile su ile yıkama yapıldı. Sonra kuyular iyice kurutuldu ve her kuyuya 50 ul SRB boyası eklenerek 30 dakika oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edildi. Süre sonunda SRB boyası uzaklaştırıldı ve kuyular %1 asetik asit ile 5 kez yıkandı. Pleyt kurutulduktan sonra boya çözdürülmesi amacıyla her kuyuya 150ul (10mM, PH:10) Tris bazı eklendi ve 10 dakika 100 rpm’de orbital çalkalayıcıda karıştırıldı. Sonra elde edilen renk spektromu spektrofotometrede (Plate Reader- Specrofotometre, BMG Labtech, specrostar) 564nm dalga boyunda ölçüldü ve elde edilen absorbans değerleri ile hücre canlılığı hesaplandı. Kontrol grubunun canlılığı %100 olarak değerlendirildi ve tedavi uygulanan hücrenin canlılığı bu formüle göre hesaplandı:

$$\%\text{Canlılık} = \frac{\text{Tedavi uygulanan grubun absorbans ortalaması – kör}}{\text{Kontrol grubunun absorbans ortalaması – kör absorbans ortalaması}}$$

2.2.8. Akım Sitometri Analizleri

Akım sitometride hücreler tek tek flow cell diye tanımlanan kapiler borudan geçirilir ve burada lazere maruz kalır. Cihazın ölçüm yapabilmesi adına hücrelerin bu aşamada süspanse durumda olmaları gerekir. Sonuçta hücreler hücre boyutuna bağlı olarak lazer ışığını saptırır. Eğer floresan bir madde kullanarak hücreler işaretlenirse lazer ışığının saptırılması floresan ışıma olarak yansır. Bu işaretleme, hücre içinde veya yüzeyinde bulunan proteinlere özgü antikorlara FITC, 7-AAD ve PE gibi boyaların eklenmesi ile gerçekleştirilir (Karaboz ve ark., 2008).

2.2.8.1. Anneksin V-FITC Analizi

Erken ve geç dönem apoptozisi belirlemek için bu yöntem kullanılır (Kerr ve ark., 1972). Canlı hücrelerde membranın iç ve dış katmanında çeşitli bulunan fosfolipitler flipazlar ile korunur. Fosfatidil serin (PS) genelde membranın sitozolik tarafında bulunan bir fosfolipittir. Apoptotik hücre ölümü gerçekleştiği zaman PS iç membran katmanından yüzeye transfer olur. Bu süreçte membran bütünlüğü korunurken fagositik yanıt tetiklenir ve hücre makrofajlar tarafından tespit edilerek yutulur. Anneksin V ve PS karşılaştırıldıkları zaman birbirini çekerler ve böylece bağlanırlar. Bu sebeple Anneksin V-FITC gibi floresan bir prob ile işaretlenirse bize florositometrik bir yöntem ile apoptozisi analiz etme fırsatı tanır. 7-AAD boyası hücre içi DNA'ya bağlanan bir boyadır ve membran bütünlüğü korundukça içeri girme şansı bulamaz. Dolayısıyla membran bütünlüğünün kaybolduğu geç dönem apoptotik ya da nekrotik hücrelerin analizinde kullanılır (Turcotte ve ark., 1994).

Muse AnneksinV ve Dead Cell kiti kullanarak ölçüm yapabilmemiz için A549 hücreleri 6- kuyulu pleyte her kuyu 5×10^4 hücre /1 ml besiyeri içerecek şekilde ekim yapıldı. Hücreler, morfoloji kazanması için, 24 saat 37^{o}C, %5 CO_2'li ortamda inkübe edildi. İnkübasyon suresinin sonunda, BAİ ve VPA'nın IC_{90} dozları ile 24 ve 48 saat tedavi uygulandı. Bu amaçla, BAİ 100uM ve VPA 2mM olacak şekilde tek başlarına veya kombinasyon halinde kuyulara eklendi (Final konsantrasyon 2ml). Kontrol grubu olarak tedavi uygulanmamış hücreler kullanıldı. İlgili süreler sonunda, kontrol grubu hariç, tedavi uygulanan hücrelerin üstündeki besiyeri 15 ml'lik santrifüj tüpünde toplandı. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra Tripsin-EDTA eklenerek hücreler kaldırıldı. Daha sonra

hücreler ilgili santrifüj tüpüne aktarıldı ve 500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 100 ul %1 FBS içeren PBS ile süspanse hale getirilerek 1.5 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. İlgili tüplere 100 ul Muse Annexin & Dead Cell solüsyonu eklenerek vorteks yapıldı ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda Muse ™ cell analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı **(Tablo 2.1).**

Tablo 2.1: AnneksinV/7-AAD boyama analizi.

	AnneksinV	**7-AAD**
Canlı hücreler	-	-
Erken dönem apoptotik hücreler	+	-
Geç dönem apoptotik hücreler	+	+
Nekroz	-	+

2.2.8.2. Kaspaz 3/7 Aktivitesinin Analizi

Hücrelerde kaspaz bağımlı apoptozisi ve membran bütünlüğünün değerlendirilmesinde kullanılır. Bu test için A549 hücreleri Anneksin V testinde olduğu gibi ekildi ve 24 saat inkübe edildikten sonra BAİ ve VPA ile 24-48 saat tedavi uygulandı. Hücreler yukarıda açıklanan şekilde toplandıktan sonra 50ul %1 FBS içeren PBS ile süspanse edildi ve 1.5ml' lik santrifüj tüpüne aktarıldı. İlgili tüplere 5 ul kaspaz 3/7 solüsyonu eklendi ve vorteks yapıldı. Sonra tüpler kapağı açık şekilde 30 dakika inkübatörde bekletildi. Sürenin sonunda 150 uL 7-AAD boyası eklendi, vorteks yapıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında, karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda Muse ™ cell analyzer cihazı ile ölçüm yapıldı **(Tablo 2.2).**

Tablo 2.2: Kaspaz3/7 aktivitesinin analizi.

	Kaspaz3/7	**7-AAD**
Canlı hücreler	-	-
Erken dönem apoptotik hücreler	+	-
Geç dönem apoptotik hücreler	+	+
Nekroz	-	+

2.2.9. Migrasyon (Yara iyileşmesi) Testi

Özellikle cildin restorasyonunda çok önemli rolü olan yara iyileşmesi farklı hücre tiplerinin katılımıyla organize edilir. Homostaz, inflamasyon, proliferasyon, migrasyon ve yeniden biçimlendirme olarak 5 aşamaya ayrılabilir (Martinotti ve ark., 2018). Yara yatağında hücre göç eder; bu sebeple *in vitro* şartlarda hücre migrasyonunu değerlendirebiliriz. Bu çalışmalar, etik sebeplerden dolayı, *in vitro* deneylerde yaygın olarak kullanılmaktadır (Ranzato ve ark., 2011). 2D yara iyileştirme yönteminde temel prensip tek katlı konfluent bir hücre yapısını bozmak ve hücre migrasyonu için hücresiz bir alan yaratmaktır. 2D yöntem üç temel aşamadan oluşur:

- Hücre yaralanması
- İyileşme surecinin takibi
- Toplanan verilerin analizi (Martinotti ve ark., 2019).

A549 hücreleri 24 kuyuluk pleyte $6x10^4$ hücre /250ul besiyeri olacak şekilde ekildi. Ekilen hücreler yüzeyi kaplayıp 90-100% oranında yayılma gösterdiğinde üstündeki besiyeri aspire edildi ve 200ul'lik steril pipet ucuyla baştan sonra lineer bir çizgi çekildi. Kalkan hücreleri aspire etmek amacıyla PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra hücreler BAİ ve VPA'nın IC_{50} dozu ile 24-96 saat inkübe edildi. Bu amaçla, BAİ 25uM ve VPA 0.5mM olacak şekilde tek başlarına veya kombinasyon halinde kuyulara eklendi (Final konsantrasyon 500ul). Her bir süre zarfında değişiklikler kamera bağlantılı mikroskopda 4X objektif yardımıyla görüntülendi.

2.2.10. İstatistiksel analiz

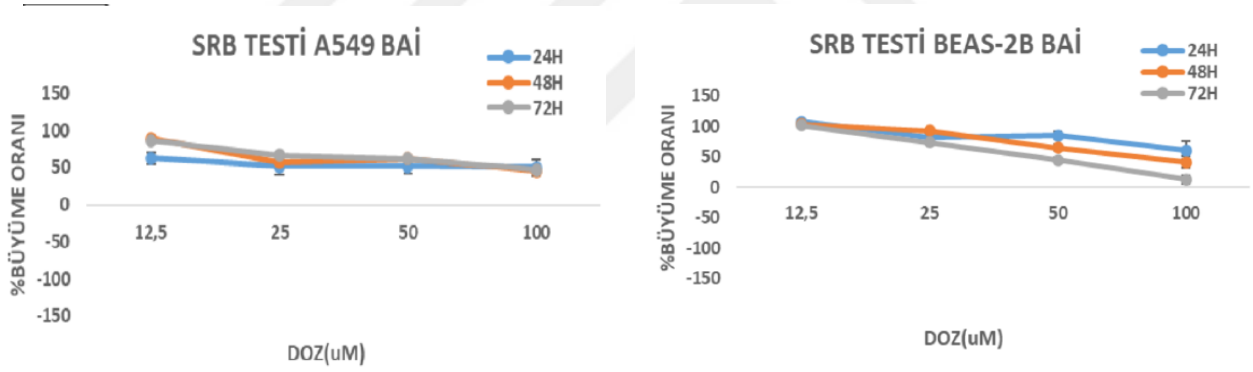
Tüm istatistiksel analizler GraphPad Prism 6.0 (Demo Versiyonu) programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile Tukey çoklu karşılaştırma (post-hoc) testi kullanılarak hesaplandı. İstatistiksel olarak anlamlı veriler $p<0,05$ değerine göre belirlendi. İki tekrarlı yapılan analizlerin sonuçları ortalama ve standart sapma ile verildi. Sinerjistik, aditif ve antagonistik etkiyi belirlemek için Kombinasyon indeksi (CI; combination index) değerleri CalcuSyn Version 2.1 (Biosoft, UK) yazılımı kullanılarak Chou-Talalay metoduna göre hesaplandı.

3. BULGULAR

3.1. SRB Canlılık Testi Bulguları

3.1.2. Baicalein'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

A549 ve BEAS-2B hücrelerinde, BAİ'nin hücre canlılığı üzerine etkisini incelemek için farklı doz (12,5-100uM) ve sürelerde (24-48-72) tedavi uygulandı ve % büyüme eğrisi (% growth rate) oluşturuldu **(Şekil 3.1)**. BAİ, A549 hücreleri için çalışılan doz aralığında ve sürelerde anti-proliferatif etki sergilediği gözlendi **(Şekil 3.1A)**. BEAS-2B hücrelerinde ise doza ve zamana bağlı olarak anti-proliferatif ve sitostatik etkiye çok yakın bir aktivite sergilediği belirlendi **(Şekil 3.1B)**. BAİ için anti-proliferatif (GI_{50}), sitostatik (TGI) ve sitotoksik (LC_{50}) aktive sergilediği dozlar Tablo 3.1'de gösterilmiştir.



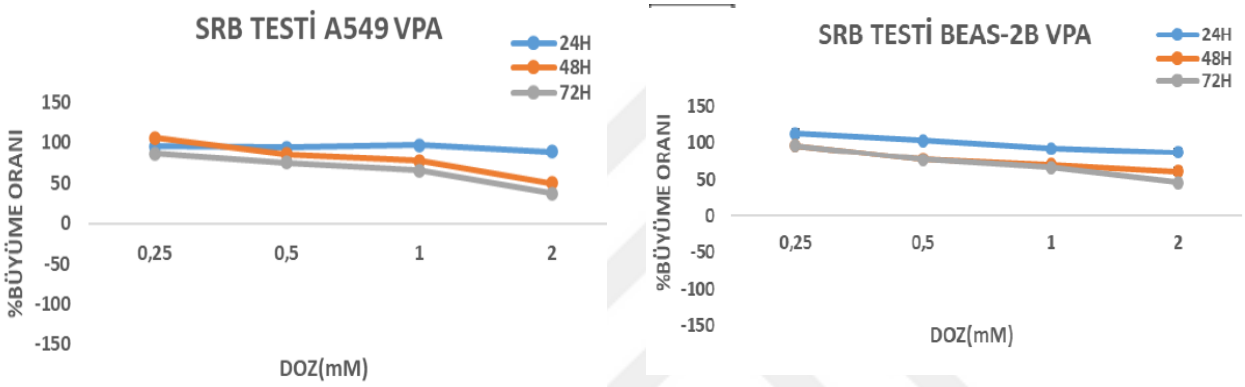
Şekil 3.1: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde Baicalein uygulaması sonrası hücre canlılığının doz ve zamana bağlı şekilde değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir.

Tablo 3.1: A549 ve BEAS-2B hücrelerinde Baicalein uygulaması sonrası GI_{50} (anti proliferatif etki), TGI (sitostatik etki) ve LC_{50} (sitotoksik etki) değerleri.

Hücre	**A549**			**BEAS-2B**		
Süre	**24 saat**	**48 saat**	**72 saat**	**24 saat**	**48 saat**	**72 saat**
GI_{50}	90,77	86,25	88,68	>100	81,00	45,05
TGI	>100	>100	>100	>100	>100	>100
LC_{50}	>100	>100	>100	>100	>100	>100

3.1.2. Valproik Asit'in Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

A549 ve BEAS-2B hücrelerinde, VPA'nın hücre canlılığı üzerine etkisini incelemek için farklı doz (0,25-2mM) ve sürelerde (24-48-72) tedavi uygulandı ve % büyüme eğrisi oluşturuldu. VPA'nın, her iki hücre için çalışılan doz aralığında ve sürelerde anti-proliferatif etki sergilediği gözlendi **(Şekil 3.2)**. A549 ve BEAS-2B hücrelerinde VPA için anti-proliferatif (GI_{50}) doz yaklaşık 2mM olarak belirlenmiştir **(Tablo 3.2).**



Şekil 3.2: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde VPA uygulaması sonrası hücre canlılığının doz ve zamana bağlı şekilde değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir.

Tablo 3.2: A549 ve BEAS-2B hücrelerinde VPA uygulaması sonrası GI_{50} (anti proliferatif etki), TGI (sitostatik etki) ve LC_{50} (sitotoksik etki) değerleri.

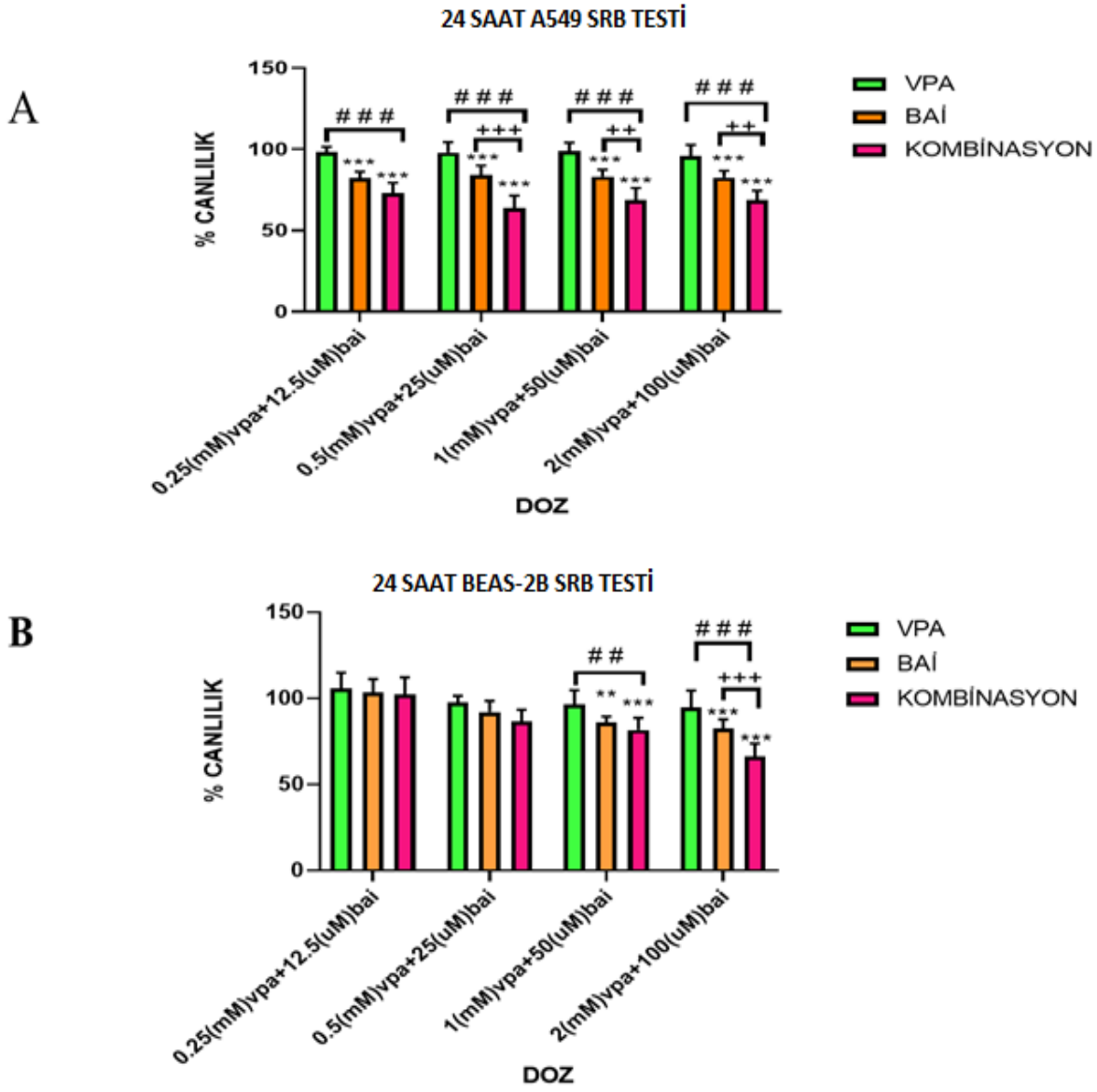
Hücre	**A549**			**Beas-2B**		
Süre	**24 Saat**	**48 Saat**	**72 Saat**	**24 Saat**	**48 Saat**	**72 Saat**
GI_{50}	>2	1,99	1,55	>2	>2	1,79
TGI	>2	>2	>2	>2	>2	>2
LC_{50}	>2	>2	>2	>2	>2	>2

3.1.3. Kombinasyon Uygulamasının Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

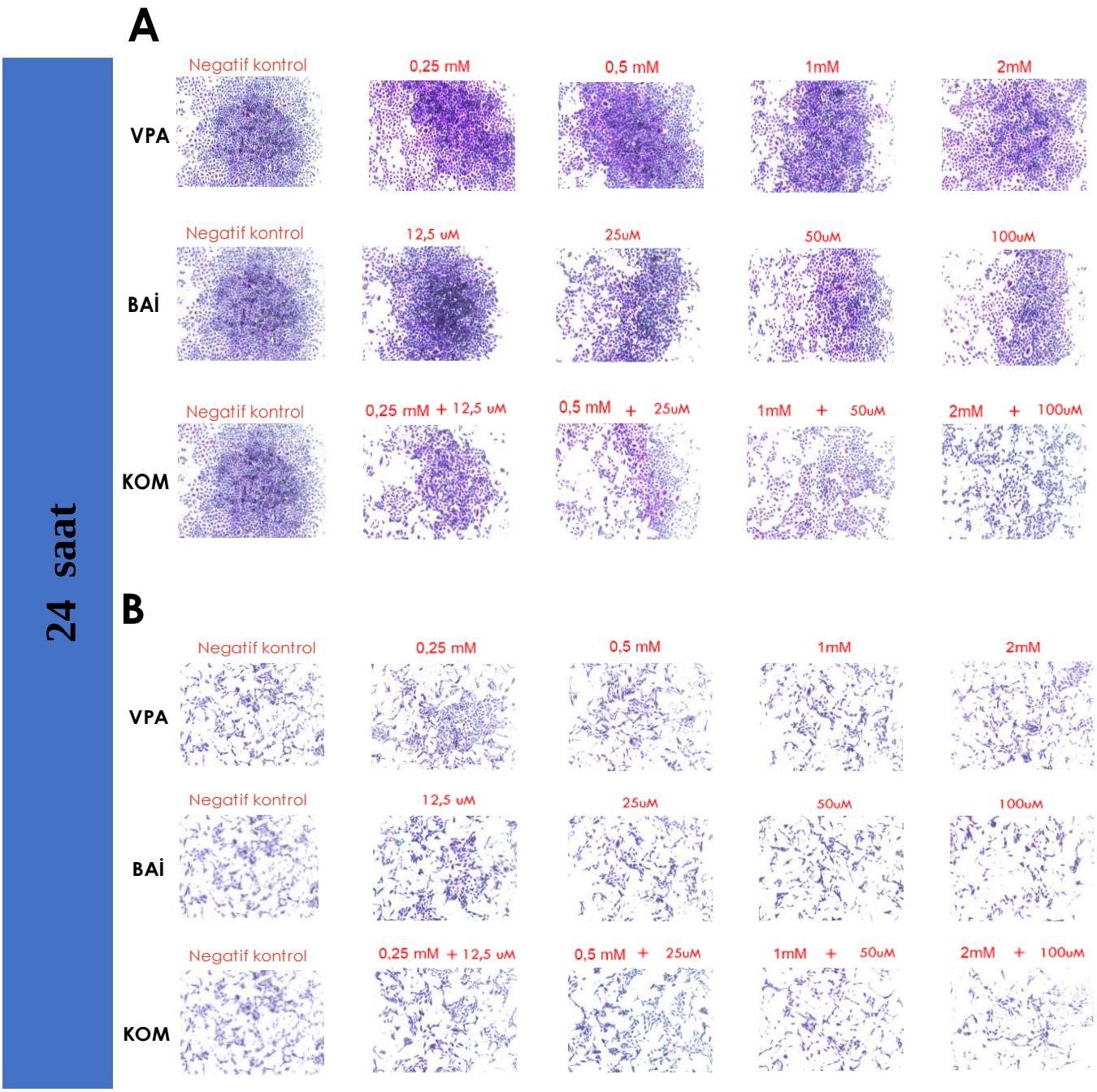
Doz-yanıt çalışmaları ve büyüme eğrileri oluşturulduktan sonra VPA ve BAİ'nin eşlenik dozları ile kombinasyon çalışması gerçekleştirildi. Bu amaçla, hücreler sırasıyla, BAİ ve VPA'nın (100uM +2mM; 50uM +1mM; 25uM +0,5mM ve 12,5uM +0,25mM)

dozları ile 24-72 saat süreyle muamele edildi. Her iki hücre grubunda da hücre canlılığının doza ve zamana bağlı olarak anlamlı şekilde azaldığı belirlendi **(Şekil 3.3; 3.6; 3.9**). Sağlıklı hücre grubu ile kıyaslandığında, kombinasyon tedavisinin göreceli olarak düşük dozlarda A549 hücrelerinde daha etkili olduğu gözlendi **(Şekil 3.4; 3.7; 3.10).**

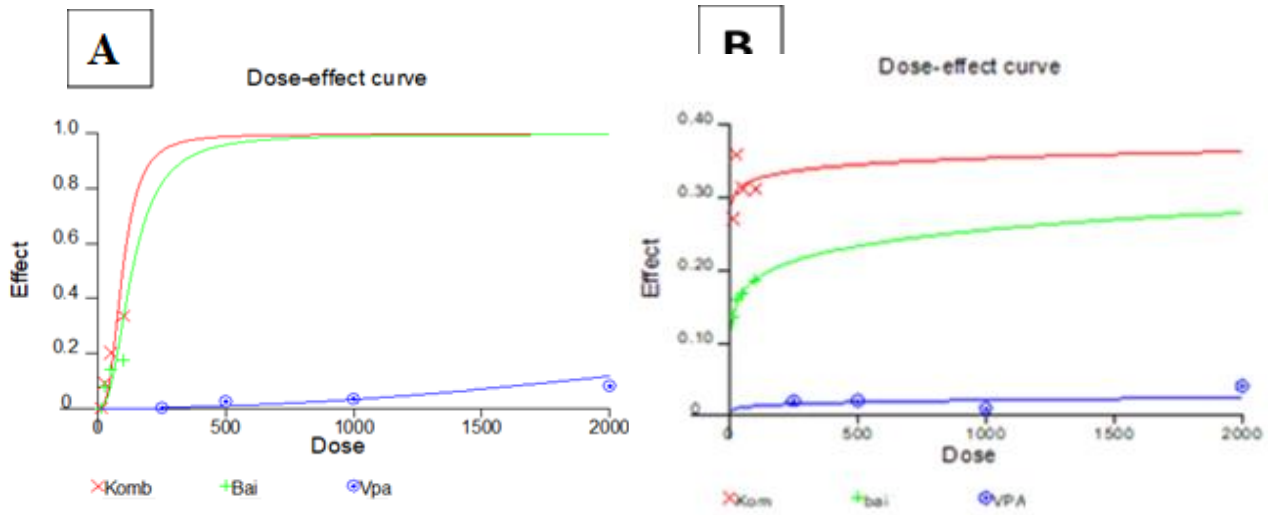
Bu deneylerin sonucunda; apoptozis analizleri için hücrelerin %90'ını öldüren doza (IC_{90}) en yakın doz olan 100+2 kullanıldı. IC_{90} dozu için kombinasyon indeks (CI) değerleri **(Şekil 3.5; 3.8; 3.11)** incelendiğinde, bu kombinasyon modelinin A549 hücrelerinde zamana bağlı olarak sinerjistik veya aditif etki sergilediği belirlendi. Buna karşılık BEAS-2B hücrelerinde antagonistik etki sergilediği gözlendi **(Tablo 3.3; 3.4; 3.5).** A549 ve BEAS-2B için belirlenen IC_{50} ve IC_{90} dozları Tablo 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.3: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 24 saat kombinasyon uygulaması sonrası hücre canlılığının doza bağlı şekilde değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (* p<0,05; **: p<0,01; ***:p<0,001); + BAİ'ye göre (+:p<0,05; ++:p<0.01; +++:p<0.001) ve # VPA'ya göre (#:p<0,05 ##:p<0,01; ###; p<0.001) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.



Şekil 3.4: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 24 saat kombinasyon uygulaması sonrası hücrelerin morfolojik görüntüleri (×4).

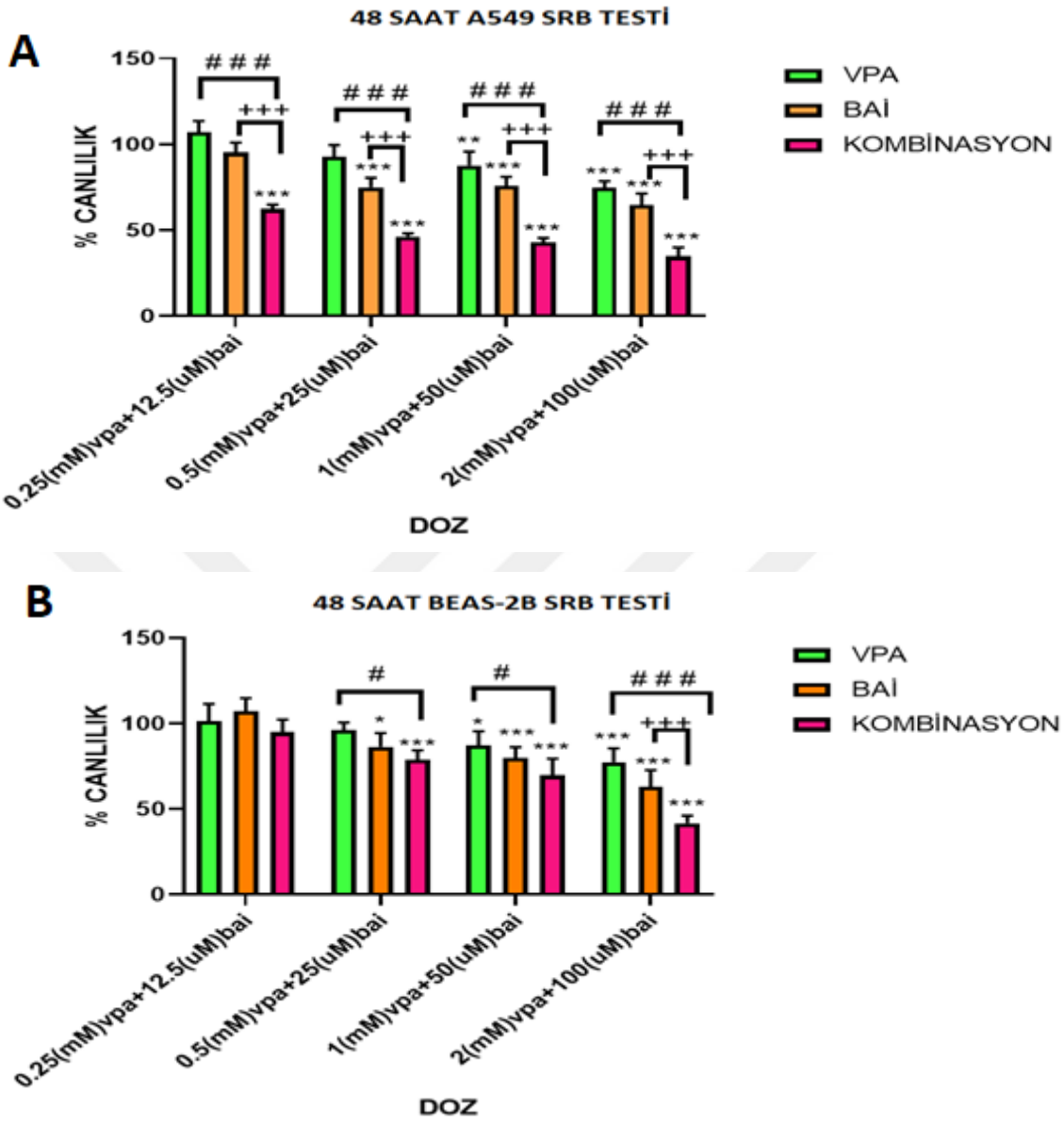


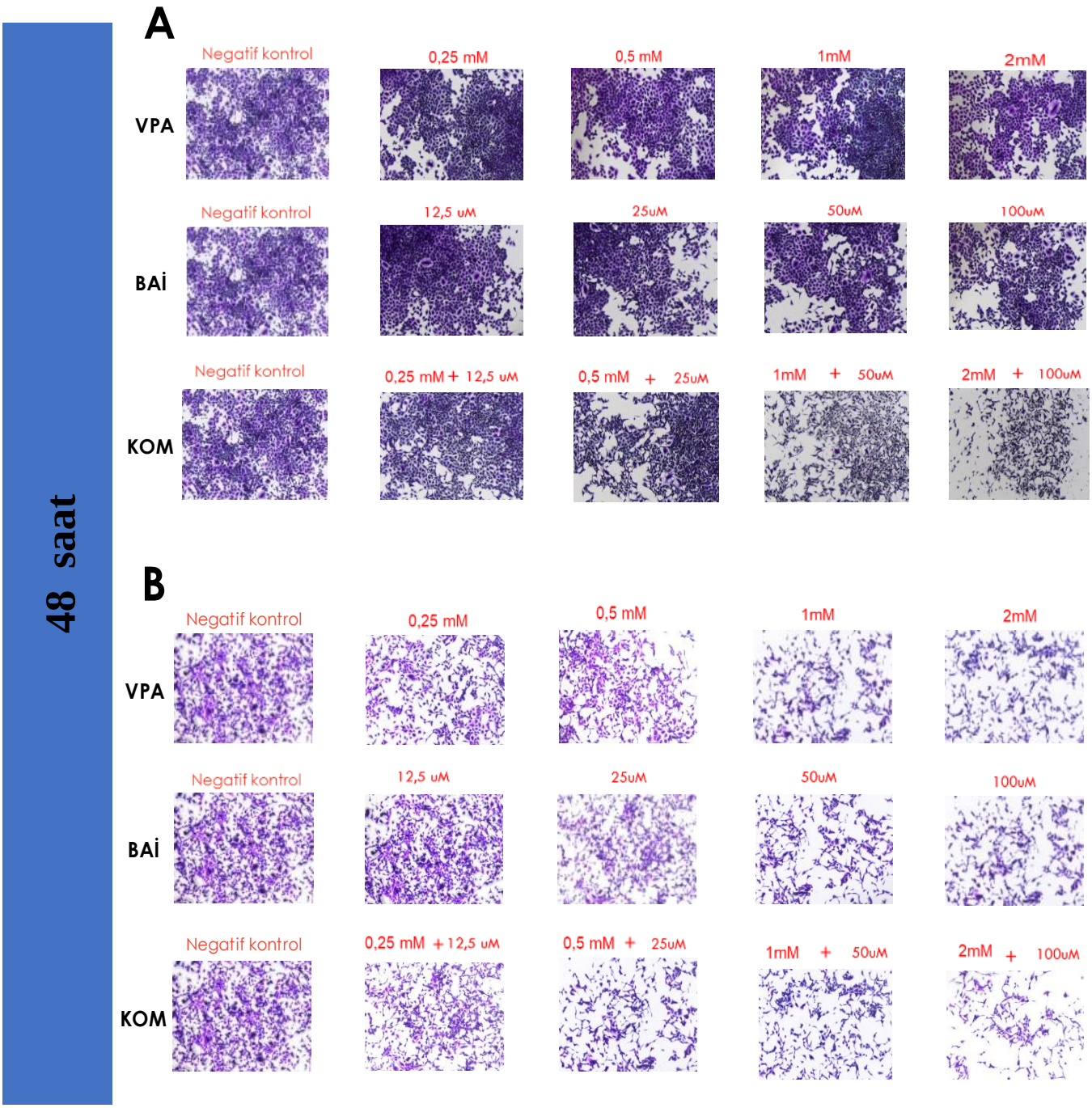
Şekil 3.5: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 24 saat kombinasyon **uygulaması sonrası doz-etki eğrileri.**

Tablo 3.3: A549 ve BEAS-2B hücrelerinde 24 saat kombinasyon uygulaması sonrası Kombinasyon İndeks Değerleri.

KOMBİNASYON A549 24 SAAT	CI DEĞERI	SEMBOL	Tanımlanan etki
12,5uM BAİ+0,25mM VPA	0,008	+ + + + +	Çok Güçlü Sinerjism
25uM BAİ+0,5mM VPA	0,001	+ + + + +	Çok Güçlü Sinerjism
50uM BAİ+1mM VPA	0,01	+ + + + +	Çok Güçlü Sinerjism
100uM BAİ+2mM VPA	0,02	+ + + + +	Çok Güçlü Sinerjism

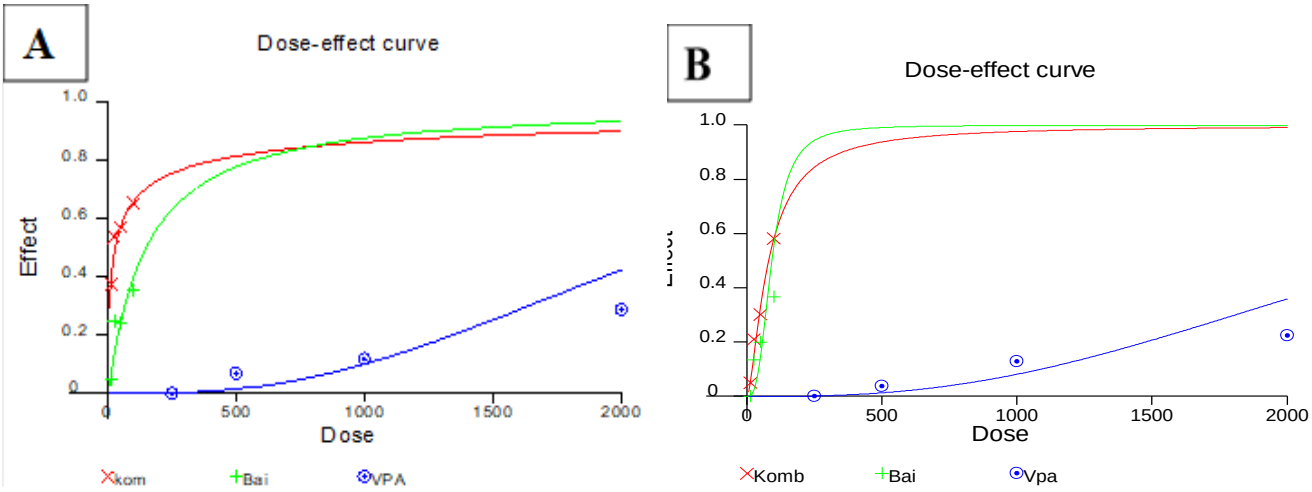
KOMİNASYON BEAS-2B 24 SAAT	CI DEĞERI	SEMBOL	Tanımlanan etki
12,5uM BAİ+0,25mM VPA	3,121	- - -	Antagonism
25uM BAİ+0,5mM VPA	0,775	+ +	Orta Derece sinerjism
50uM BAİ+1mM VPA	1,029	+-	Neredeyse Aditiv
100uM BAİ+2mM VPA	1,506	- - -	Antagonism


A
48 SAAT A549 SRB TESTİ
% CANLILIK
150
100
50
0
VPA
BAİ
KOMBİNASYON
0.25(mM)vpa+12.5(uM)bai
0.5(mM)vpa+25(uM)bai
1(mM)vpa+50(uM)bai
2(mM)vpa+100(uM)bai
DOZ
B
48 SAAT BEAS-2B SRB TESTİ
% CANLILIK
150
100
50
0
VPA
BAİ
KOMBİNASYON
0.25(mM)vpa+12.5(uM)bai
0.5(mM)vpa+25(uM)bai
1(mM)vpa+50(uM)bai
2(mM)vpa+100(uM)bai
DOZ



Şekil 3.6: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 48 saat kombinasyon uygulaması sonrası hücre canlılığının doza bağlı şekilde değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (* p<0,05; **: p<0,01; ***:p<0,001); + BAİ'ye göre (+:p<0,05; ++:p<0.01; +++:p<0.001) ve # VPA'ya göre (#:p<0,05 ##:p<0,01; ###; p<0.001) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.

Şekil 3.7: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 48 saat kombinasyon uygulaması sonrası hücrelerin morfolojik görüntüleri (×4).

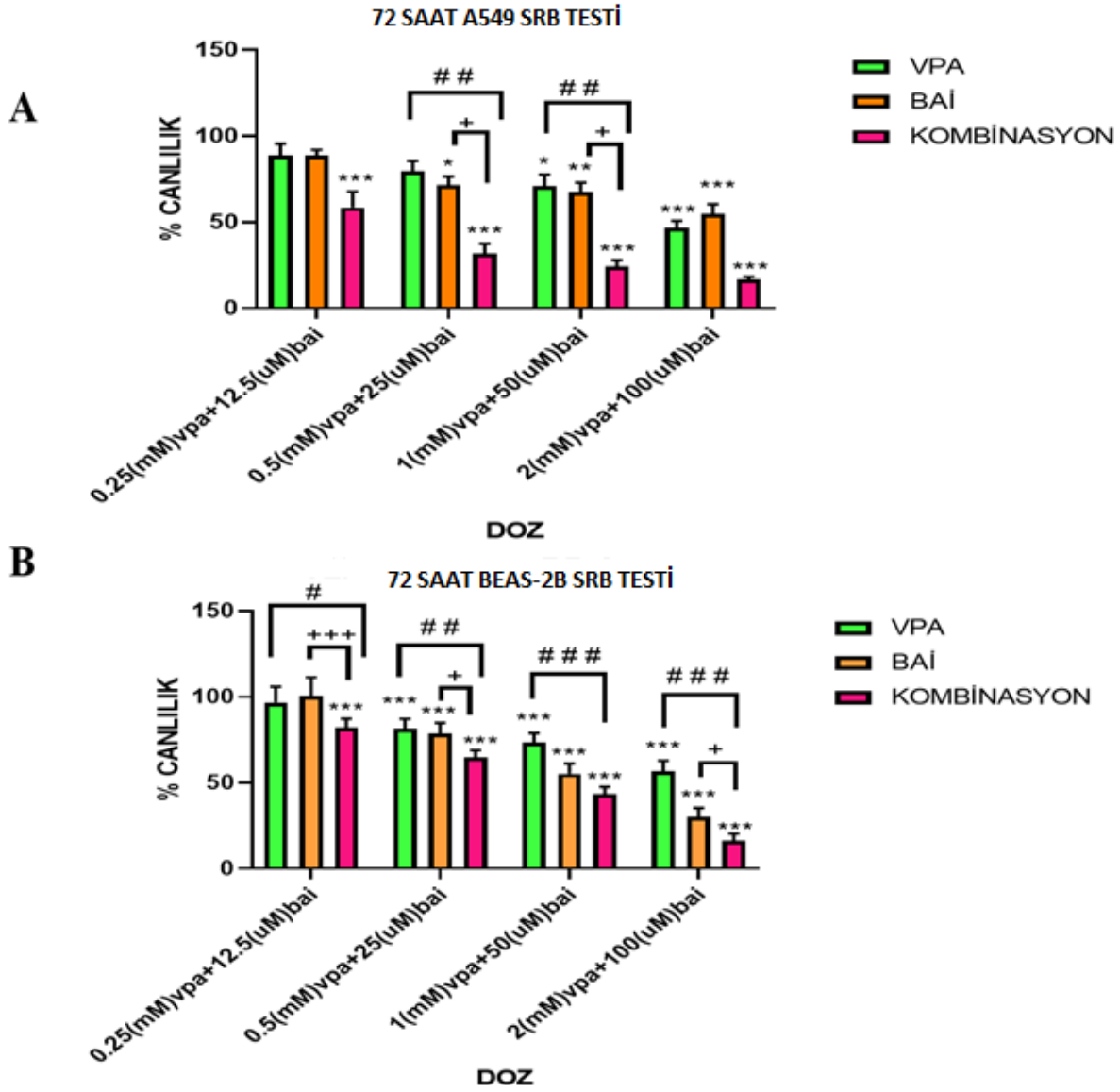


Şekil 3.8: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 48 saat kombinasyon uygulaması sonrası doz-etki eğrileri.

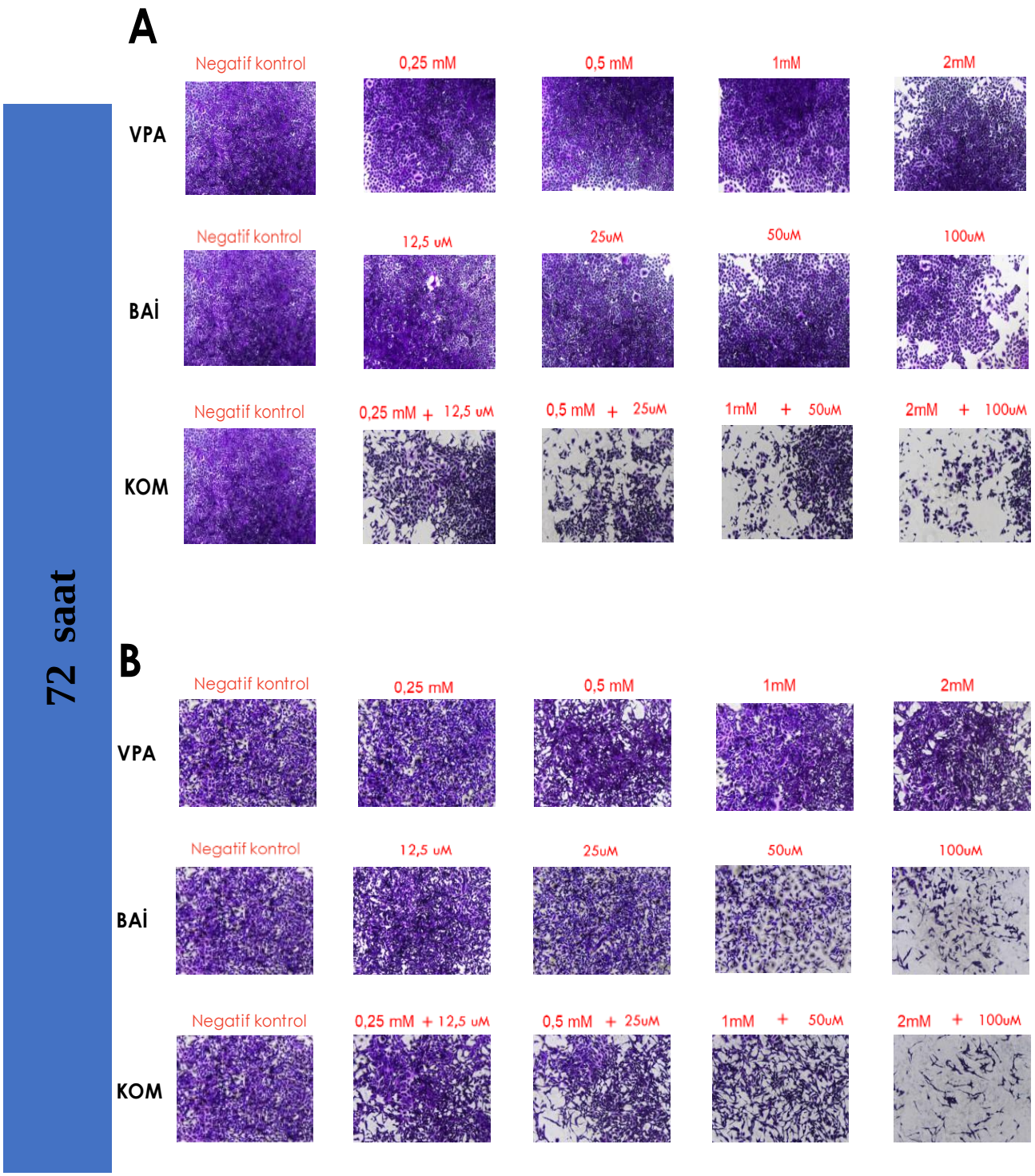
Tablo 3.4: A549 ve BEAS-2B hücrelerinde 48 saat kombinasyon uygulaması sonrası Kombinasyon İndeks Değerleri.

KOMBİNASYON A549 48 SAAT	CI DEĞERI	SEMBOL	Tanımlanan etki
12,5uM BAİ+0,25mM VPA	0,274	++++	Güçlü SİNERJİSM
25uM BAİ+0,5mM VPA	0,358	+++	Sinerjism
50uM BAİ+1mM VPA	0,661	+++	Sinerjism
100uM BAİ+2mM VPA	1,076	+-	Neredeyse Aditiv

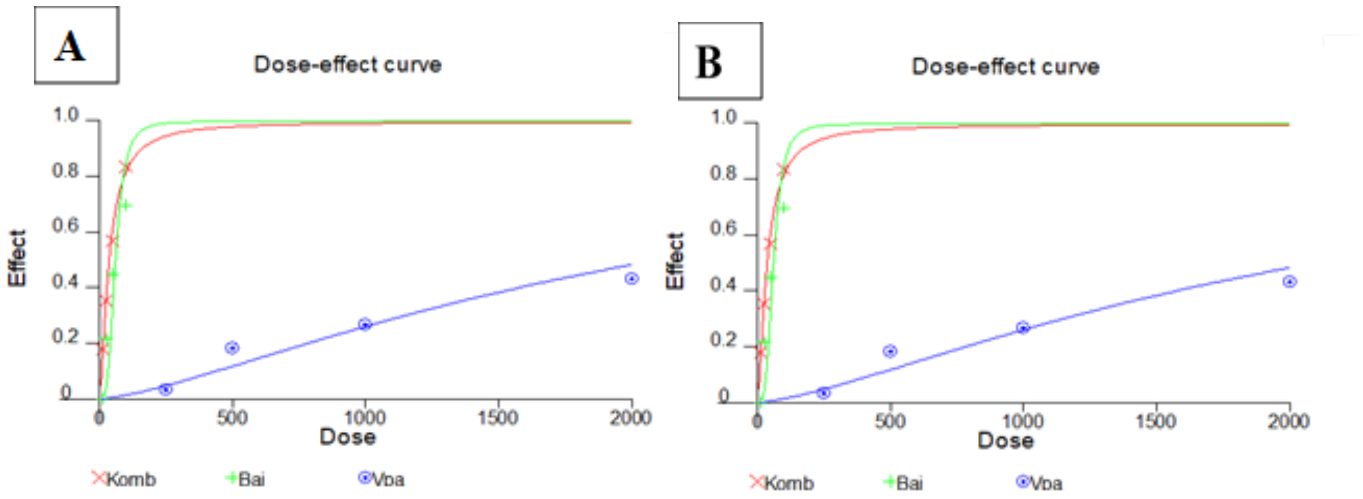
KOMBİNASYON BEAS-2B 48 SAAT	CI DEĞERI	SEMBOL	Tanımlanan etki
12,5uM BAİ+0,25mM VPA	0,691	+++	Sinerjism
25uM BAİ+0,5mM VPA	0,768	++	Orta Derece sinerjism
50uM BAİ+1mM VPA	1,291	--	Orta Derece Antagonism
100uM BAİ+2mM VPA	1,684	---	Antagonism



Şekil 3.9: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 72 saat kombinasyon uygulaması sonrası hücre canlılığının doza bağlı şekilde değişimi. Her bir veri noktası 2 bağımsız çalışmanın ortalamasını temsil etmektedir. *Aynı zaman periyodu içinde kontrole göre (* p<0,05; **: p<0,01; ***:p<0,001); + BAİ'ye göre (+:p<0,05; ++:p<0.01; +++:p<0.001) ve # VPA'ya göre (#:p<0,05 ##:p<0,01; ###; p<0.001) karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılığı göstermektedir.



Şekil 3.10: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 72 saat kombinasyon uygulaması sonrası hücrelerin morfolojik görüntüleri (×4).



Şekil 3.11: A549 (A) ve BEAS-2B (B) hücrelerinde 72 saat kombinasyon uygulaması sonrası doz-etki eğrileri.

Tablo 3.5: A549 ve BEAS-2B hücrelerinde 72 saat kombinasyon uygulaması sonrası Kombinasyon İndeks Değerleri.

KOMBİNASYON A549 72 SAAT	CI DEĞERI	SEMBOL	Tanımlanan etki
12,5uM BAİ+0,25mM VPA	0,344	+++	Sinerjism
25uM BAİ+0,5mM VPA	0,204	++++	Güçlü Sinerjism
50uM BAİ+1mM VPA	0,275	++++	Güçlü Sinerjism
100uM BAİ+2mM VPA	0,331	+++	Sinerjism

KOMBİNASYON BEAS-2B 72 SAAT	CI DEĞERI	SEMBOL	Tanımlanan etki
12,5uM BAİ+0,25mM VPA	0,668	+++	Sinerjism
25uM BAİ+0,5mM VPA	0,855	+	Zayıf Sinerjism
50uM BAİ+1mM VPA	1,152	-	Zayıf Antagonism
100uM BAİ+2mM VPA	1,33	--	Orta Derece Antagonism

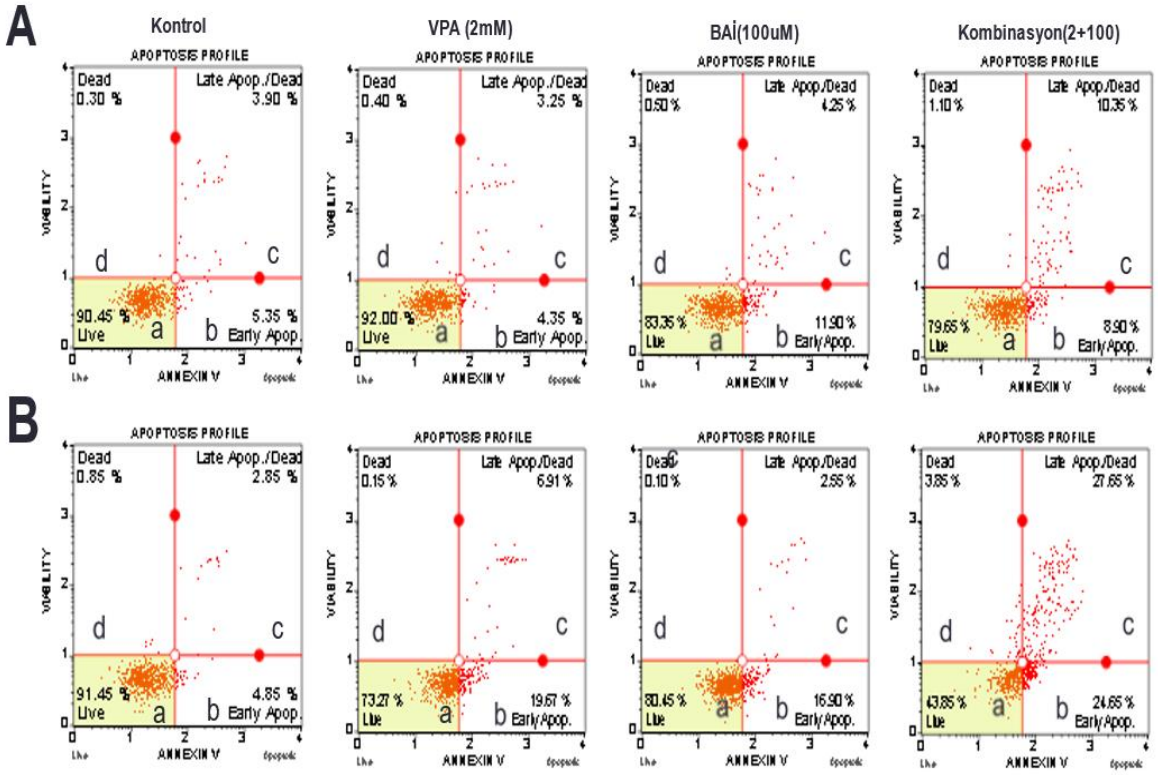
Tablo 3.6: A549 ve BEAS-2B hücrelerinde IC_{50} ve IC_{90} değerleri.

DOZLAR		**IC_{50}**			**IC_{90}**		
AJANLAR		VPA (mM)	BAİ (uM)	KOM (uM+ mM)	VPA (mM)	BAİ (uM)	KOM (uM+ mM)
24	A549	>2	>100	>100+2	>2	>100	>100+2
SAAT	Beas-2B	>2	>100	>100+2	>2	>100	>100+2
48	A549	>2	>100	22,015+0,44	>2	>100	>100+2
SAAT	Beas-2B	>2	>100	85,26+1,7	>2	>100	>100+2
72	A549	1,86	>100	16,44+0,32	>2	>100	>100+2
SAAT	Beas-2B	>2	60,34	42+0,84	>2	>100	>100+2

3.2. Hücre Ölümü Analiz Bulguları

3.2.1. Anneksin V-FITC Testi Bulguları

A549 hücrelerinde, BAİ ve VPA ile kombinasyon uygulamasının (yaklaşık IC_{90} dozu) apoptozis'in erken dönem belirteçlerinden biri olan fosfotidilserin translokasyonu ve buna bağlı gözlenen Anneksin V pozitifliği üzerine etkisi değerlendirildi. Anneksin V -FITC ve 7-AAD negatif olan bölge canlı hücre yüzdesini (a); Anneksin V-FITC pozitif ve 7-AAD negatif olan bölge erken dönem apoptotik hücre yüzdesini (b); Anneksin V -FITC ve 7-AAD pozitif olan bölge geç apoptotik hücre yüzdesini (c); Anneksin V-FITC negatif ve 7-AAD pozitif olan bölge nekrotik hücre yüzdesini (d) temsil eder. A549 hücrelerinde kombinasyon uygulaması sonrası, ajanların tek başına etkisine kıyasla, erken ve geç dönem apoptotik hücre yüzdesinde zamana bağlı (24-48 saat) artış olmuştur **(Şekil 3.12)**.

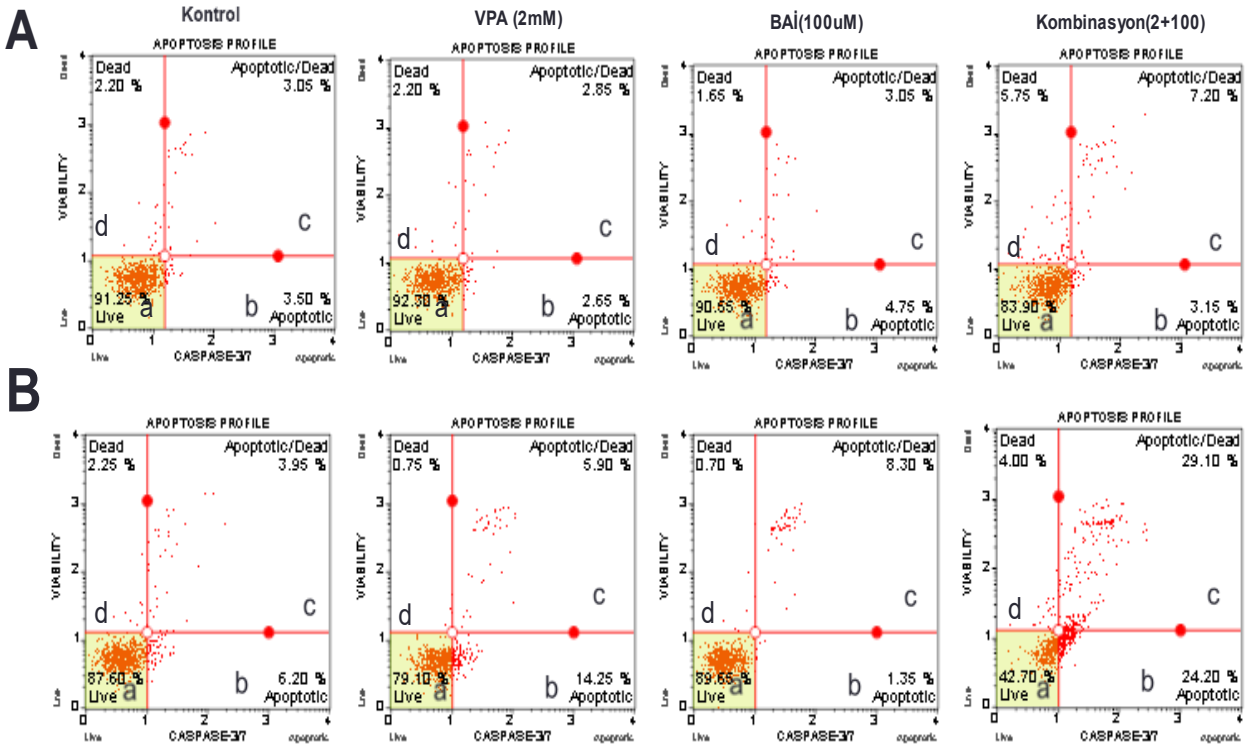


Şekil 3.12: A549 hücrelerinde VPA (2mM), BAİ (100uM) ve kombinasyon uygulaması sonrası Anneksin V pozitifliğinin değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik hücre yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (a: Canlı hücreler; b: Erken apptotik hücreler; c: Geç apoptotik hücreler; d: Nekrotik hücreler).

3.2.2. Kaspaz 3/7 Aktivitesi

Anneksin V deney sonuçları dikkate alınarak, A549 hücrelerinde, BAİ ve VPA ile kombinasyon uygulaması sonrası gözlenen apoptotik hücre ölümünün kaspaz-bağımlı gerçekleşip gerçekleşmediği araştırılmıştır. Bu amaçla, hücrelerde, 24 ve 48 saat kombinasyon uygulaması sonrası ilerletici (efektör) kaspazlar olan kaspaz 3/7 aktivitesi değerlendirilmiştir. Kaspaz 3/7 aktivitesi ve 7-AAD negatif olan bölge canlı hücre yüzdesini (a); Kaspaz 3/7 aktivasyonu yüksek ve 7-AAD negatif olan bölge erken dönem apoptotik hücre yüzdesini (b); Kaspaz 3/7 aktivasyonu yüksek ve 7-AAD pozitif olan bölge geç apoptotik hücre yüzdesini (c); Kaspaz 3/7 aktivasyonu düşük ve 7-AAD pozitif olan bölge nekrotik hücre yüzdesini (d) gösterir **(Şekil 3.13)**. Buna göre, A549 hücrelerinde kombinasyon uygulaması sonrası 48. saatte kaspaz 3/7 aktivitesinde belirgin

bir artış olmuştur. Erken ve geç dönem apoptotik hücre yüzdeleri, sırasıyla, yaklaşık olarak %25 ve 30 olarak belirlenmiştir **(Şekil 3.13B)**.

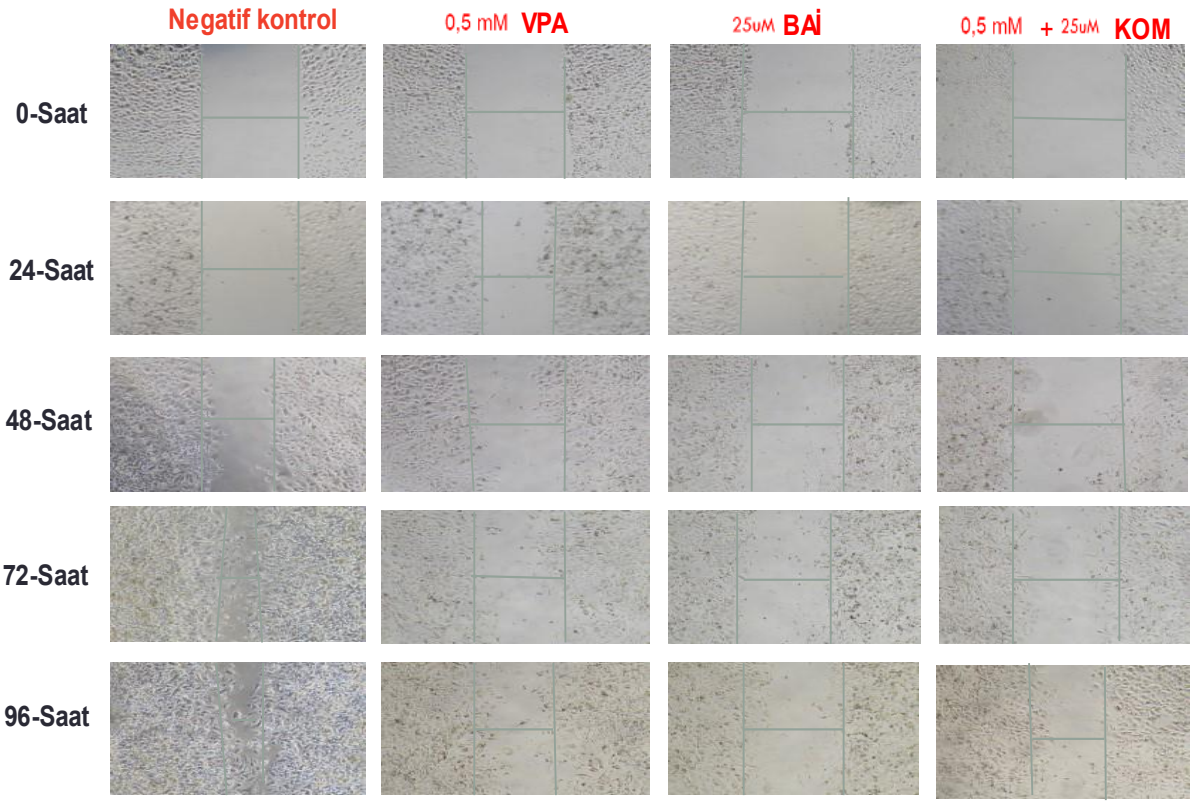


Şekil 3.13: A549 hücrelerinde VPA (2mM), BAİ (100uM) ve kombinasyon uygulaması sonrası Kaspaz 3/7 aktivitesinin değerlendirilmesi ile elde edilen apoptotik hücre yüzde değerlerinin 24 (A) ve 48 (B) saatlik histogramları (a: Canlı hücreler; b: Erken apptotik hücreler; c: Geç apoptotik hücreler; d: Nekrotik hücreler).

3.3. Kombinasyon Uygulamasının Hücrelerin Migrasyon Yeteneği Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Yukarıda detayları açıklanan % büyüme ve doz-yanıt eğrileri ile hücre görüntüleri ve kombinasyon indeks değerleri dikkate alınarak hücre büyümesini yaklaşık %50 oranında baskılayan doz kullanılarak kombinasyon tedavisinin anti-migratif etki sergileyip sergilemediği araştırıldı. Yara modeli oluşturulduktan sonra (0. Zaman), A549 hücreleri BAİ (25uM), VPA (25mM) ve kombinasyon (25uM +0.5mM) grupları ile tedavi edildi ve yara iyileşmesi 24-96 saat boyunca izlenerek fotoğraflandı. Tedavi uygulanmamış hücrelere kıyasla, BAİ ve VPA uygulaması sonrası yara kapanma hızının

düşük olduğu saptandı. Bununla birlikte, ajanların tek başına etkisine kıyasla, kombinasyon uygulaması sonrası yara kapanma hızında belirgin bir değişiklik gözlenmedi **(Şekil 3.14)**.



Şekil 3.14: A549 hücrelerinde VPA (0.5mM), BAİ (25uM) ve kombinasyon uygulaması sonrası yara iyileşme süreci (0-96 saat).

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışması kapsamında, A549 insan akciğer kanseri ve BEAS-2B insan sağlıklı epitel akciğer hücre hatlarında Valproik asit ve Baicalein kombinasyonunun sitotoksik aktivitesi çalışılmıştır. İlgili kombinasyon modelinin etkinliği (sinerjism, aditif ve antagonism) tanımlanmış ve A549 hücrelerinde sağlıklı hücrelere ile kıyasla sinerjistik aktivite sergilediği saptanmıştır. Ayrıca bu hücrelerde kaspaz aktivitesine bağlı olarak apoptotik hücre ölümünü uyardığı gösterilmiştir. Literatürde her iki ajanın anti-kanser etkisi tanımlanmış olmakla beraber birlikte/kombinasyon şeklinde kullanımlarına dair bir bilgi bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu çalışma, ilgili kombinasyon modelinin biyolojik aktivitesine yönelik yapılan ilk çalışmadır.

Akciğer kanseri kanser ile ilişkili ölümlerin başında gelir. Bu kanser için kemoterapi, immüno terapi, ışın terapi, cerrahi ve hedefe yönelik tedavi olmak üzere birçok tedavi yöntemi kullanılmıştır fakat maalesef hala tam bir tedavi seçeneği bulunmamış ve bu sebeple artmaya devam eder. Bu hastalığın moleküler düzeyde araştırılması ve kombinasyon tedavi uygulamak umut vadedebilir (Deng ve ark., 2020). Başta kanser olmak üzere birçok hastalıkta rol oynayan epigenetik modülasyonların için birçok çalışma epigenetik mekanizmasını aydınlatmak adına gerçekleştirilmiştir (Hassanpour ve Dehghani., 2017).

Literatürde VPA bileşiğinin bir HDAC inhibitörü olarak tek başına kullanımının rahim ağzı, teratokarsinoma, melanoma, yumurtalık, fibrosarkoma, glioma, hepatokarsinoma, kolon, prostat, tiroit gibi kanser türlerinin tedavisinde pro-apoptotik özellik sergilediği gösterilmiştir (Duenas-Gonzalez ve ark., 2008). VPA bir anti-epileptik olarak klinikte uzun süredir kullanılmaktadır. VPA gibi HDAC inhibitörlerinin hem mono terapi hem de kombinasyon terapide etkinliği birçok ajan varlığında araştırılmıştır. Bu çalışmalarda, KHDAK'de VPA'nin mono terapide sitotoksisitesi etkileyici düzeyde değildir (Mamdani ve Jalal., 2020). Bununla birlikte kemo duyarlılığı arttırdığını gösteren birçok çalışma mevcuttur (Das ve ark., 2007). Baicalein ise Çin'de yaygın olarak kullanılan doğal bir bileşiktir. KHDAK'de yapılan deneylerde BAİ ile tedavi sonra sağ kalımın artığı gözlemlenmiştir (Cathart ve ark.,2016). Bu bileşik pro-apoptotik, anti-proliferatif ve anti-metastatik etkileri sergilemek ile beraber (Deng ve ark., 2020) hücre döngüsünü yeniden düzenler ve kontrol noktalarını etkiler (Schwartz ve Shah., 2005).

BAİ kombinasyon tedavilerde önemli biyoaktif tavır sergilediği incelenmiştir (Zhang ve ark., 2013) Bu nedenle, çalışmamızda, VPA ve Baicalein kombinasyonu ile sitotoksik aktivitesini arttırmak ve hücre ölümünü uyarmak amaçlanmıştır.

Bu bilgiler doğrultusunda, hücreler öncelikle VPA ve BAİ'nin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakıldı ve % büyüme eğrileri oluşturuldu. Bu şekilde anti-proliferatif, sitostatik veya sitotoksik etkinlik gösteren dozlar belirlendi. Ayrıca, IC_{50} (0.5mM VPA +25uM BAİ) ve IC_{90} (2mM VPA+ 100uM BAİ) dozları belirlendi ve ileri çalışmalar bu dozlar ile devam edildi. Benzer şekilde yapılan çalışmalarda, VPA'nin A549 akciğer kanseri hücre hattında monoterapi kullanımında doza ve zamana bağlı şekilde canlılığı azalttığı gösterilmiş ve IC_{50} değeri >2mM olarak belirlenmiştir (Kalantar ve ark., 2021). BAİ için KHDAK' de yapılan çalışmalarda, 10uM konsantrasyonunun sisplatin ile benzer anti- proliferatif etki gösterdiği saptanmıştır ve doza bağlı olarak canlılığı azalttığı rapor edilmiştir. Bu çalışmalarda, özellikle A549 akciğer kanseri hücre hattı için anti-proliferatif etkisi gösterilmiştir (Cathcart ve ark., 2016). Mevcut tez kapsamında da daha yüksek dozlarda çalışmamıza rağmen anti-proliferatif etki sergilediği gözlenmiştir. BAİ'nin hücre döngüsünü durdurucu bir etki mekanizmasına sahip olduğu bilinmektedir (Schwartz ve Shah., 2005). Dolayısıyla, BAİ'nin bu etkisi anti-proliferatif aktiviteye yol açmış olabilir. Bununla birlikte, VPA ve BAİ birlikte kullanıldığında sinerjistik bir aktivite sergilemiş ve hücre canlılığını anlamlı bir şekilde azaltmıştır. Literatürde bu sonuçlarımızı karşılaştırabileceğimiz bir çalışma bulunmamaktadır.

Kombinasyon uygulaması sonrası, SRB canlılık testiyle belirlediğimiz IC_{90}'a en yakın dozlar çalışmanın devamında hücredeki ölüm mekanizmalarını incelemek için kullanıldı. Bu amaçla, hücrelere 24 ve 48 saat boyunca tedavi uygulandı ve erken dönem apoptotik bir belirteç olarak Annexin V pozitifliği değerlendirildi (Kerr ve ark., 1972). Kombinasyon tedavi uygulanan A549 hücre hattında zamana bağlı olarak erken ve geç dönem apoptotik hücre yüzdesinin arttığı gözlemlendi. Literatürde, BAİ'in Annexin V-FITC analiz sonuçlarında, A549 hücreleri için 160uM dozunda zamana bağlı olarak geç dönem apoptozisi yaklaşık %20 oranında arttırdığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, BAİ'nin tek başına etkisini dikkate aldığımızda literatürle uyumludur. Aynı çalışmada, BAİ'nin kaspaz 3 aktivitesini de zamana bağlı olarak artırdığı belirlenmiştir (Deng ve ark., 2020). VPA'nın A549 hücrelerinde, göreceli olarak yüksek dozlarda (>5mM) kaspaz 3

aktivitesini arttırdığı ve apoptozisi uyardığı rapor edilmiştir **(**Niknamian, 2019; Kalantar ve ark., 2021)**.** Meme kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmalarda da VPA'nın bir HDAC inhibitörü olarak hücrelerde asetilasyonu arttırarak kaspaz-bağımlı apoptozisi uyardığı gösterilmiştir (Aztopal ve ark., 2018). Bu sonuçlar dikkate alınarak, mevcut çalışmamızda her iki ajan için Kaspaz 3/7 aktivitesi de değerlendirildi ve kombinasyon modelinde belirgin şekilde artış olduğu gözlendi. Bu çalışmalar ile karşılaştırıldığında kombinasyon uygulaması ile A549 hücrelerinde etkili bir şekilde apoptozis'in uyarıldığı ve dolayısıyla mevcut apoptozis direncinin üstesinden gelindiği söylenebilir.

Uzak organlara kolonize olmak için birincil tümör hücreleri çok aşamalı bir süreç geçirirler (Paolillo ve ark., 2019). Polarite azalması ve EMT'nin tetiklenmesi kanser hücrelerine hareket ve göç özelliği kazandırır (Hu ve ark.,2020). Karaciğer, uzak lenf nodülleri ve özellikle beyin ve kemik KHDAK'de önde gelen metastatik bölgeler arasındadır (Bertoncello ve ark., 2021). Yara iyileşme metodu (wound healing assay) ile birbiriyle etkileşimde olan ve yüzeye yapışmış hücrelerin hareketliliği tespit edilebilir. VPA'nin >5mM konsantrasyonlarının anti-proliferatif etkisi meme kanseri hücre hatlarında test edilmiştir ve daha düşük konsantrasyonların proliferasyon ve EMT'yi artırdığı ve yara iyileşme hızını kontrole göre artırdığı belirlenmiştir (Zhang ve ark., 2019). Böbrek kanseri hücre hattında yapılan çalışmalar VPA'nın (1mM) metformin ile kombinasyonunun EMT'yi baskıladığı ve yara iyileşme hızını kontrole göre azalttığı gösterilmiştir (Wei ve ark., 2018). VPA'nın rahim ağzı ve böbrek kanseri türlerinde epitelyal markırları artırmadan mezenkimal faktörleri azalttığı ve böylece EMT'yi negatif yönde indüklediği gösterilmiştir. Bu nedenle iyi bir terapotik ajan olarak önerilmektedir (Khanim ve ark., 2008; Omer ve ark., 2013). Araştırmalar, 25uM BAİ konsantrasyonunun mide kanseri hücrelerinde kontrole göre kapanma hızını azalttığını, migrasyon ve invazyonu baskıladığını göstermektedir (Chen ve ark., 2014). Mevcut çalışmada kombinasyon için belirlenen IC_{50} dozu ile gerçekleştirilen analizde, VPA ve BAİ'nin kontrole kıyasla migrasyonu baskıladığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar literatür ile uyumludur. Ancak, tek başlarına etkilerine kıyasla kombinasyonda belirgin bir fark gözlenmemiştir.

5. SONUÇ

Bu *in vitro* çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde, Valproik asit ve Baicalein kombinasyonunun A549 hücrelerinde daha güçlü bir şekilde hücre ölümünü uyardığı bulundu. Bu kombinasyon modelinin farklı kanser hücre hatlarında da denenerek klinik translasyonu için etki alanlarının genişletebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

Adams, J. M. & Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. In *Oncogene* (Vol. 26, Issue 9). doi.org/10.1038/sj.onc.1210220

Alarcon-Vargas, D. & Ronai, Z. (2002). p53-Mdm2-the affair that never ends. *Carcinogenesis*, *23*(4). doi.org/10.1093/carcin/23.4.541

Álvarez-Buylla, E. R., Chaos, Á., Aldana, M., Benítez, M., Cortes-Poza, Y., Espinosa-Soto, C., ve ark. (2008). Floral morphogenesis: Stochastic explorations of a gene network epigenetic landscape. *PLoS ONE*, *3*(11). doi.org/10.1371/journal.pone.0003626

Amini, A.., Kavanagh, B. & Karam, S. D. (2014). Stereotactic body radiation therapy (SBRT) for lung cancer patients previously treated with conventional radiotherapy: A review. In *Radiation Oncology* (Vol. 9, Issue 1). doi.org/10.1186/1748-717X-9-210

Aztopal, N.., Tokullugil, A. H. & Ari, F. (2018). Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis in breast cancer stem cells. *Chemico-Biological Interactions*, *280*.doi.org/10.1016/j.cbi.2017.12.003

Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., ve ark. (2005). Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: A novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(29). doi.org/10.1074/jbc.C500186200

Bartling, B., Hofmann, H. S., Boettger, T., Hansen, G., Burdach, S., Silber, R. E., ve ark. (2005). Comparative application of antibody and gene array for expression profiling in human squamous cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, *49*(2). doi.org/10.1016/j.lungcan.2005.02.006

Baser, S., Shannon, V. R., Eapen, G. A., Jimenez, C. A., Onn, A., Keus, L., ve ark. (2006). Pulmonary dysfunction as a major cause of inoperability among patients with non-small-cell lung cancer. *Clinical Lung Cancer*, *7*(5). doi.org/10.3816/CLC.2006.n.017

Basu, A. & Haldar, S. (1998). The relationship between BcI2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. Mol Hum Reprod. doi: 10.1093/molehr/4.12.1099.

Bean, J., Brennan, C., Shih, J. Y., Riely, G., Viale, A., Wang, L., ve ark. (2007). MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(52). doi.org/10.1073/pnas.0710370104

Behrens, C., Lin, H. Y., Lee, J. J., Raso, M. G., Waun, K. H., Wistuba, I. I., ve ark. (2008). Immunohistochemical expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the pathogenesis of lung cancer. *Clinical Cancer Research*, *14*(19). doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0167

Bertoncello, I. (2016). Properties of adult lung stem and progenitor cells. Journal of Cellular Physiology, 231(12), 2582–2589. doi.org/10.1002/jcp.25404.

Bertoncello, I. (2021). *The lung cancer stem cell niche*. doi.org/10.1016/bs.asn.2020.10.002

Berx, G., van Roy, F. (2009). Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol. doi: 10.1101/cshperspect.a003129.

Bhowmick, NA., Neilson, EG. & Moses, HL. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. Nature. doi: 10.1038/nature03096.

Bie, B., Sun, J., Li, J., Guo, Y., Jiang, W., Huang, C. ve ark. (2017). Baicalein, a natural anti-cancer compound, alters MicroRNA expression profiles in Bel-7402 human hepatocellular carcinoma cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *41*(4). doi.org/10.1159/000470815

Biran, A.., Haklai, R. & Kloog, Y. (2011). Downregulation of survivin and aurora A by histone deacetylase and RAS inhibitors: a new drug combination for cancer therapy. Int J Cancer. doi: 10.1002/ijc.25367.

Blagosklonny, M. v. & Pardee, A. B. (2002). The restriction point of the cell cycle. In *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* (Vol. 1, Issue 2). doi.org/10.4161/cc.1.2.108

Blaheta, R. A. & Cinatl, J. (2002). Anti-tumor mechanisms of valproate: A novel role for an old drug. In *Medicinal Research Reviews* (Vol. 22, Issue 5). doi.org/10.1002/med.10017

Blasco, M. A. (2005). Telomeres and human disease: Ageing, cancer and beyond. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 6, Issue 8). doi.org/10.1038/nrg1656

Blum, R. & Kloog, Y. (2005). Tailoring Ras-pathway - Inhibitor combinations for cancer therapy. *Drug Resistance Updates*, *8*(6). doi.org/10.1016/j.drup.2005.11.002

Boatright, K. M. & Salvesen, G. S. (2003). Mechanisms of caspase activation. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 15, Issue 6).doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.009

Bombí, J. A., Martínez, A., Ramírez, J., Grau, J. J., Nadal, A., Fernández, P. L., ve ark. (2002). Ultrastructural and molecular heterogeneity in non-small cell lung carcinomas: Study of 110 cases and review of the literature. *Ultrastructural Pathology*, *26*(4). doi.org/10.1080/01913120290076892

Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D. R., Steins, M., Ready, N. E., ve ark. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, *373*(17). doi.org/10.1056/nejmoa1507643

Boulares, AH.., Iyer, S. & Smulson, M. (1999). Role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. J Biol Chem. doi: 10.1074/jbc.274.33.22932.

Brambilla, E., Pugatch, B., & Geisinger, K. (2004). World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. WHO Press, Geneva, 45-50.

Breckenridge, D. G.., Nguyen, M. & Shore, G. C. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. In *Oncogene* (Vol. 22, Issue 53 REV. ISS. 7). doi.org/10.1038/sj.onc.1207108

Brodie, S. A. & Brandes, J. C. (2014). Could valproic acid be an effective anticancer agent? The evidence so far. In *Expert Review of Anticancer Therapy* (Vol. 14, Issue 10). doi.org/10.1586/14737140.2014.940329

Budihardjo, I.., Luo, X. & Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 15).doi.org/10.1146/annurev.cellbio.15.1.269

Burlacu, A. (2003). Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. In *Journal of Cellular and Molecular Medicine* (Vol. 7, Issue 3).doi.org/10.1111/j.1582-4934.2003.tb00225.x.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. Nature. (2012). 519-25. doi: 10.1038/nature11404.

Cappuzzo, F., Marchetti, A., Skokan, M., Rossi, E., Gajapathy, S., Felicioni, L., ve ark. (2009). Increased MET gene copy number negatively affects survival of surgically resected non-small-cell lung cancer patients. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(10). doi.org/10.1200/JCO.2008.19.1635

Cathcart, M. C., Useckaite, Z., Drakeford, C., Semik, V., Lysaght, J., Gately, K., ve ark. (2016). Anti-cancer effects of baicalein in non-small cell lung cancer in-vitro and in-vivo. *BMC Cancer*, *16*(1). doi.org/10.1186/s12885-016-2740-0

Cavallaro, U. & Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 4, Issue 2). doi.org/10.1038/nrc1276

Cereghetti, G. M., Stangherlin, A., Martins De Brito, O., Chang, C. R., Blackstone, C., Bernardi, P., ve ark. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(41). doi.org/10.1073/pnas.0808249105

Cersosimo, RJ. Lung cancer: a review. Am J Health Syst Pharm. (2002). 1;59(7):611-42. doi: 10.1093/ajhp/59.7.611.

Chang, W. T., Li, J., Haung, H. H., Liu, H., Han, M., Ramachandran, S., ve ark. (2011). Baicalein protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by attenuation of mitochondrial oxidant injury and JNK activation. *Journal of Cellular Biochemistry*, *112*(10). doi.org/10.1002/jcb.23201

Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials. (1995). Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group. BMJ. 311(7010):899-909.

Chen, F., Zhuang, M., Peng, J., Wang, X., Huang, T., Li, S., ve ark. (2014). Baicalein inhibits migration and invasion of gastric cancer cells through suppression of the TGF-β signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, *10*(4).doi.org/10.3892/mmr.2014.2452

Chen, J. H., Zheng, Y. L., Xu, C. Q., Gu, L. Z., DIng, Z. L., Qin, L., ve ark. (2017). Valproic acid (VPA) enhances cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cells via HDAC2 mediated down regulation of ABCA1. *Biological Chemistry*, *398*(7). doi.org/10.1515/hsz-2016-0307

Chen, M. & Wang, J. (2002). Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. In *Apoptosis* (Vol. 7, Issue 4).doi.org/10.1023/A:1016167228059

Cheng, N.., Joly, A. & Moses HL. (2008). Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. Mol Cancer Res. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2203.

Cheng, Y. H., Li, L. A., Lin, P., Cheng, L. C., Hung, C. H., Chang, N. W., ve ark. (2012). Baicalein induces G1 arrest in oral cancer cells by enhancing the degradation of cyclin D1 and activating AhR to decrease Rb phosphorylation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *263*(3).doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.010

Chi, S., Kitanaka, C., Noguchi, K., Mochizuki, T., Nagashima, Y., Shirouzu, M., ve ark. (1999). Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene*, *18*(13).doi.org/10.1038/sj.onc.1202538

Cigudosa, JC., Parsa, NZ., Louie, DC., Filippa, DA., Jhanwar SC, Johansson B., ve ark. (1999). Cytogenetic analysis of 363 consecutively ascertained diffuse large B-cell lymphomas. Genes Chromosomes Cancer. 25(2):123-33.

Collison, A., Foster, PS. & Mattes, J. (2009). Emerging role of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a key regulator of inflammatory responses. Clin Exp Pharmacol Physiol. doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05258.x.

Colotta, F.., Garlanda, C. & Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. In *Carcinogenesis* (Vol. 30, Issue 7). doi.org/10.1093/carcin/bgp127

Cookson, B. T. & Brennan, M. A. (2001). Pro-inflammatory programmed cell death [2]. In *Trends in Microbiology* (Vol. 9, Issue 3). doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01936-3

cooper Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., Chirieac, L. R., ve ark. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification. In *Journal of Thoracic Oncology* (Vol. 10, Issue 9).doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630

Cooper, WA.., O'Toole, SA. & Minna JD. Molecular biology of lung cancer. J Thorac Dis. 2013 Oct;5 Suppl 5(Suppl 5):S479-90. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.03.

Cukier, P.., Scaranti, M. & Hoff, A. O. (2017). Endocrine side effects of cancer immunotherapy. In *Endocrine-Related Cancer* (Vol. 24, Issue 12). doi.org/10.1530/ERC-17-0358

Cully, M.., Levine, A. J. & Mak, T. W. (2006). Beyond PTEN mutations: The PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 6, Issue 3).doi.org/10.1038/nrc1819

Cumberbatch, M. G. K.., Teare, D. & Catto, J. W. F. (2015). Contemporary Occupational Carcinogen Exposure and Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncology*, *1*(9). doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.3209

Das, C. M., Aguilera, D., Vasquez, H., Prasad, P., Zhang, M., Wolff, J. E., ve ark. (2007). Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (α/β) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines. *Journal of Neuro-Oncology*, *85*(2). doi.org/10.1007/s11060-007-9402-7

Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., ve ark. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, *417*(6892).doi.org/10.1038/nature00766

Degli-Esposti, M. (1999). To die or not to die - The quest of the TRAIL receptors. In *Journal of Leukocyte Biology* (Vol. 65, Issue 5).doi.org/10.1002/jlb.65.5.535

Degterev, A., Boyce, M. & Yuan, J. (2003). A decade of caspases. In *Oncogene* (Vol. 22, Issue 53 REV. ISS. 7).doi.org/10.1038/sj.onc.1207107

DeNardo, D. G., Andreu, P. & Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. In *Cancer and Metastasis Reviews* (Vol. 29, Issue 2).doi.org/10.1007/s10555-010-9223-6

Deng, X.., Huang, J. & Dong, J. (2020). Drp1-mediated mitochondrial fission contributes to baicalein-induced apoptosis and autophagy in lung cancer via activation of AMPK signaling pathway. *International Journal of Biological Sciences*, *16*(8).doi.org/10.7150/ijbs.41768

Deskin, B.., Shan, B. & Lasky, J. A. (2020). Inhibition of HDAC6 Attenuates Tumor Growth of Non-Small Cell Lung Cancer. *Translational Oncology*, *13*(2).doi.org/10.1016/j.tranon.2019.11.001

Diederich, M.., Morceau, F. & Dicato, M. (2010). Molecular and therapeutic potential and toxicity of valproic acid. In *Journal of Biomedicine and Biotechnology* (Vol. 2010). doi.org/10.1155/2010/479364

Dieu-Nosjean, MC., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., ve ark. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. J Clin Oncol. doi: 10.1200/JCO.2007.15.0284.

Ding, L., Getz, G., Wheeler, D. A., Mardis, E. R., McLellan, M. D., Cibulskis, K., ve ark. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, *455*(7216).doi.org/10.1038/nature07423

Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 3, Issue 1).doi.org/10.1038/nrc969

Duenas-Gonzalez, A.., de la Cruz-Hernandez, E. & Herrera, L. A. (2008). Valproic acid as epigenetic cancer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. In *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 34, Issue 3). doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.11.003

Dutt, A., Ramos, A. H., Hammerman, P. S., Mermel, C., Cho, J., Sharifnia, T., ve ark. (2011). Inhibitor-sensitive fgfr1 amplification in human non-small cell lung cancer. *PLoS ONE*, *6*(6). doi.org/10.1371/journal.pone.0020351

Enari, M.., Iwamatsu, A. & Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, *391*(6662). doi.org/10.1038/34112

Engelman, J. A., Zejnullahu, K., Mitsudomi, T., Song, Y., Hyland, C., Joon, O. P., ve ark. (2007). MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science*, *316*(5827). doi.org/10.1126/science.1141478

Fakiris, A. J., McGarry, R. C., Yiannoutsos, C. T., Papiez, L., Williams, M., Henderson, M. A., ve ark. (2009). Stereotactic Body Radiation Therapy for Early-Stage Non-Small-Cell Lung Carcinoma: Four-Year Results of a Prospective Phase II Study. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, *75*(3). doi.org/10.1016/j.ijrobp.2008.11.042

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ve ark. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, *136*(5). doi.org/10.1002/ijc.29210

Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 789-91. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179663.

Fisher, R., Pusztai, L. & Swanton, C. (2013). Cancer heterogeneity: Implications for targeted therapeutics. In *British Journal of Cancer* (Vol. 108, Issue 3). doi.org/10.1038/bjc.2012.581

Fletcher, J. I. & Huang, D. C. S. (2006). BH3-only proteins: Orchestrating cell death. *Cell Death and Differentiation*, *13*(8). doi.org/10.1038/sj.cdd.4401995

Folberg, R., Hendrix, M. J. C. & affiliation>, A. J. M. (2000). Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. In *American Journal of Pathology* (Vol. 156, Issue 2). doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64739-6

Forte, E. & Luftig, M. A. (2009). MDM2-Dependent Inhibition of p53 Is Required for Epstein-Barr Virus B-Cell Growth Transformation and Infected-Cell Survival. *Journal of Virology*, *83*(6). doi.org/10.1128/jvi.01681-08

Fortunati, N., Bertino, S., Costantino, L., Bosco, O., Vercellinatto, I., Catalano, M. G., ve ark. (2008). Valproic acid is a selective antiproliferative agent in estrogen-sensitive breast cancer cells. *Cancer Letters*, *259*(2). doi.org/10.1016/j.canlet.2007.10.006

Friedlander, A. M. (1986). Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. *Journal of Biological Chemistry*, *261*(16). doi.org/10.1016/s0021-9258(17)38364-3

Friedman, J. R. & Nunnari, J. (2014). Mitochondrial form and function. In *Nature* (Vol. 505, Issue 7483). doi.org/10.1038/nature12985

Fritsche, P., Seidler, B., Schüler, S., Schnieke, A., Göttlicher, M., Schmid, R. M., ve ark. (2009). HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA. *Gut*, *58*(10). doi.org/10.1136/gut.2009.180711

Fuchs, Y. & Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. In *Cell* (Vol. 147, Issue 4). doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.033

Fulda, S. & Debatin, K. M. (2003). Death receptor signaling in cancer therapy. In *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents* (Vol. 3, Issue 4). doi.org/10.2174/1568011033482404

Furuya, S.., Miyazawa, K. & Saitoh, M. (2017). Snail suppresses cellular senescence and promotes fibroblast-led cancer cell invasion. *FEBS Open Bio*, *7*(10). doi.org/10.1002/2211-5463.12300

Gershoni, M.., Templeton, A. R. & Mishmar, D. (2009). Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation. *BioEssays*, *31*(6).doi.org/10.1002/bies.200800139

Ghobrial, I. M., Witzig, T. E. & Adjei, A. A. (2005). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *55*(3). doi.org/10.3322/canjclin.55.3.178

Golstein, P. & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 32, Issue 1). doi.org/10.1016/j.tibs.2006.11.001

Gozuacik Kimchi, A. (2007). Autophagy and cell death. Curr Top Dev Biol. doi: 10.1016/S0070-2153(D, 06)78006-1.

Grandemange, S., Herzig, S. & Martinou, J. C. (2009). Mitochondrial dynamics and cancer. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 19, Issue 1). doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.12.001

Grant, C., Rahman, F., Piekarz, R., Peer, C., Frye, R., Robey, R. W., ve ark. (2010). Romidepsin: A new therapy for cutaneous T-cell lymphoma and a potential therapy for solid tumors. In *Expert Review of Anticancer Therapy* (Vol. 10, Issue 7). doi.org/10.1586/era.10.88

Greenburg, G. & Hay, E. D. (1982). Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *Journal of Cell Biology*, *95*(1).doi.org/10.1083/jcb.95.1.333

Gridelli, C., Ardizzoni, A., le Chevalier, T., Manegold, C., Perrone, F., Thatcher, N., ve ark. (2004). Treatment of advanced non-small-cell lung cancer patients with ECOG performance status 2: Results of an European Experts Panel. In *Annals of Oncology* (Vol. 15, Issue 3).doi.org/10.1093/annonc/mdh087

Grutters, J. P. C.., Joore, M. A. & Lambin, P. (2010). Comparison of the effectiveness of radiotherapy with photons, protons and carbon-ions for non-small cell lung cancer: A meta-analysis. In *Radiotherapy and Oncology* (Vol. 95, Issue 1).doi.org/10.1016/j.radonc.2009.08.003

Guicciardi, M. E. & Gores, G. J. (2009). Life and death by death receptors. *The FASEB Journal*, *23*(6).doi.org/10.1096/fj.08-111005

Häcker, G. (2000). The morphology of apoptosis. In *Cell and Tissue Research* (Vol. 301, Issue 1). doi.org/10.1007/s004410000193

Haimovitz-Friedman, A., Kan, C. C., Ehleiter, D., Persaud, R. S., Mc loughlin, M., Fuks, Z., ve ark. (1994). Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *Journal of Experimental Medicine*, *180*(2). doi.org/10.1084/jem.180.2.525

Hammerman, P. S., Sos, M. L., Ramos, A. H., Xu, C., Dutt, A., Zhou, W., ve ark. (2011). Mutations in the DDR2 kinase gene identify a novel therapeutic target in squamous cell lung cancer. *Cancer Discovery*, *1*(1). doi.org/10.1158/2159-8274.CD-11-0005

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5). doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Harbour, JW.., Minna, JD. & Kaye, FJ. (1988). Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. Science. 15;241(4863):353-7. doi: 10.1126/science.2838909.

Hassanpour, S. H. & Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. Journal of Cancer Research and Practice, 4(4), 127-129

Hay, E. D. & Zuk, A. (1995). Transformations between epithelium and mesenchyme: Normal, pathological, and experimentally induced. *American Journal of Kidney Diseases*, *26*(4).doi.org/10.1016/0272-6386(95)90610-X

Hengartner, M. O. (2001). Apoptosis: Corralling the corpses. In *Cell* (Vol. 104, Issue 3). doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00219-7

Herscher, L. L.., Russo, A. & Mitchell, J. B. (1999). Principles of chemoradiation: Theoretical and practical considerations. *ONCOLOGY*, *13*(10 SUPPL. 5).

Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, Semba K, Inoue A, Inoue S., ve ark. (2012). TGF-β drives epithelial-mesenchymal transition through δEF1-mediated downregulation of ESRP. Oncogene. 28;31(26):3190-201. doi: 10.1038/onc.2011.493.

Howington, JA.., Balekian, AA. & Murthy, SC. (2013). Treatment of stage I and II non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. Chest. doi: 10.1378/chest.12-2359.

Hu, C.., Stathopoulos, G. T. & Chen, J. (2020). Role of exosomal.e12828. doi.org/10.1111/cpr.12828.

Hunot, S. (2001). APOPTOSIS: Death of a Monopoly? *Science*, *292*(5518). doi.org/10.1126/science.1060885

Hynes, NE. & MacDonald G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. Curr Opin Cell Biol. doi: 10.1016/j.ceb.2008.12.010.

Ikeda, K., Wang, L. H., Torres, R., Zhao, H., Olaso, E., Eng, F. J., ve ark. (2002). Discoidin domain receptor 2 interacts with Src and Shc following its activation by type I collagen. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(21). doi.org/10.1074/jbc.M201078200

Imre, G.., Beckers, T. & Boehm, M. (2006). Histone deacetylase inhibitors suppress the inducibility of nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor-alpha receptor-1 down-regulation. Cancer Res. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4225.

Ince, T. A., Richardson, A. L., Bell, G. W., Saitoh, M., Godar, S., Karnoub, A. E., ve ark. (2007). Transformation of Different Human Breast Epithelial Cell Types Leads to Distinct Tumor Phenotypes. *Cancer Cell*, *12*(2). doi.org/10.1016/j.ccr.2007.06.013

Iurlaro, R. & Muñoz-Pinedo, C. (2016). Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. In *FEBS Journal*. doi.org/10.1111/febs.13598

Jänicke, RU.., Sprengart, ML. & Porter, AG. (1998). Caspase-3 is required for alpha-fodrin cleavage but dispensable for cleavage of other death substrates in apoptosis. J Biol Chem. doi: 10.1074/jbc.273.25.15540.

Ji, H., Li, D., Chen, L., Shimamura, T., Kobayashi, S., McNamara, K., ve ark. (2006). The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer Cell*, *9*(6). doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.022

Ji, M. M., Wang, L., Zhan, Q., Xue, W., Zhao, Y., Zhao, X., ve ark. (2015). Induction of autophagy by valproic acid enhanced lymphoma cell chemosensitivity through HDAC-independent and IP3-mediated PRKAA activation. *Autophagy*, *11*(12). doi.org/10.1080/15548627.2015.1082024

Jiang, M.., Li, L. & Li, Y. (2020). The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. Cell Death Discov. doi: 10.1038/s41420-020-00349-0.

Jie, X. X., Zhang, X. Y. & Xu, C. J. (2017). Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 46). doi.org/10.18632/oncotarget.18277

Kalantar H.., Tavallaei M. & Hosseini SM. (2021). Anticancer Effects of Valproic Acid via Regulation of Epigenetic Mechanisms in Non-small-cell Lung Cancer A549 Cell Line. Iran J Pharm Res. Doi:10.22037/ijpr.2019.111945.13442.

Kalluri, R. (2009). EMT: When epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 119, Issue 6).doi.org/10.1172/JCI39675

Kalluri, R. & Weinberg, R. A. (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 119, Issue 6).doi.org/10.1172/JCI39104

Kanda, Y., Chiba, S., Tanaka, Y., Kami, M., Saito, T., Izutsu, K., ve ark. (1999). Increased serum soluble Fas ligand associated with recurrent B-cell non-Hodgkin's lymphoma after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Leukemia and Lymphoma*, *34*(5–6).doi.org/10.3109/10428199909058494

Kannan, K. & Jain, S. K. (2000). Oxidative stress and apoptosis. In *Pathophysiology* (Vol. 7, Issue 3). doi.org/10.1016/S0928-4680(00)00053-5

Karaboz, İ., Kayar, E. & Akar, S. (2008). Flow Sitometri ve Kullanım Alanları.

Karnoub, A. E. & Weinberg, R. A. (2008). Ras oncogenes: Split personalities. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 9, Issue 7). doi.org/10.1038/nrm2438

Kazandjian, D., Suzman, D. L., Blumenthal, G., Mushti, S., He, K., Libeg, M., ve ark. (2016). FDA Approval Summary: Nivolumab for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer With Progression On or After Platinum-Based Chemotherapy. *The Oncologist*, *21*(5).doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0507

Kelly, K., Crowley, J., Bunn, J., Presant, C. A., Grevstad, P. K., Moinpour, C. M., ve ark. (2001). Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: A Southwest Oncology Group trial. *Journal of Clinical Oncology*, *19*(13). doi.org/10.1200/JCO.2001.19.13.3210

Kenfield, S. A.., Rosner, B. A. & Colditz, G. A. (2008). Comparison of aspects of smoking among the four histological types of lung cancer. *Tobacco Control*, *17*(3). doi.org/10.1136/tc.2007.022582

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).doi.org/10.1038/bjc.1972.33

Khalili, M. & Radosevich, J. A. (2018). Pyronecrosis. In *Apoptosis and Beyond: The Many Ways Cells Die*.doi.org/10.1002/9781119432463.ch12

Khanim FL, Bradbury CA, Arrazi J, Hayden RE, Rye A, Basu S., ve ark. (2009). Elevated FOSB-expression; a potential marker of valproate sensitivity in AML. Br J Haematol.doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07449.x.

Kheloufi, M.., Codogno, P. & Rautou, P. E. (2015). Autosis occurs in the liver of patients with severe anorexia nervosa. In *Hepatology* (Vol. 62, Issue 2). doi.org/10.1002/hep.27597

Kim, H. R., Kim, E. J., Yang, S. H., Jeong, E. T., Park, C., Lee, J. H., ve ark. (2006). Trichostatin A induces apoptosis in lung cancer cells via simultaneous activation of the death receptor-mediated and mitochondrial pathway. *Experimental and Molecular Medicine*, *38*(6).doi.org/10.1038/emm.2006.73

Kischkel, F. C.., Kim, K. J. & Ashkenazi, A. (2000). Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, *12*(6).doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80212-5

Kiweler, N., Wünsch, D., Wirth, M., Mahendrarajah, N., Schneider, G., Stauber, R. H., ve ark. (2020). Histone deacetylase inhibitors dysregulate DNA repair proteins and antagonize metastasis-associated processes. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *146*(2). doi.org/10.1007/s00432-019-03118-4

Kloog, Y., Blum, R. & Cox, A. (2008). Inhibitors of Chronically Active Ras: Potential for Treatment of Human Malignancies. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, *3*(1). doi.org/10.2174/157489208783478702

Kluck, R. M.., Green, D. R. & Newmeyer, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for Bcl- 2 regulation of apoptosis. *Science*, *275*(5303).doi.org/10.1126/science.275.5303.1132

Knudson, A. G. (1978). Retinoblastoma: A prototypic hereditary neoplasm. *Seminars in Oncology*, *5*(1).doi.org/10.5555/uri:pii:0093775478900209

Koivunen, J. P., Mermel, C., Zejnullahu, K., Murphy, C., Lifshits, E., Holmes, A. J., ve ark. (2008). EML4-ALK fusion gene and efficacy of an ALK kinase inhibitor in lung cancer. *Clinical Cancer Research*, *14*(13).doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0168

Kosaka, T.., Takahashi, T. & Mitsudomi, T. (2004). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: Biological and clinical implications. *Cancer Research*, *64*(24). doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2818

Krapcho M.., & H. N. N. A. (2016). SEER Cancer Statistics Review 1975-2013 National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975-2013 National Cancer Institute. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, Seer.Cancer.Gov/Csr/1975_2013/, Based on November 2015 SEER Data Submission, Posted to the SEER Web Site, April 2016.*

Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., ve ark. (2005). Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death and Differentiation*, *12*.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401724

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., ve ark. (2009). Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 16, Issue 1). doi.org/10.1038/cdd.2008.150

Kroschinsky, F., Stölzel, F., von Bonin, S., Beutel, G., Kochanek, M., Kiehl, M., ve ark. (2017). New drugs, new toxicities: Severe side effects of modern targeted and

immunotherapy of cancer and their management. In *Critical Care* (Vol. 21, Issue 1). doi.org/10.1186/s13054-017-1678-1

LaCasse, E. C.., Korneluk, R. G. & MacKenzie, A. E. (1998). The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene*, *17*(25). doi.org/10.1038/sj.onc.1202569

Lan, B.., Furutani, Y. & Nakanishi, T. (2015). Therapeutic efficacy of valproic acid in a combined monocrotaline and chronic hypoxia rat model of severe pulmonary hypertension. *PLoS ONE*, *10*(1). doi.org/10.1371/journal.pone.0117211

Larsen, J. E. & Minna, J. D. (2011). Molecular Biology of Lung Cancer: Clinical Implications. In *Clinics in Chest Medicine* (Vol. 32, Issue 4). doi.org/10.1016/j.ccm.2011.08.003

Leber, B., Lin, J. & Andrews, D. W. (2010). Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. In *Oncogene* (Vol. 29, Issue 38). doi.org/10.1038/onc.2010.283

Lechner, M. S. & Laimins, L. A. (1994). Inhibition of p53 DNA binding by human papillomavirus E6 proteins. *Journal of Virology*, *68*(7).doi.org/10.1128/jvi.68.7.4262-4273.1994

Lemmon, M. A. & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. In *Cell* (Vol. 141, Issue 7).doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011

Leng, S., Stidley, C. A., Liu, Y., Edlund, C. K., Willink, R. P., Han, Y., ve ark. (2012). Genetic determinants for promoter hypermethylation in the lungs of smokers: A candidate gene-based study. *Cancer Research*, *72*(3).doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3194

Li P.., Alnemri ES. & Wang X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80434-1.

Li Q, Chen L, Dong Z, Zhao Y, Deng H, Wu J., ve ark. (2019). Piperlongumine analogue L50377 induces pyroptosis via ROS mediated NF-κB suppression in non-small-cell lung cancer. Chem Biol Interact. doi: 10.1016/j.cbi.2019.108820.

Li, C. Te.., Yeh, K. T. & Ko, J. L. (2011). Vorinostat, SAHA, represses telomerase activity via epigenetic regulation of telomerase reverse transcriptase in non-small cell lung cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, *112*(10). doi.org/10.1002/jcb.23229

Li, J. & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. In *Oncogene* (Vol. 27, Issue 48). doi.org/10.1038/onc.2008.297

Lieberman, J. (2010). Granzyme A activates another way to die. In *Immunological Reviews* (Vol. 235, Issue 1).doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00902.x

Lintz, M., Muñoz, A. & Reinhart-King, C. A. (2017). The Mechanics of Single Cell and Collective Migration of Tumor Cells. In *Journal of Biomechanical Engineering* (Vol. 139, Issue 2). doi.org/10.1115/1.4035121

Lipinski, M. M. & Jacks, T. (1999). The retinoblastoma gene family in differentiation and development. In *Oncogene* (Vol. 18, Issue 55). doi.org/10.1038/sj.onc.1203244

Liu, J. J.., Cheng, W. F. & Lu, F. J. (2003). Baicalein and baicalin are potent inhibitors of angiogenesis: Inhibition of endothelial cell proliferation, migration and differentiation. *International Journal of Cancer*, *106*(4).doi.org/10.1002/ijc.11267

Liu, T., Liu, W., Zhang, M., Yu, W., Gao, F., Li, C., ve ark. (2018). Ferrous-Supply-Regeneration Nanoengineering for Cancer-Cell-Specific Ferroptosis in Combination with Imaging-Guided Photodynamic Therapy. *ACS Nano*, *12*(12). doi.org/10.1021/acsnano.8b05860

Liu, Y., Shoji-Kawata, S., Sumpter, R. M., Wei, Y., Ginet, V., Zhang, L., ve ark. (2013). Autosis is a Na+,K+-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(51).doi.org/10.1073/pnas.1319661110

Lowe, SW.., Cepero, E. & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. Nature. doi: 10.1038/nature03098.

Lu, H., Zhang, S., Wu, J., Chen, M., Cai, M. C., Fu, Y., ve ark. (2018). Molecular targeted therapies elicit concurrent apoptotic and GSDME-dependent pyroptotic tumor cell death. *Clinical Cancer Research*, *24*(23). doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1478

Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., ve ark. (2004). Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non–Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine*, *350*(21).doi.org/10.1056/nejmoa040938

Magnoni, C., Euclidi, E., Benassi, L., Bertazzoni, G., Cossarizza, A., Seidenari, S., ve ark. (2002). Ultraviolet B radiation induces activation of neutral and acidic sphingomyelinases and ceramide generation in cultured normal human keratinocytes. *Toxicology in Vitro*, *16*(4).doi.org/10.1016/S0887-2333(02)00024-3

Maltese, W. A. & Overmeyer, J. H. (2014). Methuosis: Nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments. In *American Journal of Pathology* (Vol. 184, Issue 6).doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.02.028

Mamdani, H. & Jalal, S. I. (2020). Histone Deacetylase Inhibition in Non-small Cell Lung Cancer: Hype or Hope? In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). doi.org/10.3389/fcell.2020.582370

Man, S. M., Karki, R. & Kanneganti, T. D. (2017). Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. In *Immunological Reviews* (Vol. 277, Issue 1).doi.org/10.1111/imr.12534

Marsit, C. J., Zheng, S., Aldape, K., Hinds, P. W., Nelson, H. H., Wiencke, J. K., ve ark. (2005). PTEN expression in non-small-cell lung cancer: Evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Human Pathology*, *36*(7). doi.org/10.1016/j.humpath.2005.05.006

Martin, DA.., Zheng L. & Lenardo MJ. (1998). Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. J Biol Chem. doi: 10.1074/jbc.273.8.4345.

Martinotti S.., Majtan J. & Ranzato, E. (2018) Honey: an effective regenerative medicine product in wound management. Curr Med Chem. doi.org/10.2174/0929867325666180510141824

Martinotti, S. & Ranzato, E. (2020). Scratch Wound Healing Assay. Methods Mol Biol.doi: 10.1007/7651_2019_259.

Martinou, J. C. & Youle, R. J. (2006). Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death and Differentiation*, *13*(8). doi.org/10.1038/sj.cdd.4401985

Martinvalet, D. (2015). ROS signaling during granzyme B-mediated apoptosis. *Molecular and Cellular Oncology*, *2*(3). doi.org/10.4161/23723556.2014.992639

McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W. T., Chang, F., ve ark. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1773, Issue 8). doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.10.001

Meacham, C. E. & Morrison, S. J. (2013). Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. In *Nature* (Vol. 501, Issue 7467). doi.org/10.1038/nature12624

Michaelis, M., Doerr, H. & Cinatl Jr., J. (2007). Valproic Acid As Anti-Cancer Drug. *Current Pharmaceutical Design*, *13*(33).doi.org/10.2174/138161207782360528

Minamiya, Y., Ono, T., Saito, H., Takahashi, N., Ito, M., Mitsui, M., ve ark. (2011). Expression of histone deacetylase 1 correlates with a poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer*, *74*(2). doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.02.019

Minamiya, Y., Ono, T., Saito, H., Takahashi, N., Ito, M., Motoyama, S., ve ark. (2010). Strong expression of HDAC3 correlates with a poor prognosis in patients with adenocarcinoma of the lung. *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *31*(5).doi.org/10.1007/s13277-010-0066-0

Mishra, A. P., Salehi, B., Sharifi-Rad, M., Pezzani, R., Kobarfard, F., Sharifi-Rad, J., ve ark. (2018). Programmed Cell Death, from a Cancer Perspective: An Overview. In *Molecular Diagnosis and Therapy* (Vol. 22, Issue 3).doi.org/10.1007/s40291-018-0329-9

Miyanaga, A., Gemma, A., Noro, R., Kataoka, K., Matsuda, K., Nara, M., ve ark. (2008). Antitumor activity of histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer cells: Development of a molecular predictive model. *Molecular Cancer Therapeutics*, *7*(7). doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-2140

Montague, J. W. & Cidlowski, J. A. (1996). Cellular catabolism in apoptosis: DNA degradation and endonuclease activation. In *Experientia* (Vol. 52, Issues 10–11). doi.org/10.1007/BF01920104

Morotti, A., Cilioni, D., Messa, F., Arruga, F., Defilippi, I., Carturan, S., ve ark. (2006). Valproate enhances imatinib-induced growth arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Cancer*, *106*(5). doi.org/10.1002/cncr.21725

Mosesson, Y., Mills GB. & Yarden Y. (2008). Derailed endocytosis: an emerging feature of cancer. Nat Rev Cancer. doi: 10.1038/nrc2521.

Mottet, D. & Castronovo, V. (2008). Histone deacetylases: Target enzymes for cancer therapy. In *Clinical and Experimental Metastasis* (Vol. 25, Issue 2).doi.org/10.1007/s10585-007-9131-5

Mougiakakos, D.., Kiessling R. & Johansson CC. (2010). Regulatory T cells in cancer. Adv Cancer Res. doi: 10.1016/S0065-230X(10)07003-X.

Moulin, M.., Levade, T. & Arrigo, A. P. (2007). Potential roles of membrane fluidity and ceramide in hyperthermia and alcohol stimulation of TRAIL apoptosis. *Apoptosis*, *12*(9).doi.org/10.1007/s10495-007-0096-2

Nathan, C. & Ding, A. (2010). Nonresolving Inflammation. In *Cell* (Vol. 140, Issue 6). doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.029

Negrini, S., Gorgoulis, V. G. & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability an evolving hallmark of cancer. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 11, Issue 3). doi.org/10.1038/nrm2858

Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 6, Issue 11). doi.org/10.1038/sj.cdd.4400598

Nicotera, P. & Melino, G. (2004). Regulation of the apoptosis-necrosis switch. In *Oncogene* (Vol. 23, Issue 16 REV. ISS. 2).doi.org/10.1038/sj.onc.1207559

Nieto, M. A. (2017). Context-specific roles of EMT programmes in cancer cell dissemination. In *Nature Cell Biology* (Vol. 19, Issue 5). doi.org/10.1038/ncb3520

Nieto, M. A.., Jackson, R. A. A. & Thiery, J. P. P. (2016). EMT: 2016. In *Cell* (Vol. 166, Issue 1).doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.028

Niknamian, S. (2019). Valproic acid inhibit non-small-cell lung cancer (A549 cell line) metastasnis via inhibition of CD44v6 and Nm23H1. *OSF Preprints. December*, *31*

Nirmala, J. G. & Lopus, M. (2020). Cell death mechanisms in eukaryotes. In *Cell Biology and Toxicology* (Vol. 36, Issue 2).doi.org/10.1007/s10565-019-09496-2

Nunnari, J. & Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: In sickness and in health. In *Cell* (Vol. 148, Issue 6).doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.035

Office of the Surgeon General (US); Office on Smoking and Health (US). (2004). The Health Consequences of Smoking: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US).

Ohta, Y., Shimizu, Y., Kobayashi, T., Matsui, O., Minato, H., Matsumoto, I., ve ark. (2006). Pathologic and biological assessment of lung tumors showing ground-glass opacity. *Annals of Thoracic Surgery*, *81*(4). doi.org/10.1016/j.athoracsur.2005.10.037

Oiso, S., Takayama, Y., Nakazaki, R., Matsunaga, N., Motooka, C., Yamamura, A., ve ark. (2014). Factors involved in the cisplatin resistance of KCP-4 human epidermoid carcinoma cells. *Oncology Reports*, *31*(2). doi.org/10.3892/or.2013.2896

Okinaga, T.., Tsujisawa, T. & Nishihara, T. (2007). Role of caspases in cleavage of lamin A/C and PARP during apoptosis in macrophages infected with a periodontopathic bacterium. *Journal of Medical Microbiology*, *56*(10). doi.org/10.1099/jmm.0.47193-0

Ola, M. S., Nawaz, M. & Ahsan, H. (2011). Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis. In *Molecular and Cellular Biochemistry* (Vol. 351, Issues 1–2). doi.org/10.1007/s11010-010-0709-x

Olive, K. P., Jacobetz, M. A., Davidson, C. J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., ve ark. (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science*, *324*(5933).doi.org/10.1126/science.1171362

Omer, D., Harari-Steinberg, O., Buzhor, E., Metsuyanim, S., Pleniceanu, O., Zundelevich, A., ve ark. (2013). Chromatin-modifying agents reactivate embryonic renal stem/progenitor genes in human adult kidney epithelial cells but abrogate dedifferentiation and stemness. Cell Reprogram. doi: 10.1089/cell.2012.0087.

Osada, H.., Mitsudomi, T. & Takahashi, T. (2004). Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients. *International Journal of Cancer*, *112*(1).doi.org/10.1002/ijc.20395

Oslowski, C. M. & Urano, F. (2011). Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. In *Methods in Enzymology* (Vol. 490, Issue C).doi.org/10.1016/B978-0-12-385114-7.00004-0

Ostrand-Rosenberg, S. & Sinha, P. (2009). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *The Journal of Immunology*, *182*(8). doi.org/10.4049/jimmunol.0802740

Overholtzer, M., Mailleux, A. A., Mouneimne, G., Normand, G., Schnitt, S. J., King, R. W., ve ark. (2007). A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion. *Cell*, *131*(5).doi.org/10.1016/j.cell.2007.10.040

Paez, JG., Jänne, PA., Lee, JC., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., ve ark. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science. doi: 10.1126/science.1099314.

Pan, G.., Ebner, R., Ni, J. & Dixit, V. M. (1997). The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science*, *276*(5309).doi.org/10.1126/science.276.5309.111

Paoli, P., Giannoni, E. & Chiarugi, P. (2013). Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1833, Issue 12).doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.026

Paolillo, M. & Schinelli, S. (2019). Extracellular matrix alterations in metastatic processes. International Journal of Molecular Sciences, 20(19). doi.org/10.3390/ijms20194947.

Papadimitrakopoulou, V. (2012). Development of PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors and their application in personalized therapy for non-small-cell lung cancer. J Thorac Oncol. doi: 10.1097/JTO.0b013e31825493eb.

Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 12, Issue 4).doi.org/10.1038/nrc3239

Pettus, B. J., Chalfant, C. E. & Hannun, Y. A. (2002). Ceramide in apoptosis: An overview and current perspectives. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (Vol. 1585, Issues 2–3).doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00331-1

Pisters, K. M. W., Evans, W. K., Azzoli, C. G., Kris, M. G., Smith, C. A., Desch, C. E., ve ark. (2007). Cancer Care Ontario and American Society of clinical oncology adjuvant chemotherapy and adjuvant radiation therapy for stages I-IIIA resectable non-small-cell lung cancer guideline. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(34). doi.org/10.1200/JCO.2007.14.1226

Pistritto, G.., Garufi, A. & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. Aging (Albany NY). doi: 10.18632/aging.100934.

Polak, M. E.., Jager, M. J. & Cree, I. A. (2009). Melanoma vaccines: The problems of local immunosuppression. *Human Immunology*, *70*(5). doi.org/10.1016/j.humimm.2009.01.017

Poon, S. L.., Teh, B. T. & Rozen, S. G. (2014). Mutation signatures of carcinogen exposure: Genome-wide detection and new opportunities for cancer prevention. In *Genome Medicine* (Vol. 6, Issue 3).doi.org/10.1186/gm541

Portela, A. & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. In *Nature Biotechnology* (Vol. 28, Issue 10).doi.org/10.1038/nbt.1685

Prenzel, N.., Hart, S. & Ullrich, A. (2001). The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification. *Endocrine-Related Cancer*, *8*(1).doi.org/10.1677/erc.0.0080011

Ranzato E, Martinotti S, Burlando B (2011)Wound healing properties of jojoba liquid wax: an in vitro study. J Ethnopharmacol 1342):443–449 doi.org/10.1016/j.jep.010.12.042

Raso, M. G., & Wistuba, I. I. (2007). Molecular pathogenesis of early-stage non-small cell lung cancer and a proposal for tissue banking to facilitate identification of new

biomarkers. *Journal of Thoracic Oncology*, *2*(7 SUPPL.3).doi.org/10.1097/JTO.0b013e318074fe42

Reid, T., Valone, F., Lipera, W., Irwin, D., Paroly, W., Natale, R., ve ark. (2004). Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pivaloyloxymethyl butyrate (Pivanex, AN-9) in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, *45*(3).doi.org/10.1016/j.lungcan.2004.03.002

Rekhtman, N., Paik, P. K., Arcila, M. E., Tafe, L. J., Oxnard, G. R., Moreira, A. L., ve ark. (2012). Clarifying the spectrum of driver oncogene mutations in biomarker-verified squamous carcinoma of lung: Lack of EGFR/KRAS and presence of PIK3CA/AKT1 mutations. *Clinical Cancer Research*, *18*(4). doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2109

Riely, G. J., Marks, J. & Pao, W. (2009). KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *6*(2). doi.org/10.1513/pats.200809-107LC

Ryan, Q. C., Headlee, D., Acharya, M., Sparreboom, A., Trepel, J. B., Ye, J., ve ark. (2005). Phase I and pharmacokinetic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in patients with advanced and refractory solid tumors or lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(17).doi.org/10.1200/JCO.2005.02.188

Sadiq, A. A. & Salgia, R. (2013). MET As a possible target for non-small-cell lung cancer. In *Journal of Clinical Oncology* (Vol. 31, Issue 8).doi.org/10.1200/JCO.2012.43.9422

Saengsoi, W., Shia, W. Y., Shyu, C. L., Wu, J. te, Warinrak, C., Lee, W. M., ve ark. (2011). Detection of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in canine seminal plasma. *Animal Reproduction Science*, *127*(1–2).doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.07.004

Saitoh, M. (2015). Epithelial–mesenchymal transition is regulated at post-transcriptional levels by transforming growth factor-β signaling during tumor progression. Cancer science, 106(5), 481-488.

Saitoh, M. (2018). Involvement of partial EMT in cancer progression. *The Journal of Biochemistry*, *164*(4). doi.org/10.1093/jb/mvy047

Salk, J. J., Fox, E. J. & Loeb, L. A. (2010). Mutational Heterogeneity in Human Cancers: Origin and Consequences. In *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* (Vol. 5). doi.org/10.1146/annurev-pathol-121808-102113

Samet, J. M. (2005). Smoking kills: Experimental proof from the lung health study. In *Annals of Internal Medicine* (Vol. 142, Issue 4). doi.org/10.7326/0003-4819-142-4-200502150-00012

Sano, R. & Reed, J. C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1833, Issue 12). doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028

Santini, V., Gozzini, A. & Ferrari, G. (2007). Histone Deacetylase Inhibitors: Molecular and Biological Activity as a Premise to Clinical Application. *Current Drug Metabolism, 8*(4).doi.org/10.2174/138920007780655397

Saraste, A. & Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. In *Cardiovascular Research* (Vol. 45, Issue 3).doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00384-3

Sause, W. T., Scott, C., Taylor, S., Johnson, D., Livingston, R., Komaki, R., ve ark. (1995). Radiation therapy oncology group (RTOG) 88-08 and eastern cooperative oncology group (ECOG) 4588: Preliminary results of a phase III trial in regionally advanced, unresectable non-small-cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute, 87*(3). doi.org/10.1093/jnci/87.3.198

Sawas, A., O'connor, O. A. & Radeski, D. (2015). Belinostat in patients with refractory or relapsed peripheral T-cell lymphoma: A perspective review. In *Therapeutic Advances in Hematology* (Vol. 6, Issue 4).doi.org/10.1177/2040620715592567

Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature, 418*(6894). doi.org/10.1038/nature00858

Scagliotti, G. v., de Marinis, F., Rinaldi, M., Crinò, L., Gridelli, C., Ricci, S., ve ark. (2002). Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology, 20*(21).doi.org/10.1200/JCO.2002.02.068

Scagliotti, G. v.., Novello, S. & Hirsch, F. R. (2004). The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Clinical Cancer Research*, *10*(12 II). doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-040007

Scheel, C. & Weinberg, R. A. (2012). Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Concepts and molecular links. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 22, Issues 5–6). doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.04.001

Schrump, D. S., Fischette, M. R., Nguyen, D. M., Zhao, M., Li, X., Kunst, T. F., Hancox, A., ve ark. (2008). Clinical and molecular responses in lung cancer patients receiving Romidepsin. *Clinical Cancer Research*, *14*(1). doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0135

Schwartz, G. K. & Shah, M. A. (2005). Targeting the cell cycle: A new approach to cancer therapy. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(36). doi.org/10.1200/JCO.2005.01.5594

Scott, W. J.., Feigenberg, S., Movsas, B. & Pisters, K. (2007). Treatment of non-small cell lung cancer stage I and stage II: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*, *132*(3 SUPPL.). doi.org/10.1378/chest.07-1378

Sequist, L. v., Heist, R. S., Shaw, A. T., Fidias, P., Rosovsky, R., Temel, J. S., ve ark. (2011). Implementing multiplexed genotyping of non-small-cell lung cancers into routine clinical practice. *Annals of Oncology*, *22*(12). doi.org/10.1093/annonc/mdr489

Seto, M., Honma, K. & Nakagawa, M. (2010). Diversity of genome profiles in malignant lymphoma. *Cancer Science*, *101*(3). doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01452.x

Shankar, S. & Srivastava, R. K. (2008). Histone deacetylase inhibitors: Mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 615). doi.org/10.1007/978-1-4020-6554-5_13

Shaw, A. T. & Solomon, B. (2011). Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer. *Clinical Cancer Research*, *17*(8). doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1591

Shaw, A. T., Yeap, B. Y., Mino-Kenudson, M., Digumarthy, S. R., Costa, D. B., Heist, R. S., ve ark. (2009). Clinical features and outcome of patients with non-small-cell

lung cancer who harbor EML4-ALK. *Journal of Clinical Oncology*, *27*(26). doi.org/10.1200/JCO.2009.22.6993

Shigematsu, H., Takahashi, T., Nomura, M., Majmudar, K., Suzuki, M., Lee, H., ve ark. (2005). Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas. *Cancer Research*, *65*(5). doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4235

Shtivelman, E.., Gale, R. P. & Canaani, E. (1985). used transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*, *315*(6020). doi.org/10.1038/315550a0

Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *66*(1).doi.org/10.3322/caac.21332

Siegel, R., Naishadham, D. & Jemal, A. (2013). Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *63*(1).doi.org/10.3322/caac.21166

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., ve ark. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J Natl Cancer Inst. doi: 10.1093/jnci/82.13.1107.

Song, X., Zhu, S., Chen, P., Hou, W., Wen, Q., Liu, J., ve ark. (2018). AMPK-Mediated BECN1 Phosphorylation Promotes Ferroptosis by Directly Blocking System Xc– Activity. *Current Biology*, *28*(15). doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.094

Sperandio, S., de Belle, I. & Bredesen, D. E. (2000). An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(26). doi.org/10.1073/pnas.97.26.14376

Sprick, M. R., Weigand, M. A., Rieser, E., Rauch, C. T., Juo, P., Blenis, J., ve ark. (2000). FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*, *12*(6). doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80211-3

Stennicke, H. R. & Salvesen, G. S. (2000). Caspases - Controlling intracellular signals by protease zymogen activation. In *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* (Vol. 1477, Issues 1–2). doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00281-2

Sun, Q., Zhang, L. Q. & He, F. C. (2006). Progress of researches on gene function of GSDMDC family. In *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji* (Vol. 28, Issue 5).

Suraweera, A., O'Byrne, K. J. & Richard, D. J. (2018). Combination therapy with histone deacetylase inhibitors (HDACi) for the treatment of cancer: Achieving the full therapeutic potential of HDACi. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 8, Issue MAR). doi.org/10.3389/fonc.2018.00092

Tang, D. G., Chen, Y. Q. & Honn, K. v. (1996). Arachidonate lipoxygenases as essential regulators of cell survival and apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(11).doi.org/10.1073/pnas.93.11.5241

Tepper, A. D.., Borst, J. & van Blitterswijk, W. J. (2000). Sphingomyelin hydrolysis to ceramide during the execution phase of apoptosis results from phospholipid scrambling and alters cell-surface morphology. *Journal of Cell Biology*, *150*(1).doi.org/10.1083/jcb.150.1.155

Tessema, M. & Belinsky, S. A. (2008). Mining the epigenome for methylated genes in lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*, *5*(8). doi.org/10.1513/pats.200805-045TH

Thiery, J., Keefe, D., Saffarian, S., Martinvalet, D., Walch, M., Boucrot, E., ve ark. (2010). Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood*, *115*(8).doi.org/10.1182/blood-2009-10-246116

Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: Enemies within. In *Science* (Vol. 281, Issue 5381). doi.org/10.1126/science.281.5381.1312

Tomizawa, K., Suda, K., Onozato, R., Kosaka, T., Endoh, H., Sekido, Y., ve ark. (2011). Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers. *Lung Cancer*, *74*.doi.org/10.1016/j.lungcan.2011.01.014

Tong, W. G., Ding, X. Z. & Adrian, T. E. (2002). The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *296*(4). doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02014-4

Torre, L. A., Siegel, R. L. & Jemal, A. (2016). Lung cancer statistics. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *893*. doi.org/10.1007/978-3-319-24223-1_1

Tran, T. N., Selinger, C. I., Kohonen-Corish, M. R. J., McCaughan, B. C., Kennedy, C. W., O'Toole, S. A., ve ark. (2013). Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) copy number is an independent prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, *81*(3). doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.05.015

Travaglini, L.., Billi, M., Grignani, F. & Nervi, C. (2009). Epigenetic reprogramming of breast cancer cells by valproic acid occurs regardless of estrogen receptor status. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *41*(1). doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.019

Travis, W. D., Garg, K., Franklin, W. A., Wistuba, I. I., Sabloff, B., Noguchi, M., ve ark. (2005). Evolving concepts in the pathology and computed tomography imaging of lung adenocarcinoma and bronchioloalveolar carcinoma. In *Journal of Clinical Oncology* (Vol. 23, Issue 14).doi.org/10.1200/JCO.2005.15.776

Traynor, A. M., Dubey, S., Eickhoff, J. C., Kolesar, J. M., Schell, K., Huie, M. S., ve ark. (2009). Vorinostat (NSC# 701852) in Patients with relapsed non-small cell lung cancer; A wisconsin oncology network phase II study. *Journal of Thoracic Oncology*, *4*(4). doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181952478

Trimarchi, J. M. & Lees, J. A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 3, Issue 1).doi.org/10.1038/nrm714

Turcotte, F.., Prud'homme, D. & Gendron, R. (1994). Regulated pre-employment medical examinations and their effect on the utilization of health services: The experience of 1,498 police cadets, Quebec, 1988. *Canadian Journal of Public Health*, *85*(SUPPL. 2).

Turner, N. & Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: From development to cancer. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 10, Issue 2). doi.org/10.1038/nrc2780

Twig, G., Elorza, A., Molina, A. J. A., Mohamed, H., Wikstrom, J. D., Walzer, G., ve ark. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO Journal*, *27*(2). doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963

Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunagaran, D., Lavi, S., ve ark. (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. Mol Cell Biol. doi: 10.1128/MCB.16.10.5276. PMID: 8816440; PMCID: PMC231527

Ulukaya, E., Acilan, C. & Yilmaz Y. (2011). Apoptosis: why and how does it occur in biology? Cell Biochem Funct. doi: 10.1002/cbf.1774.

Vajdic, CM. & van Leeuwen, MT. (2009). Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. Int J Cancer. doi: 10.1002/ijc.24439.

van den Broeck, A., Brambilla, E., Moro-Sibilot, D., Lantuejoul, S., Brambilla, C., Eymin, B., ve ark. (2008). Loss of histone H4K20 trimethylation occurs in preneoplasia and influences prognosis of non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, *14*(22). doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0869

Viard, I., Wehrli, P., Bullani, R., Schneider, P., Holler, N., Salomon, D., ve ark. (1998). Inhibition of toxic epidermal necrolysis by blockade of CD95 with human intravenous immunoglobulin. Science. doi: 10.1126/science.282.5388.490.

Vichai, V. & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nature Protocols, 1(3), 1112–1116. doi.org/10.1038/nprot.2006.179

Vousden, K. H. & Lane, D. P. (2007). p53 in health and disease. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 8, Issue 4). doi.org/10.1038/nrm2147

Wada, N., Kawano, Y., Fujiwara, S., Kikukawa, Y., Okuno, Y., Tasaki, M., ve ark. (2015). Shikonin, dually functions as a proteasome inhibitor and a necroptosis inducer in multiple myeloma cells. *International Journal of Oncology*, *46*(3). doi.org/10.3892/ijo.2014.2804

Wagner, T., Kiweler, N., Wolff, K., Knauer, S. K., Brandl, A., Hemmerich, P., Dannenberg, J. H., Heinzel, T., Schneider, G., & Krämer, O. H. (2015). Sumoylation of HDAC2 promotes NF-κB-dependent gene expression. *Oncotarget*, *6*(9). doi.org/10.18632/oncotarget.3344

Wang, W.., Hu, W. & Zhang, J. (2015). Baicalein attenuates renal fibrosis by inhibiting inflammation via down-regulating NF-κB and MAPK signal pathways. J Mol Histol. doi: 10.1007/s10735-015-9621-8. Epub 2015 May 17.

Wang, C. & Youle, R. J. (2009). The role of mitochondria in apoptosis. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 43). doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134850

Wang, F., Lu, J. B., Wu, X. Y., Feng, Y. F., Shao, Q., An, X., ve ark. (2019). Clinical genetic features and related survival implications in patients with surgically resected large-cell lung cancer. Cancer Management and Research, 11, 5489–5499. doi.org/10.2147/CMAR.S200263.

Wang, M., Ning, X., Chen, A., Huang, H., Ni, C., Zhou, C., ve ark. (2015). Impaired formation of homotypic cell-in-cell structures in human tumor cells lacking alpha-catenin expression. *Scientific Reports*, *5*.doi.org/10.1038/srep12223

Warburg, O. (1956). On the origin of cancerww cells. *Science*, *123*(3191). doi.org/10.1126/science.123.3191.309

Wei, M., Mao, S., Lu, G., Li, L., Lan, X., Huang, Z., ve ark. (2018). Valproic acid sensitizes metformin-resistant human renal cell carcinoma cells by upregulating H3 acetylation and EMT reversal. BMC Cancer. doi: 10.1186/s12885-018-4344-3.

Wertz, I. E. & Dixit, V. M. (2010). Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 17, Issue 1). doi.org/10.1038/cdd.2009.168

Wong, D. W. S., Leung, E. L. H., So, K. K. T., Tam, I. Y. S., Sihoe, A. D. L., Cheng, L. C., ve ark. (2009). The EML4-ALK fusion gene is involved in various histologic types of lung cancers from nonsmokers with wild-type EGFR and KRAS. *Cancer*, *115*(8). doi.org/10.1002/cncr.24181

Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 30, Issue 1). doi.org/10.1186/1756-9966-30-87

Woo, E. Y., Chu, C. S., Goletz, T. J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., ve ark. (2001). Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Research*, *61*(12).

Yang, Y.., Zhang, P. & Fan, J. (2015). Programmed cell death and its role in inflammation. In *Military Medical Research* (Vol. 2, Issue 1). doi.org/10.1186/s40779-015-0039-0

YEN, C.-L. E.., FERNANDES, A. & ZEISEL, S. H. (2001). Choline deficiency induces apoptosis in primary cultures of fetal neurons. *The FASEB Journal*, *15*(10). doi.org/10.1096/fj.00-0800com

Yipp, B. G. & Kubes, P. (2013). NETosis: How vital is it? In *Blood* (Vol. 122, Issue 16). doi.org/10.1182/blood-2013-04-457671

Yoneda, T., Imaizumi, K., Oono, K., Yui, D., Gomi, F., Katayama, T., ve ark. (2001). Activation of caspase-12, an endoplastic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. J Biol Chem. doi: 10.1074/jbc.M010677200.

Yu, M., Bardia, A., Wittner, B. S., Stott, S. L., Smas, M. E., Ting, D. T., ve ark. (2013). Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*, *339*(6119). doi.org/10.1126/science.1228522

Yu, X. & He, S. (2017). GSDME as an executioner of chemotherapy-induced cell death. *Science China Life Sciences*, *60*(11). doi.org/10.1007/s11427-017-9142-2

Yu, Z. F.., Schuchman, E. H. & Mattson, M. P. (2000). Pivotal role for acidic sphingomyelinase in cerebral ischemia-induced ceramide and cytokine production, and neuronal apoptosis. *Journal of Molecular Neuroscience*, *15*(2). doi.org/10.1385/JMN:15:2:85

Zhang Y.., Hu, H. & Jin, W. (2013). Effects of baicalein on apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells. Food Chem Toxicol. doi: 10.1016/j.fct.2012.12.019.

Zhang, C., cheng, Li. C., guang, Wang, Y. feng, Xu, L. hui., ve ark. (2019). Chemotherapeutic paclitaxel and cisplatin differentially induce pyroptosis in A549 lung cancer cells via caspase-3/GSDME activation. *Apoptosis*, *24*(3–4). doi.org/10.1007/s10495-019-01515-1

Zhang, C. S. & Lin, S. C. (2016). AMPK promotes autophagy by facilitating mitochondrial fission. In *Cell Metabolism* (Vol. 23, Issue 3). doi.org/10.1016/j.cmet.2016.02.017

Zhang, H.., Shay, J. W. & Cohen, S. N. (2004). Disparate effects of telomere attrition on gene expression during replicative senescence of human mammary epithelial cells cultured under different conditions. *Oncogene*, *23*(37). doi.org/10.1038/sj.onc.1207834

Zhang, S., Tang, Z., Qing, B., Tang, R., Duan, Q., Ding, S., ve ark. (2019). Valproic acid promotes the epithelial-to-mesenchymal transition of breast cancer cells through stabilization of Snail and transcriptional upregulation of Zeb1. *European Journal of Pharmacology*, *865*. doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172745

Zhang, Y., Sun, C., Xiao, G., Shan, H., Tang, L., Yi, Y., ve ark. (2019). S-nitrosylation of the Peroxiredoxin-2 promotes S-nitrosoglutathione-mediated lung cancer cells apoptosis via AMPK-SIRT1 pathway. *Cell Death and Disease*, *10*(5).doi.org/10.1038/s41419-019-1561-x

Zhuang, X., Xia, X., Wang, C., Gao, F., Shan, N., Zhang, L., ve ark. (2010). A high number of CD8+ T cells infiltrated in NSCLC tissues is associated with a favorable prognosis. *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, *18*(1).doi.org/10.1097/PAI.0b013e3181b6a741

Zimmermann, M. & Meyer, N. (2011). Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 740*. doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_8

İNTİHAL RAPORU

Turnitin Orijinallik Raporu

İşleme kondu: 10-Eyl-2021 03:17 +03
NUMARA: 1640010626
Kelime Sayısı: 25327
Gönderildi: 1

Vida R. Yüksek Lisans Tezi Vida Rezayifar tarafından

Benzerlik Endeksi	Kaynağa göre Benzerlik	
%11	Internet Sources:	%7
	Yayınlar:	%1
	Öğrenci Ödevleri:	%8

5% match (02-Eyl-2021 tarihli öğrenci ödevleri)
Sınıf: Kanser Biyolojisi ve Farmakolojisi
Ödev: Master Tez
Ödev Numarası: 1640003623

2% match (18-Ara-2019 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) on 2019-12-18

1% match (27-Oca-2021 tarihli öğrenci ödevleri)
Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) on 2021-01-27