

**SERAMİDAZ İNHİBİSYONUNUN POTANSİYEL TERAPÖTİK HEDEF
OLARAK KANSER HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ**

Dila KUMAŞ

Yüksek Lisans [Tezi]

Biyoloji Anabilim Dalı

[Moleküler Biyoloji Bilim Dalı]

Danışman: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

[]

Eskişehir

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Ocak 2021

ÖZET

SERAMİDAZ İNHİBİSYONUNUN POTANSİYEL TERAPÖTİK HEDEF OLARAK KANSER HÜCRELERİNDE İNCELENMESİ

Dila KUMAŞ

Biyoloji Anabilim Dalı

[Moleküler Biyoloji Bilim Dalı]

Eskişehir Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2021

Danışman: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

Kanser hücreleri, kontrollü bir şekilde bölünme yeteneklerinin kontrolünü kaybetmiş düzensiz bir şekilde bölünen, büyüyen hücrelerdir. Normal hücreler kontrollü bir şekilde büyür, bölünür ve ölümler ancak kanserli hücreler normal hücrelerden farklıdır ve tehlikelidir. Kanser, kalp damar hastalıklarından sonra Dünya’da ve ülkemizde görülme sıklığı olarak ikinci sırada yer almaktadır. Her yıl dünya çapında 8 milyondan fazla insan çeşitli kanser türlerinden dolayı ölmektedir. Bu nedenle kanser ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Akciğer kanseri, görülme sıklığı açısından kanser türleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Akciğer kanser hücrelerinin; böbrek üstü bezleri, karaciğer, kemik ve beyin gibi çok farklı organlara metastaz yapabilme kabiliyetinden dolayı öldürücülüğü yüksek bir kanser türüdür. Son yıllardaki akciğer kanseri tedavisindeki gelişmelere rağmen tam yanıt veren bir tedaviye ulaşamadığı bilinmektedir. Bu nedenle, akciğer kanserini tedavi etmek ve hastaların tedavi sürecindeki yaşam kalitesini iyileştirmek için güvenli ve etkili ilaçların geliştirilmesine yüksek seviyede ihtiyaç duyulmaktadır. ARN14974 (BOC) bir seramidaz inhibitörü olup hücrede seramid birikimine yol açarak hücreyi apoptoza sürüklemektedir. Seramid, apoptozun indüklenmesinde rol oynayan önemli bir sfingolipittir. Asit seramidaz, seramidin sfingozin ve yağ asidine hidrolizini katalize eden bir enzimdir. Asit seramidaz inhibisyonu, normal ve neoplastik kanser hücrelerinin hem büyümesini hem de hayatta kalmasını etkileyerek hücrenin çoğalma ve ölümü arasındaki dengeyi etkilediği bilinmektedir. Çalışmamızda, bir seramidaz inhibitörü olan ARN14974 maddesinin küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücreleri (A549) ve sağlıklı epitelyal akciğer hücreleri (Beas-2B) üzerindeki sitotoksik, anti-proliferatif ve apoptotik etkilerinin karşılaştırmalı

olarak analiz edilmesi amaçlanmıştır. Bir diğerk amacımız ise hücrenin yaşamını ve çoğalmasını sağlayan ve aynı zamanda apoptozu inhibe eden seramid-1 fosfat oluşumunu engellemek, seramidin hücre içi seviyesini arttırarak yeni ve etkili bir tedavi yaklaşımını araştırmaktır.]

Anahtar Sözcükler: [ARN14974, A549, Seramidaz, Akciğer kanseri]



ABSTRACT

INVESTIGATION OF CERAMIDASE INHIBITION IN CANCER CELLS AS A POTENTIAL THERAPEUTIC TARGET

Dila KUMAŞ

Department of Biology

[Programme in Molecular Biology]

Eskişehir Technical University, Institute of Graduate Programs, January 2021

Supervisor: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

Cancer cells are cells that divide and grow irregularly and have lost control of their ability to divide in a controlled manner. Normal cells grow, divide, and die in a controlled manner, but cancerous cells are different from normal cells and are dangerous. Cancer takes second order after cardiovascular diseases in terms of its prevalence in the world and in Turkey. Over 8 million people worldwide have been dying every year from cancer. Therefore, cancer has become a serious health problem. Lung cancer ranks first among cancer types in terms of its incidence. Although genetic factors are effective in the development of lung cancer, tobacco use is the biggest cause. Lung cancer is a cancer type with high lethality due to its ability to metastasize to many different organs such as the adrenal glands, liver, bone and brain. It is known that despite the advances in lung cancer treatment in recent years, a fully responsive treatment has not been achieved. Therefore, there is an unmet need for the development of safe and effective drugs to treat lung cancer and improve patients' quality of life during the treatment process. ARN14974 (BOC) is a ceramide inhibitor that causes the accumulation of ceramide in the cell and drives the cell into apoptosis. Ceramide is an important sphingolipid involved in the induction of apoptosis. Acid ceramidase is the enzyme that catalyzes the hydrolysis of ceramide to sphingosine and fatty acid. Acid ceramidase inhibition is known to affect the balance between cell proliferation and death by affecting both growth and survival of normal and neoplastic cells. In our study, we aimed to compare the cytotoxic, anti-proliferative and apoptotic effects of ARN14974, a ceramide inhibitor, on non-small lung cancer cells (A549) and healthy epithelial lung cells (Beas-2B). Another aim of ours is to prevent the formation of ceramide-1-phosphate, which provides cell survival and

proliferation and also inhibits apoptosis, and to investigate a new and effective treatment approach by increasing the intracellular level of ceramide.]

Keywords: [ARN14974, A549, Ceramidase. Lung cancer,.]



TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve lisansüstü eğitim-öğretimim süresince kıymetli bilgi birikimini, tecrübelerini, anlayışını, destek ve teşviklerini esirgmeden her zaman benimle paylaşan, hoşgörüsünden ve yol göstericiliğinden daima yararlandığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU'ya,

Tez çalışmamın laboratuvar ve deney aşamalarında her türlü soru ve sorunuma çözüm bulan, akademik bilgisini, yardımseverliğini, sabrını, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Dr. Canan VEJSELOVA SEZER'e,

Yardımlarını aldığım değerli Uzm. Biyolog Arzu İŞÇAN'a,

Laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen, çalışma arkadaşlarım Hüseyin İZGÖRDÜ ve Emre ÇÖMLEKÇİ'ye

Tez yazım sürecimde sürekli uğraştırmama rağmen sabırla yardımlarını esirgemeyen Rabia ÇAKIR, Merve ÇETİN ve Hamza KAPAN'a

Eğitim-öğretim hayatım boyunca maddi-manevi desteklerini her zaman hissettiğim, beni cesaretlendiren, fedakârlık ve daima yol gösterenim olan başta ablam Tuğba ERTUĞRUL olmak üzere annem, babam ve abime

Tez sürecim boyunca her türlü zorluğuma katlanan canım ev arkadaşım Büşra KURNAZ'a

Bu projeye verdikleri maddi ve manevi destek için bilimin ve bilim insanının her zaman yanında olan TÜBİTAK'a

Çalışmam boyunca yanımda olan tüm sevdiklerime

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Dila KUMAŞ

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Eskişehir Teknik Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Dila KUMAŞ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR	vii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
GÖRSELLER DİZİNİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kanser	4
1.1.1. Kanser hücrelerinin genel özellikleri.....	4
1.1.2. Kanser oluşum mekanizmaları	6
1.1.3. Kanser epidemiyolojisi.....	7
1.1.4. Kanser tedavisi	8
1.2. Akciğer Kanseri.....	9
1.2.1. Akciğer kanseri etiyolojisi	9
1.2.2. Akciğer kanseri epidemiyolojisi.....	10
1.2.3. Akciğer kanseri histopatolojisi ve türleri.....	10
1.2.3.1. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK).....	11
1.2.3.2. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)	11
1.3. Akciğer Kanseri Güncel Tedavisi	12
1.4. İnsan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hattı A549.....	13
1.5. Hücre Lipit Metabolizması.....	14
1.5.1. Kanser ve lipid metabolizması ilişkisi	14

1.5.2. Sfingolipid metabolizması.....	15
1.5.2.1. <i>Seramidler ve kanserle ilişkisi</i>	16
1.5.3. Seramidaz inhibitörleri.....	17
1.5.3.1. <i>ARN14974</i>	18
1.6. Apoptoz	19
1.6.1. Apoptozun morfolojisi	19
1.6.2. Apoptoz ve kanser ilişkisi	22
1.6.3. Sfingolipidlerin apoptoz ve kanser oluşumu ilişkisi.....	23
1.6.4. Apoptoz tayin metodları	24
1.7. In Vitro Sitotoksosite Testi.....	26
2. MATERYAL VE METOD	28
2.1. Materyal.....	28
2.1.1. Kullanılan hücre serileri	28
2.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	28
2.2. Metod.....	28
2.2.1. A549 ve Beas-2B hücrelerinin çoğaltılması.....	28
2.2.2. ARN14974'ün hazırlanması	29
2.2.3. MTT kolorimetrik sitotoksosite testi	29
2.2.4. Sulforhodamine B metodu	30
2.2.5. ATP canlılık testi	30
2.2.6. Konfokal mikroskopi yöntemi.....	30
2.2.6.1. <i>Hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopi yöntemi ile tayini</i>	30
2.2.7. Geçirimli elektron mikroskopi yöntemi	31
2.2.7.1. <i>Geçirimli elektron mikroskobunda A549 ve Beas-2B hücrelerinin takibi</i>	31
2.2.8. Akış sitometri yöntemi	31
2.2.8.1. <i>Akış sitometrisinde anneksin V-FITC ve PI boyama yöntemi</i>	31
2.2.8.2. <i>Akış sitometride kaspaz 3/7 analizi</i>	32
2.2.8.3. <i>Akış sitometride hücre döngüsü analizi</i>	32
2.2.8.4. <i>Akış sitometride mitokondriyal zar potansiyelindeki değişikliklerin incelenmesi</i>	33

2.2.9. Yara iyileşme deneyi	33
2.2.10. Yumuşak agar koloni oluşum deneyi.....	34
2.2.11. İstatiksel analiz	34
3. BULGULAR.....	35
3.1. MTT Kolorimetrik Sitotoksosite Testi.....	35
3.1.1. ARN14974 'ün A549 ve Beas-2B hücreleri üzerindeki sitotoksosite bulguları	35
3.2. Sulforhodamine B Sitotoksosite Testi Bulguları (SRB).....	36
3.2.1. ARN14974'ün A549 ve Beas-2B hücreleri üzerindeki sitotoksosite bulguları	36
3.3. ATP sitotoksosite bulguları.....	37
3.3.1. ARN14974'ün A549 ve Beas-2B hücre hatları üzerindeki sitotoksosite bulguları	37
3.4. Konfokal Mikroskopik Bulgular	39
3.4.1. A549 ve Beas-2B kontrol hücrelerindeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları.....	39
3.4.2. ARN14974'ün A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları.....	40
3.5. Geçirimli Elektron Mikroskopik Bulguları.....	42
3.5.1. A549 ve Beas-2B kontrol hücrelerinin ince yapısının geçirimli elektron mikroskopik bulguları	42
3.5.2. ARN14974'ün A549 ve Beas-2B hücrelerinde sebep olduğu ince yapısal değişimlerin geçirimli elektron mikroskopik bulguları.....	43
3.6. Akış Sitometri Bulguları.....	45
3.6.1. Anneksin V uygulamasının akış sitometrisindeki bulguları.....	45
3.6.1.1. A549 ve Beas-2B hücrelerinin anneksin V uygulaması ile akış sitometrisindeki bulguları.....	45
3.6.1.2. ARN14974 (BOC) ile muamele edilen A549 ve Beas-2B hücrelerinin anneksin V uygulaması ile akış sitometrisindeki bulguları	46
3.7. Kaspaz 3/7 Uygulamasının Akış Sitometrisindeki Bulguları.....	48

3.7.1. A549 insan akciğer kanser hücrelerinin kaspaz 3/7 uygulaması ile akış sitometrisindeki bulguları.....	48
3.7.2. Akış sitometride hücre analiz bulguları	50
3.7.2.1. A549 ve Beas-2B kontrol hücrelerinin hücre döngüsü analiz bulguları.....	50
3.7.2.2. ARN14974 uygulanmış A549 ve Beas-2B hücrelerinin hücre döngüsü analiz bulguları.....	51
3.7.3. Akış sitometride mitokondri zar potansiyeli değişikliklerinin incelenmesi	53
3.8. Yara İyileşme Deneyi Bulguları.....	54
3.9. Yumuşak Agar Koloni Oluşum Deneyi Bulguları	55
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	56
KAYNAKÇA.....	62
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1.1. Apoptoz ve nekrozun karşılaştırılması	20
Tablo 1.2. Apoptozis ile bağlantılı genler	23



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Kanser hücrelerinin genel özellikleri	5
Şekil 1.2. Sfingolipid metabolizması.....	16
Şekil 1.3. ARN14974'ün moleküler yapısı	18
Şekil 1.4. Apoptotik süreç	21
Şekil 3.1. ARN14974'ün, insan akciğer kanser hücresi A549 ve sağlıklı insan akciğer hücresi Beas-2B ile 24 saatlik MTT muamelesi sonucu elde edilen canlılık grafiği	36
Şekil 3.2. ARN14974'ün, insan akciğer kanser hücresi A549 ve sağlıklı insan akciğer hücresi Beas-2B ile 24 saatlik SRB muamelesi sonucu elde edilen canlılık grafiği	37
Şekil 3.3. ARN14974'ün, insan akciğer kanser hücresi A549 ve sağlıklı insan akciğer hücresi Beas-2B ile 24 saatlik ATP muamelesi sonucu elde edilen canlılık grafiği	38
Şekil 3.4. A549 ilaçsız hücrelerinin anneksin-V boyama bulguları	45
Şekil 3.5. Beas-2B kontrol hücrelerinin anneksin-V boyama bulguları.....	46
Şekil 3.6. ARN14974 ile muamele edilmiş A549 hücrelerinin anneksin-V boyama bulguları	47
Şekil 3.7. ARN14974 ile muamele edilmiş Beas-2B hücrelerinin anneksin-V boyama bulguları	48
Şekil 3.8. A549 ilaçsız hücrelerin Kaspaz3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen histogram.....	49
Şekil 3.9. ARN14974'ün 24 saatlik IC ₅₀ konsantrasyonunun uygulandığı A549 hücrelerinin kaspaz3-7 değerlendirilmesi ile elde eden histogram.....	49
Şekil 3.10. A549 ilaçsız hücrelerinin hücre döngüsü analiz sonuçları	50
Şekil 3.11. Beas-2B kontrol hücrelerinin hücre döngüsü analiz sonuçları.....	51
Şekil 3.12. ARN14974 ile muamele edilmiş A549 hücrelerinin hücre döngüsü analiz sonuçları	52
Şekil 3.13. ARN14974 ile muamele edilmiş Beas-2B hücrelerinin hücre döngüsü analiz sonuçları. Bu sonuçlara göre Beas-2B hücrelerinin G ₀ /G ₁ evresinde bulunma yüzdesi	52
Şekil 3.14. A549 hücrelerinin mikondriyal membran potansiyel histogramı.....	53

Şekil 3.15. ARN14974'ün A549 hücreleri üzerideki mikondriyal membran potansiyel etkisi	53
Şekil 3.16. ARN14974'ün ışık mikroskobu altında hücre göçü ve proliferasyon üzerindeki etkileri incelenmiştir	54
Şekil 3.17. A549 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği	55
Şekil 3.18. Beas-2B hücrelerinin koloni oluşturma deney görüntüleri	55



GÖRSELLER DİZİNİ

Sayfa

Görsel 3.1. Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak boyanmış A549 ilaç ile muamele edilmemiş hücrelerin Konfokal Mikroskop Görüntüsü.....	39
Görsel 3.2. Akridin Oranj ve Falloidin ile boyanmış Beas-2B kontrol hücrelerinin Konfokal mikroskop görüntüsü.....	40
Görsel 3.3. ARN14974 ‘ün A549 hücresi üzerinde neden olduğu morfolojik yapısal değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü.....	41
Görsel 3.4. ARN14974 ‘ün Beas-2B hücresi üzerinde neden olduğu morfolojik yapısal değişikliklerin konfokal mikroskopik görüntüsü.....	41
Görsel 3.5. İlaçsız A549 hücrelerinin geçirimli elektron mikroskop görüntüsü.....	42
Görsel 3.6. Beas-2B kontrol hücrelerinin Geçirimli elektron mikroskopik görüntüsü.....	43
Görsel 3.7. ARN14974 ‘ün A549 hücreleri üzerindeki etkisinin geçirimli elektron mikroskop görüntüsü	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A549	:	İnsan Akciğer Kanseri Hücre Hattı	
Beas-2B	:	İnsan Sağlıklı Akciğer Hücre Hattı	
KHDAK	:	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri	
KHAK	:	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri	
FBS	:	Fetal Bovine Serum	
MTT	:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium sitotoksosite testi	bromide
Rpm	:	Revolutions per minute	
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü	
RPMI	:	Roswell Park Memorial Institute Medium	
PBS	:	Phosphate Buffered Saline	
SDS	:	Sodyum Dodesil Sülfat	
TCA	:	Trikloro asetik asit	
TEM	:	Transmission Electron Microscope	
SRB	:	Sulforhodamine B	
PI	:	Propidyum İyodür	
mL	:	Mililitre	

1. GİRİŞ

Kanser, hücre çoğalması ve ölümü arasındaki dengeyi sağlayan çeşitli mekanizmaların arasındaki düzenin bozulması sonucunda, bir doku veya organdaki hücrelerin hasarlandığında veya ömrünü tamamladığında ölüme gitmemesi, bununla birlikte anormal ve kontrolsüz çoğalması ile karakterize, oldukça karmaşık, tedavisi zor ve ciddi bir hastalıktır. Yüzden fazla çeşidi tanımlanmış olan bu hastalık; günümüzde gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere tüm dünya toplumları için önemli bir sağlık sorunudur [1].

Akciğer kanseri; güncel tedavilere rağmen halen dünyada ve ülkemizde en fazla ölüme neden olan kanser türleri arasında yer almaktadır. Çok sayıda alt sınıflaması olmakla birlikte; küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan tip olmak üzere histopatolojik olarak başlıca iki tipe ayrılmıştır. Tüm akciğer kanseri alt tiplerinde sigara birincil etkindir ve etiyojisinde %90 oranda aktif veya pasif sigara kullanılması yer almaktadır. Ortalama 5 yıllık sağ kalım birçok kanser türüne oranla daha düşüktür (%10-15). Bunun en önemli sebebi akciğer kanserinde tanı konduğunda, çoğu zaman tümörün ileri evrede olmasıdır. Çünkü akciğer kanseri bulguları genellikle sinsidir. Öksürük, balgam, nefes darlığı gibi alt solunum yolu enfeksiyonu bulgularından pek farklı olmayan bulgulardır. Hastaların yalnızca %20'sinde erken evrelerde tanı konabilmektedir. Tedavi alternatifleri arasında; cerrahi, cerrahiye uygun olmayan hastalarda ise kemoterapi ve radyoterapi yer almakla birlikte, tanı konulduğu sırada hastaların çoğunluğu hastalığın evresi nedeniyle cerrahiye uygun olmamaktadır. Kemoterapi ve radyoterapi de hedeflenen yaşam kalitesi ve sağ kalım için oldukça yetersiz kalmaktadır. Her geçen yıl görülme sıklığı artan bu kanser türüne yönelik yeni tedavi araştırma-geliştirme çalışmaları önem kazanmaktadır [2].

Günümüzde kanserlere yönelik tedavi seçenekleri arasında büyük yer tutan kemoterapi ve radyoterapi uygulamalarının temel prensibi; normal bölünme gösteren hücrelerde minimum zararı hedefleyerek, kontrolsüz bölünme ve yayılma eğilimi gösteren hücrelere durdurucu veya öldürücü etki etmesidir [2]. Kemoterapi ve radyoterapi uygulamalarının her ne kadar seçici toksik etkileri olsada; kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelere de bilinen ciddi zararları mevcuttur, bu durum bu uygulamaların dozunu ve uygulama süresini kısıtlayan temel sorundur. Ayrıca akciğer kanserinde uygulanan

kemoterapinin ve radyoterapinin hastanın sağ kalım süresi üzerine etkileri oldukça sınırlı, tümör hücrelerinin çoğunluğuunda kemoterapi direnci oldukça yüksektir.

Tüm dünyada kanser tedavisinde yeni alternatiflerin ve var olan tedavilere destekleyici yöntemlerin arayışı sürmektedir. Güncel kanser araştırmalarında geliştirilmesi hedeflenen tedavi yöntemlerinde amaç; kanser tipine özgü, etkin, kanserli hücreleri seçici olarak hedef alan ve sağlıklı hücelere mümkün olduğunca az toksik tedavi süresince direnç gelişimi minimum olan yöntemlerdir.

Malign dönüşüm gösteren hücrelerin fizyolojisinde ortak olarak görülen 6 önemli değişiklik söz konusudur:

1. Büyüme sinyallerinden bağımsız olarak büyüyebilirler,
2. Büyüme sınırlandıran (anti-growth) sinyallere duyarlılıkları azalır,
3. Programlanmış hücre ölümünden (apoptosis) kaçabilirler
4. Sınırsız çoğalma potansiyelleri vardır,
5. Devamlı anjiyogenez oluştururlar,
6. Doku invazyonu ve uzak metastaz yetenekleri vardır [3].

Kanser tedavisinde, hedef alınan ortak temel özellik; kanser hücrelerinin büyüme ve normal yaşam sürelerinin kontrolünü kaybetmeleridir. Bunu apoptotik uyarıya hücrenin cevap vermesini engelleyen sinyal yolları geliştirerek yaparlar [3]. Bu özelliğin kazanılması genomda birçok dinamik değişikliğin varlığını gerektiren çok aşamalı bir süreçtir.

Kanser hücreleri yüksek proliferasyon hızına sahip olduklarından, yeni oluşturdukları membranların yapıtaşı olarak büyük miktarda lipidlere ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle lipidlerin kanser oluşumunda ve progresyonundaki rolü hakkında çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Sfingolipidler ve metabolitleri; hücrelerin yapısal bütünlüğuünde ve hücre zarının bariyer fonksiyonunda rol alırlar. Bunun yanında sfingozin-1-fosfat ve seramidler gibi bazı biyoaktif sfingolipid türleri hücrenin çeşitli sinyal yolları üzerinde önemli fonksiyonları olan moleküllerdir. Bu sayede büyüme, farklılaşma, apoptoz ve otofaji gibi direkt olarak karsinogenezde rol aldığı bilinen birçok hücresel fonksiyonu etkileyebilirler [4-6]. Sfingozin-1 fosfat'ın büyüme faktörü özelliği gösterdiği bilinmekte;

bu sayede hücre proliferasyonu, inflamasyon, tümör büyümesi ve metastazında rol alabileceği düşünülmekte iken, seramidlerin; büyümenin durması, yaşlanma ve apoptozu tetiklediği ve bu sayede tümörle savaşmada rol alabileceği düşünülmektedir [6]. Sağlıklı organizmada; bahsedilen sfingolipid metabolitleri arasında mitojenik etkilerin ve apoptozun düzenini sağlayan dinamik bir denge vardır.

Bozulmuş sfingolipid metabolizmasının kanser oluşumu ve ilerleyişinde, ayrıca kemoterapi direncinde rol aldığı yapılan çalışmalarda gösterilmektedir [4-6]. Yapılan araştırmalar dikkatleri özellikle seramidler üzerine çekmektedir. Seramid; 14-16 karbon uzunluğunda açil zincirleri içeren N-açillenmiş bir sfingozin molekülüdür. Hücrede oluşumu de novo sentez yolu ile, sfingozin molekülü döngüsünden kurtarma yolu ile veya kompleks sfingolipidlerden hidroliz yolu ile olur. Bu yollarda herhangi bir yavaşlama veya durmanın, kanser oluşumu ve tedavi direnci ile alakalı olabileceği düşünülmektedir [7-9]. Birçok araştırmada tedavide uygulanan sitotoksik uyarı, iyonize radyasyon ve kemoterapinin kanserli hücrelerde seramid düzeyini arttırdığı tespit edilmiş, hücre ölümüne bu şekilde katkıda bulunduğu gösterilmiştir [4,7]. Yine kanserli hücrelerin standart kemoterapi ve radyoterapiye cevabının artırılmasında, hücrede seramid birikiminin artırılmasının yararlı olabileceği iddia edilmektedir. Bu artış ya üretiminin artırılması ya da yıkımının azaltılması şeklinde iki yolla gerçekleştirilebilmektedir [8-10].

Seramidazlar; hücre içi seramidin katabolizmasında rol alan, insanda tanımlanmış 5 tipi bulunan lizozomal enzim grubudur. Seramidi, sfingozin ve yağ asitine parçalayarak hücredeki düzeyini düşürürler [9]. Bu nedenle seramidazlar son yıllarda kanser araştırmalarında yoğun olarak çalışılmaya başlanmıştır. Asit seramidaz (AC); bunlar arasında en dikkat çekenidir. AC; Seramidlerin metabolizmasında rol alan bir sistein amidazdır. AC hücre düzeyi ve aktivitesinin bazı kanser türlerinde arttığı tespit edilmiş, bu artışın bu tür kanserlerde malignite düzeyi ile [11], ayrıca kemoterapi ve radyoterapi direnci ile bağlantısı gösterilmiştir [8,10]. Son yıllarda yapılan kanser araştırmaları, hücrede seramid düzeyinin korunması ve artırılması hedefine yönelmekte, bunun için çalışılan yöntemlerden biri de seramidazların inaktive edilmesi seçeneğini ortaya atmaktadır [12].

In vitro olarak AC aktivitesini inhibe edebilen, yapısal olarak seramid analogu olan bazı sentetik maddeler tanımlanmıştır. Seramidaz inhibitörleri adını verdiğimiz bu maddeler, güncel kanser araştırmalarında yeni anti-kanser ilaçlar geliştirilmesi için

önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Bunlar arasında; oleoylethanolamide (N-oleylethanolamine)10, (1S,2R)-D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1- propanol (D-e-MAAP) 11, ceranib 1-2 ve bu çalışmada kullanılan ARN14974 en yaygın kullanılanlardır.

1.1. Kanser

Canlıların yapıtaşı olan hücreler sürekli yenilenmektedir. Hücreler yaşamları boyunca belli bir hızda bölünerek çoğalırlar, yaşam sürelerini doldurduklarında ise organizma tarafından yok edilirler. Bu olaylar genler tarafından yönetilen belli bir düzen içerisinde ve kontrollü olarak gerçekleşir. Kanseri; vücutta hemen her organda görülebilen, hücrelerin aşamalı olarak dönüşüme uğramasıyla hızlı ve kontrolsüz çoğalması sonucu oluşan, birçok farklı etyolojiye, patogeneze ve klinik görünüme sahip olabilen kompleks bir hastalıktır. Çok fazla çeşitlilik gösterse de tüm türlerinde altta yatan temel mekanizma benzerdir.

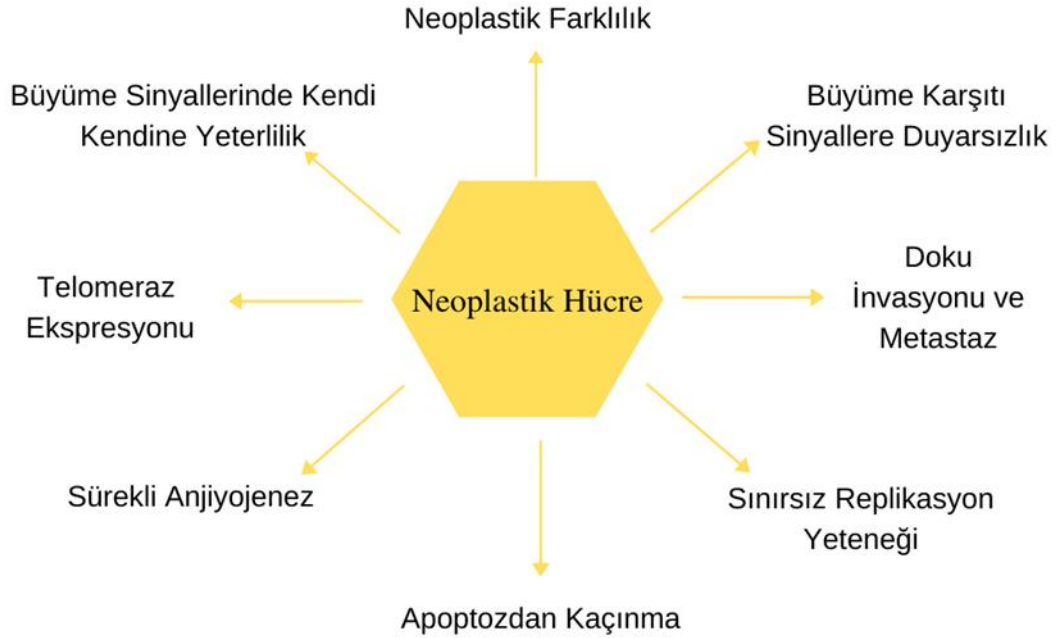
Kanser kelimesi tarihte ilk kez Hipokrates tarafından kullanılmıştır. Latince 'yengeç' anlamına gelmektedir ve kan damarları ile sarılı bir tümör çıkıntısının yengece benzemesi nedeni ile bu ismi almıştır [12]. O günden bu yana hep var olan kanser, değişmekte olan yaşam tarzı ve sanayileşme sonucunda giderek artan oranları ve tedavisinin halen tam olarak yapılamıyor olması nedeni ile günümüzde hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkeler için ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir.

1.1.1. Kanseri hücrelerinin genel özellikleri

Kanser hücreleri incelendiğinde; farklı dokulardan da köken alsalar, sağlıklı hücrelerden bazı ortak farklılıklar gösterdikleri görülmektedir. Kanseri hücrelerinin bazı ortak özellikleri;

1. Sürekli büyüebilme ve bölünebilme: Sağlıklı hücreler bölünebilmek için dışarıdan gelen bir bölünme sinyaline ihtiyaç duyarlar, tümör hücreleri bağımsız olarak bölünebilirler.
2. Büyümeyi durduran sinyallerden kaçınma: Yeterli büyüklüğe ulaşan bir hücrenin büyümesi iç ve dış sinyaller aracılığı ile durdurulur. Tümör hücresi bu sinyallere karşı duyarsızdır.

3. Programlanmış hücre ölümü (apoptozis)'ten kaçınma: Hücre DNA'sı onarılamayacak bir hasar aldığında veya hücre normal hayatını tamamladığında çeşitli tümör baskılayıcı mekanizmalar tarafından kendi kendisini yok etmeye yönlendirilir. Tümör hücrelerinde bu mekanizma bozulmuştur.
4. Sınırsız sayıda çoğalabilme: Sağlıklı hücreler çevreleri ile iletişime geçerek belli bir bölünme sayısına ulaşınca bölünmeyi sonlandırırlar. Tümör hücrelerinin çevre hücreler ile iletişimi bozulmuştur ve sonsuz sayıda bölünebilir.
5. Anjiyogenez oluşturabilme: Hücreler oksijen ve besin ihtiyacını çevrelerindeki damarlar aracılığıyla karşılar. Besin ve oksijen ihtiyacı artan tümör hücresi anjiyogenez uyarıcı bazı faktörler salgılayarak kendisine yeni damarlar oluşturulmasını sağlar.
6. Doku invazyonu ve uzak metastaz: Kontrolsüz büyüyen ve yeni damarlanmaya sahip olan tümör hücresi çevre dokuları istila etme ve ana hücreden kopan parçalar sayesinde kan ve lenf dolaşımı yoluyla uzak dokulara yayılma eğilimindedir [3].



Şekil 1.1. Kanser hücrelerinin genel özellikleri

1.1.2. Kanser oluşum mekanizmaları

Karsinogenezin temelinde hücrenin yaşamını, bölünmesini etkileyen birden çok epigenetik değişikliğin veya mutasyonun çok aşamalı olarak oluşması yer alır. Bu çok basamaklı mutasyonlar sonucu DNA dizisinde birtakım anormallikler oluşan hücre; hızlı ve kontrolsüz büyüme, komşu ve uzak dokulara yayılma gibi kanser hücresi için tipik bazı özellikler kazanır. Bu tüm kanser hücrelerinde ortak olan malign fenotiptir ve bu fenotipin ortaya çıkması yıllar alabilir [14]. Kansere neden olan mutasyonların %10-15'inin, kalıtsal olduğu, yani ebeveynlerden gelen genlerle aktarıldığı, geriye kalan %85-90'ının ise yaşam boyunca hücre DNA'sının mutajenlere maruz kalması sonucu geliştiği düşünülmektedir.

Etiyolojisinde kalıtsal aktarım olan kanserlerde; sağlıklı hücrede tümör oluşumunu tetikleyebilen proto-onkogenlerde, tümör gelişimini önleyen tümör baskılayıcı genlerde veya hücre büyümesini kontrol eden genlerdeki bir mutasyonun kalıtsal olarak aktarılması ve bazı durumlarda karsinojen adını verdiğimiz kalıtsal olmayan bir dış etkenin de tetikleme ile karsinogenez başlayabilmektedir. Bunun en iyi bilinen örneği, insanda mitoz bölünmenin kontrolünde önemli rol oynayan onkojenik mutant p53 tümör baskılayıcı genin mutasyonudur.

Kalıtım dışında kalan etiyolojik faktörler çok büyük çeşitlilik göstermektedir. Çevresel olarak maruz kalınan birçok kimyasal madde, çeşitli mutajen bakteriler, mantarlar ve virüsler, metabolizmaya uygun olmayan diyet ve yanlış beslenme alışkanlıkları, çeşitli hormonların fazlalığı veya eksikliği, iyonize radyasyon, ısı, kronik mikrotravmalar, düşük ve yüksek frekanslı manyetik alan, hücre içi veya hücre dışında oluşan reaktif serbest radikaller bunlar arasında en önemlileridir [15]. Çevresel maruziyette istisnalar dışında süreklilik gerekmektedir.

Kimyasal ajanlar: Sanayileşen dünyada hayatımıza giren birçok kimyasalın toksik ve kanserojen olduğu bildirilmektedir. Başta sigara olmak üzere; çeşitli sanayi atıkları, gıda katkı maddeleri, çevre kirliliği ve çeşitli ilaçlar direkt olarak kanserle ilişkilendirilmiştir.

Onkojenik bakteri ve virüsler: Genlerde spontan olarak oluşan mutasyonlara tümör bakterileri ve virüsler sebep olabilir. Patojenin genomunda bulunan özel gen yapısı enfekte ettiği hücrenin genomuna entegre olarak onkogenik potansiyeli oluşturmaktadır.

İyonize radyasyon; Madde ile etkileştiğinde elektrik yüklü parçacıklar veya iyonlar oluşturan radyasyondur. Geçtikleri ortamda bulunan bir atom ya da atom grubunda elektron kaybı ya da artışına neden olabilirler. İyonlaşma hücre DNA'sında kalıcı hasara neden olabilir. Alfa, beta, gama ve x ışınları bu tür radyasyona örnektir.

Elektromanyetik dalgalar: Yüklü bir parçacığın ivmeli hareketi sonucu oluşan, yayılırken bir elektriksel ve manyetik alan oluşturan dalgalardır. Özellikle düşük frekanslı (<300Hz) manyetik alana maruz kalınması ile lösemi ve beyin tümörü gibi bazı kanserlere yatkınlığın arttığı ispatlanmıştır.

Yanlış beslenme alışkanlıkları: Yüksek yağ ve karbonhidrat içerikli gıdalar, alkol, rafine gıdalar, çeşitli gıda katkı maddeleri, tarım ilacı kalıntıları ve koruyucular, yanlış pişirme yöntemleri; başta sindirim sistemi kanserleri olmak üzere birçok kanser türü ile ilişkilendirilmiştir.

Hormonlar: Üreme hormonlarının ve yağ dokudan salınan hormonların meme ve genital organların kanserleri üzerinde, yine bazı hormonların kolon kanseri üzerinde etkisi bildirilmektedir. Melatonin gibi bazı antioksidan özellikli hormonların da eksik olması yine kanserle ilişkilendirilmektedir.

Kronik travmalar: Mikrotravmalara uzun süre maruz kalma özellikle deri ve yumuşak doku kanserlerini tetikleyebilir. Ayrıca organların kronik inflamasyonu da zaman içinde kanser oluşumuna zemin hazırlayabilir [16].

1.1.3. Kanser epidemiyolojisi

Son yüzyılda gittikçe artan oranları ile kanser, günümüz dünyasının en büyük sağlık problemlerinden birisidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020 raporuna göre dünya genelinde hastalıklara bağlı ölümler arasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sıradadır. Dünya genelinde her 5 kişiden biri hayatının bir döneminde kanserle tanışmakta, her 6 ölümden biri de kansere bağlı olmaktadır. 2018 yılında dünyada 18,6 milyon hasta/yıl olan kanser tanısının 2040'da bunun iki katına ulaşması beklenmektedir [17].

Tüm dünyada en fazla tanı konan kanser türü %11,6'lık oranı ile akciğer kanseridir. Bunu çok yakın oranlarla meme kanseri (%11,4) ve kolorektal kanserler (%10,2) izlemektedir. Kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ise; birinci sırada yine %18,4'lük

oranı ile akciğer kanseri, ikinci sırada da %9,2'lik oranı ile kolorektal kanserler gelmektedir [17].

Türkiye'de 2009 yılında yapılan bir istatistikte; kanser insidansı erkeklerde %26,9, kadınlarda %17,3 olarak bulunmuştur. Bu oranlar dünya genelindeki rakamlar ile kıyaslandığında daha düşüktür. Kanser türlerinin görülme sıklığı ise diğer gelişmekte olan ülkeler ile benzerlik göstermektedir [18].

1.1.4. Kanser tedavisi

Kanser tedavisinde başvurulan temel tedavi yöntemleri kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlerle tümörlü dokunun çıkarılmasıdır. Bunun yanısıra hormon tedavisi, immunoterapi, kök hücre tedavisi, biyolojik tedaviler gibi daha yeni alternatif veya tamamlayıcı yaklaşımlar da mevcuttur. Kanser türleri farklılık göstermesi ve aynı tür kanserin bile her kişide farklı özellikler gösterebilmesi nedeniyle tedavi protokolleri de değişken olabilmektedir.

Cerrahi: Kanserli dokudan parça alınıp kesin tanının konması veya uzak metastazı olmayan uygun vakalarda, tümörün tamamen çıkarılması için başvurulan yöntemdir.

Kemoterapi: Çeşitli sitotoksik kimyasal ajanlarla normal hücreye oranla daha fazla bölünme özelliği gösteren tümör hücrelerinin öldürülmesi hedeflenir. Tümörün tipine ve evresine göre, tek başına veya cerrahi işlem öncesinde tümör boyutunun küçültülmesi amacıyla kullanılır. Tümör hücresi ile birlikte, nispeten daha çok bölünme özelliği gösteren sindirim epiteli, hematopoetik hücreler, üreme hücreleri ve kıl follikülleri de etkilenebilmektedir.

Radyoterapi: Kanserli hücrelerin bölgesel veya tüm vücuda iyonize ışınlar uygulanarak yok edilmesi esasına dayanır. Genellikle cerrahi işlem öncesinde tümörün boyutunun küçültülmesi hedeflenerek uygulanır. En sık gözlenen yan etkisi tümörlü hücre ile beraber sağlıklı hücrenin de zarar görmesi sonucu gözlenen halsizlik, bulantı-kusma, saç dökülmesi gibi durumlardır.

İmmunoterapi: Bağışıklık sistemini uyararak kanserli hücelere etki etmelerini hedefler. Bunun için çeşitli antikorlar veya sitokinler kullanılabilir. Adaptif T hüceleri ve monoklonal antikorlar en yaygın kullanılanlardır.

Hormon tedavileri: Vücutta doğal olarak üretilen veya sentetik olarak elde edilen bazı hormonların vücutta oluşturduğu sinyaller, duyarlı bazı kanser türlerinin büyümesini engellemekte etkili olmaktadır.

Kök hücre tedavisi: Kök hücre; vücutta hemen her hücreye farklılaşabilen, kendini yenileyebilen, istenilen bir hücreyi elde etmek için programlanabilen hücelerdir. Çoğunlukla kan ve kemik iliğini etkileyen kanserlerin tedavisinde kullanılır. Kök hüceler hastanın kendisinden (otolog) veya uyumlu bir başka kişiden (allojenik) elde edilebilirler [19].

1.2. Akciğer Kanseri

Tüm kanser türleri arasında dünya çapında en sık görülen ve güncel tedavi yaklaşımlarına rağmen, mortalitesi en yüksek olan kanser türüdür. Akciğerin bronş epiteli, daha az olarak da bronşiyal bezler, mezenkimal hüceler veya plevra endotelindeki mezotel hücelerinden köken alır. Akciğerde primer tümörlerin yanısıra, diğer organ kanserlerinin de en sık metastaz yaptığı organlardan biridir [20].

1.2.1. Akciğer kanseri etiyolojisi

Akciğer kanseri olgularının %90'ı direkt olarak sigara kullanımı ile ilişkilidir. Bu oran hem aktif hem de pasif içiciliği kapsar. Tüm akciğer kanseri alt tiplerinde sigara birincil etkidir. Sigaraya başlama yaşı, içme süresi, inhalasyon oranı, sigaradaki toksik madde miktarı, filtreli veya filtresiz oluşu, günde içilen sigara sayısı risk oranını belirler. Geriye kalan %10'luk kısım endüstriyel ve çevresel maruziyete bağlıdır. Burada ise risk faktörleri arasında; asbest, nikel, arsenik, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, krom, berilyum, radyasyon ve radon gazı maruziyeti sayılabilir [21]. Bu etkenlerin yanısıra kanser oluşumuna katkısı daha az olmakla birlikte ilişkisi kanıtlanmış benign akciğer hastalıkları mevcuttur. Bunların başında KOAH ve fibrotik akciğer hastalıkları yer alır [22].

1.2.2. Akciğer kanseri epidemiyolojisi

Akciğer kanseri tüm dünyada ve ülkemizde en sık görülen kanser türüdür. Ülkemizde tüm kanser olgularının %22,6'sını ve 1 yıl içinde tanı konan tüm kanser olgularının %12,3 'ünü oluşturur [23]. En fazla görüldüğü yaş aralığı 65-84 yaş olmakla birlikte; yaşın azalması ile insidansı düşmektedir [24]. Her yıl artan sigara kullanımı, karsinojenik maddeler ve çevresel toksinler nedeni ile dünya çapında insidansı artmakta olan bu kanser türünün, son yıllarda kadınlarda görülme oranı erkeklere oranla daha hızlı artmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre; 2018 yılında 18,1 milyon yeni kanser vakasının 2 milyonu akciğer kanseri idi. Yine kansere bağlı 9,6 milyon ölümün 1,8 milyonu bu kanser türüne bağlı idi [25]. Dünyada erkeklerde kansere bağlı ölüm nedenleri arasında 1. sırada, kadınlarda 2. sırada; ülkemizde ise erkeklerde 1. Sırada, kadınlarda ise 5. Sırada yer alır. Her yıl dünyada ortalama 1,38 milyon insan akciğer kanseri nedeniyle ölmektedir [16, 17].

1.2.3. Akciğer kanseri histopatolojisi ve türleri

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO)'nün 2004 yılında yayınladığı raporda akciğer kanseri histolojik sınıflaması şu şekildedir [26]):

- I. Preinvaziv lezyonlar
- II. Malign epitelyal tümörler
 - a. Skuamöz hücreli karsinom
 - Papiller karsinom
 - Berrak hücreli (clear cell) karsinom
 - Basaloid karsinom
 - b. Küçük hücreli karsinom
 - Kombine küçük hücreli karsinom
 - c. Adenokarsinom
 - d. Büyük hücreli karsinom
 - e. Adenoskuamöz karsinom
 - f. Sarkomatoid karsinom
 - Pleomorfik karsinom
 - İğsi hücreli karsinom
 - Dev hücreli karsinom
 - Karsinosarkom

- Pulmoner blastom
- g. Karsinoid tümör
- h. Tükürük bezi tümörleri
 - Mukoepidermoid karsinom
 - Adenoid kistik karsinom
 - Epitelyal-myoepitelyal karsinom
- i. Mezenkimal tümörler
- III. Benign epitelyal tümörler
- IV. Lenfoproliferatif tümörler
- V. Metastatik tümörler
- VI. Sınıflandırılmayan tümörler

Bu kompleks sınıflamanın yanı sıra klinik ve histopatolojik olarak en basit sınıflama akciğer kanserini ‘küçük hücreli’ ve ‘küçük hücreli dışı’ olmak üzere iki kategoriye ayırır.

1.2.3.1. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)

Tüm akciğer kanserlerinin %85’ini oluşturmaktadır. Temel olarak 3 alt sınıfta toplanır; epidemiyolojik çalışmalarda %43,8’i adenokarsinom, %37,5’i skuamöz hücreli karsinom, %1,8’i büyük hücreli karsinom iken %16,8’inde alt grup sınıflandırılması yapılamamıştır. Son yıllara kadar skuamöz hücreli karsinom en sık görülen alt tip iken son yıllarda adenokarsinom daha fazla görülmeye başlanmıştır; bu durumun kullanılan sigaranın tipinin veya çevresel kirlenici faktörlerin değişmesine bağlı olduğu düşünülmektedir [27]. Belirtileri genel olarak öksürük, dispne, iştahsızlık, halsizlik gibi nonspesifik belirtilerdir ve benign akciğer hastalıklarından ayırt edilemediğinden hastaların %75’i tanı konduğunda orta-ileri evrededir. Erken evre tanılar genellikle başka sebeplerle yapılan çeşitli tetkikler sırasında tesadüfen ortaya çıkan vakalardır. Tanı konduğunda tümör erken evrede ise cerrahi tedavi ile sağkalım nispeten daha yüksektir [28].

1.2.3.2. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)

Tüm akciğer kanserlerinin %15- 25’ini oluşturmakta ve düşük insidansına rağmen, tüm kansere bağlı ölümler sıralamasında beşinci sırayı almaktadır. Hemen tamamı sigara

kullanımına bağılı gelişmekte olup, tedavi olmadığında 2-4 aylık sağ kalım ile tüm akciğer kanser türleri arasında en agresif prognoza sahip olandır. Genellikle geç semptom verir; semptomlar akciğerdeki tümörün büyüklüğüne bağılı olarak değişen düzeyde; öksürük, hırıltılı solunum, dispne ve hemoptizi şeklinde olabilir. Eğer mediastene yayılım varsa; vena cava superior tıkanması veya ösefagus basısı gibi belirtiler, uzak organ tutulumu varsa tutulan organa özel belirtiler görülebilir. Ön tanısı genellikle geç evrede akciğer grafisinde görülen büyümüş kitle, çoğu zaman eşlik eden mediastinal tutulum görülerek konur. Küçük hücreli dışı akciğer kanserinden; yüksek büyüme ve metabolizma hızı, bölgesel lenf nodlarına ve uzak bölgelere erken yayılması, bunun yanında kemoterapi ve radyasyon terapisine daha duyarlı olması ile ayrılır [29, 30].

1.3. Akciğer Kanseri Güncel Tedavisi

Her iki tip akciğer kanseri de ağır sigara içicilerinden oluşan ortak bir popülasyonda görülmekle beraber, klinikleri oldukça farklıdır ve farklı yaklaşım gerektirirler. Küçük hücreli dışı tümörlerin birçoğuna (evre I, II ve IIIA'nın bir kısmı) cerrahi yaklaşım uygulanırken, küçük hücreli tümörlere hemen tüm evrelerde kemoterapi ve radyoterapi uygulanmaktadır [29].

Cerrahi: Akciğer kanseri tanısı konduğunda çoğunlukla birçok hasta cerrahi olma şansını kaybetmiş olmakla birlikte; özellikle uzak organ metastazının bulunmadığı erken evre küçük hücreli dışı akciğer kanserinin tedavisinde cerrahi altın standarttır. Güncel cerrahi teknikleri arasında çok daha az invaziv olan video-eşliğinde veya robot-eşliğinde torakoskopik cerrahiler yerini alırken, halen hastaların büyük bir kısmı torakotomi (açık göğüs cerrahisi) ile ameliyat edilmektedir. Eğer tümör akciğerin tek bir lobunda ise; 'lobektomi' adı verilen o lobun cerrahi olarak çıkarılması işlemi uygulanır. Eğer birden fazla lobda ise tek tarafı akciğer dokusu tamamen çıkarılabilir. Bu işleme 'pnömektomi' adı verilir. Tümör akciğere komşu dokulara yayılım göstermiş ise; beraberinde komşu dokular da çıkarılabilir [23, 30].

Kemoterapi: Özellikle KHAK; tanı konduğunda büyük ihtimalle yayılım göstermiş, en azından lokal olarak ilerlemiş olduğundan cerrahi müdahale mümkün olmamakta, hemen her zaman kemoterapiye başvurulmaktadır. Bunun dışında erken evre

olmayan KHDAK'de tümörü cerrahi edilebilir duruma getirebilmek için veya erken evrede cerrahi sonrası nüks oranını azaltmak için de kemoterapiye başvurulmaktadır. Tedavide; genellikle ikili ilaç kombinasyonları kullanılır ve kullanılan sitotoksik ajanın seçimi genellikle eşlik eden ek patolojisine (örneğin böbrek yetmezliği, kalp veya sinirsel bozukluklar vs) göre belirlenmektedir [31]. Kemoterapi tedavisinde başlıca; BCNU (Carmustine), Bleomycin, Busulfan, Carboplatin (Paraplatin), CCNU (Lomustin), Chlorambucil (Leukeran), Chlorodeoxyadenosine (Cladribine), Cis-platinum, Cytarabine (Ara-C), Cyclophosphamide (Endoksan) , Docetaxel (Taxotere), Etoposide (VP-16, VePesid), 5-Flourouracil (5-FU), Gemcitabine (Gemzaar), Ifosfamide (Haloksan), Methotrexate, Oxaliplatin (Eloxatin), Vinorelbine (Navelbine) gibi ilaçlar kullanılmaktadır [73].

Radyoterapi: Sınırlı bir alana uygulanabilen yüksek enerjili ışın tedavisidir. Hastalığın lokal olduğu ancak hastanın cerrahiye kaldıramayacağı düşünüldüğü durumlarda ilk tercih veya tümörün uzak metastaz yapmadığı ancak geniş lokal yayılım gösterdiği durumlarda cerrahi öncesi uygulanmaktadır. Cerrahiye uygun hastalarda cerrahi ile birlikte, cerrahi yapılamayan ileri evre hastalarda ise kemoterapi ile birlikte uygulama alanları vardır [23].

İmmunoterapi: Son yıllarda özellikle diğer tedavilerden beklenen verimin alınmadığı ileri evre akciğer kanseri hastalarında uygulanan, tümör hücresinin bağışıklık sistemine yabancı hücre olarak tanıtılmasını hedefleyen, ümit vadeden yeni bir yaklaşımdır. Pasif immunoterapide direkt olarak tümörü hedef alan monoklonal antikorlar vücuda verilirken, aktif immunoterapide hastanın kendi immün sisteminin tümöre karşı duyarlanması hedeflenir. Kemoterapi ve radyoterapiye oranla daha az yan etkisi olması ve bu tedavilerle istenilen sonuca ulaşılamayan vakalarda dahi tümör küçülmesini sağlaması en önemli avantajıdır [32]. İmmunoterapide PD-1 ve CTLA-4 ilaçları kullanılmaktadır [74].

1.4. İnsan Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücre Hattı A549

İnsan tümör hücrelerinden elde edilerek oluşturulan hücre hatları, kanser araştırmaları için oldukça değerlidir. A549 hücre hattı; adenokarsinoma tipi tümöral

dönüşüm göstermiş insan akciğer alveoler bazal epitel hücrelerinin kültürü ile oluşturulan hücre hattıdır. 1972 de D.J. Giard tarafından 58 yaşında, akciğer adenokarsinoma hastası bir erkeğin alveol epitel hücrelerinden kültür yöntemi ile oluşturulmuştur [33]. Bu hücreler hala günümüzde *in-vitro* akciğer kanseri araştırmaları için kullanılmaya, bugün medikal kullanıma başlanmış birçok güncel ilacın araştırmasında ve geliştirilmesinde katkıda bulunmuşlar ve bulunmaya devam etmektedirler [34].

1.5. Hücre Lipit Metabolizması

Lipidler; canlıların yapısında bulunan, suda çözünmeyen bir grup organik molekülün ortak ismidir. Uluslararası Lipid Sınıflandırma ve Adlandırma Komitesi; lipidleri şu şekilde sınıflandırmaktadır, yağ asitleri, gliserolipidler, gliserofosfolipidler, sfingolipidler, sterol lipidler, prenol lipidler, sakkarolipidler ve poliketidler [35]. Lipidler; hücre ve organizma düzeyinde birçok önemli role sahiptirler. Trigliceridlerin yapıtaşı olan yağ asitleri, temel olarak enerji depolanması için kullanılırlar. Fosfolipidler; steroller ve sfingolipidlerle birlikte biyolojik membranların temel yapısal bileşenlerini oluştururlar. Lipidler aynı zamanda ikinci haberciler ve hormonlar gibi yapılarda yer alarak, sinyal iletiminde fonksiyonel rol alırlar. Lipid metabolizmasındaki değişiklikler; hücre büyümesi, proliferasyonu, farklılaşması ve motilitesi gibi birçok hücre fonksiyonu etkileyebilir [36,37]. Birçok memeli hücresi yağları kandan serbest yağ asitleri veya düşük dansiteli lipoproteinler gibi proteinlerle kompleks şekilde alır. Bu lipidlerin kaynağı ya diyet kaynaklı ya da karaciğer ve adipositlerde dönüştürülmüş karbohidrat kaynaklı yağ asitleridir. Triaçilgliseridler ve kolesterol esterleri, endoplazmik retikulumdan tomurcuklanarak oluşan, lipid damlacıkları adı verilen düzenli intraselüler yapılar içinde depolanırlar. Bu yapılar; özel proteinler içeren bir fosfolipid ve sterol tabakası ile nonpolar lipidler içeren bir çekirdekte oluşur [38].

1.5.1. Kanser ve lipid metabolizması ilişkisi

Lipidler kanser oluşumu ve gelişimini çeşitli yönlerden etkileyebilirler. Kanser hücreleri yüksek proliferasyon hızına sahip olduğundan, oluşan membranları yapıtaşı olarak büyük miktarda lipitlere ihtiyaç duyarlar. Onkojenik sinyallerle adipoz dokuda yağ asidi sentezinin ve sentezlenen yağların mobilizasyonunun artması kanser hücrelerinin

ihtiyacı olan lipidlere ulaşmasını sağlar. Araştırmalar, kanser hücrelerinin normal hücrelere oranla daha fazla lipid damlacığı depoladıklarını göstermiştir [39]. Hücreler yağ ihtiyaçlarını iki temel kaynaktan sağlarlar; diyetle eksojen olarak ve *de novo* sentez yolu ile endojen olarak. Proliferasyon gösteren embriyonik hücreler büyük oranda *de novo* sentez yolunu kullanırken, normal yetişkin hücreleri eksojen yağ asitlerini kullanırlar. Ancak ilginç bir şekilde kanser hücrelerinin, eksojen yağ asiti kaynakları yeterli olsa dahi *de novo* lipid sentezini yeniden aktive ederek, embriyonik dokulara benzer şekilde lipid sentezleyebildikleri gösterilmiştir [40]. Birçok kanser türünde *de novo* yağ asiti sentezi için gerekli olan ATP sitrat liyaz (ACL), asetil-CoA karboksilaz (ACC) ve yağ asiti sentaz (FASN) gibi enzimlerin aktivitesinin arttığı bildirilmektedir [41].

Bu özellikler; tümör hücresine, büyüme ve proliferasyon, oksidatif ve enerji stresi altında hayatta kalma, redoks dengesinin sürdürülerek yüksek glikolitik oranın desteklenmesi gibi birçok yönden katkı sağlamaktadır. Bozulan diğer metabolik yollar gibi, lipid metabolizmasındaki değişikliklerin altında yatan sinyal yolları da geliştirilmekte olan kanser tedavisinin hedefleri arasındadır.

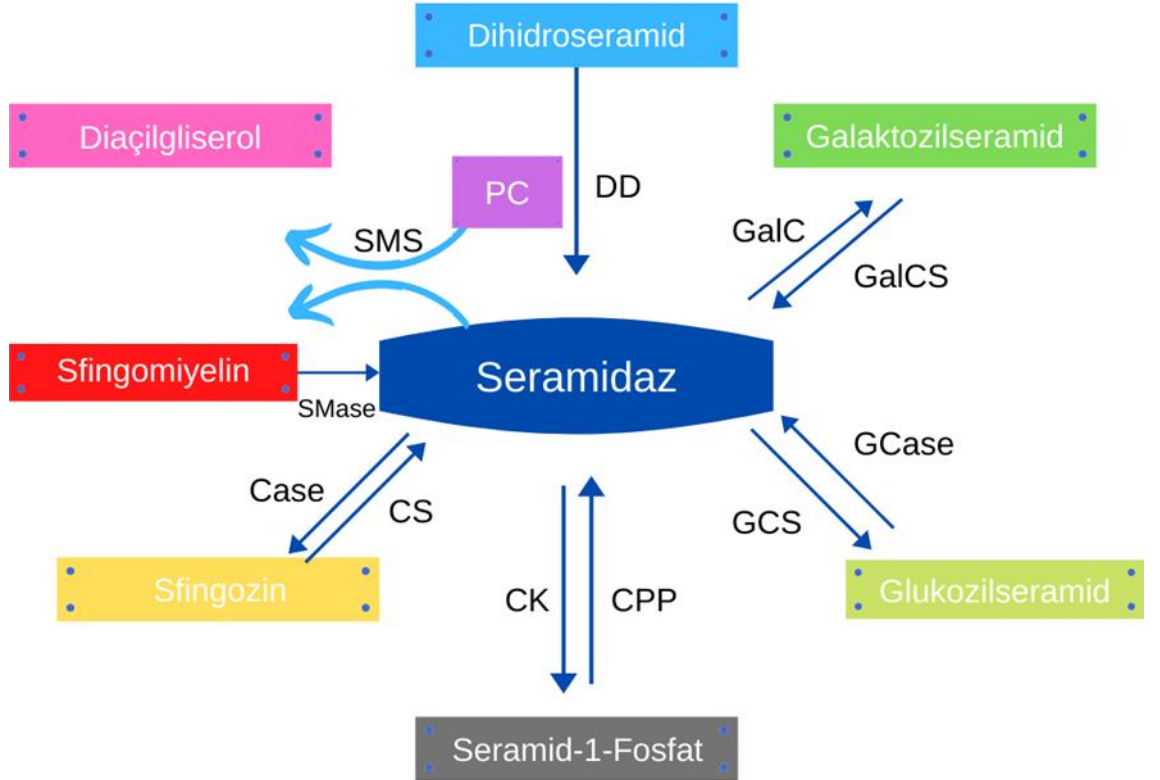
1.5.2. Sfingolipid metabolizması

Sfingolipidler; başlıca hücre membranında ve membranla bağlantılı organellerde (golgi, lizozom) bulunan, sfingozin içeren bir lipid sınıfıdır. Sfingomyelinler ve glikosfingolipidler olmak üzere iki türü mevcuttur. Sfingomyelinler; sfingomyelinaz enzimi ile seramidler ve fosfokolin'e hidrolize olur. Hücrede; endoplazmik retikulumda sfingolipid yapıda olmayan prekürsör moleküllerden *de novo* sentezlenirler. Fosfolipidler ve kolesterol ile birlikte hücre membranının temel yapısal bileşenlerini oluştururlar, membranın bariyer fonksiyonu ve akışkanlığının sağlanmasında önemli rolleri vardır.

Sfingolipid metabolizmasındaki anahtar rol oynayan enzimlerdeki mutasyonlara bağlı bozukluklar; hücrede sfingolipidlerin aşırı birikmesi ile sonuçlanan, sfingolipidozlar da denilen; Gaucher hastalığı, Farber hastalığı, Krabbe hastalığı ve benzeri lizozomal depo hastalıklarına yol açar. Bununla birlikte; sfingolipid metabolizmasında yer alan bazı enzim defektlerinin kanser oluşumu ile ilgisi saptanmıştır [42].

1.5.2.1. Seramidler ve kanserle ilişkisi

Seramid; sfingolipid metabolizmasının anahtar mediatörü olup tüm diğer sfingolipidler için öncül moleküldür. 18 karbon içeren (d18) bir sfingozin uzun-zincir bazından (LCB) oluşur. Hücre büyümesi/farklılaşması/yaşlanması, inflamasyon ve hücre içi sinyal yollarında önemli rolü vardır. En önemli özelliği; tümör hücreleri de dahil olmak üzere hemen her hücrede apoptozu tetikleyebilmesidir. Bu özelliği ile hücrel strese yanıtta ve sağkalımda önemli rolü vardır. Seramidler *de novo* yolla (seramid sentaz) veya sfingomiyelinazlar aracılığı ile; sitokinler, ısı şoku, büyüme faktörleri, D vitamini, TNF- α , CD95 / Fas, kemoterapötik ajanlar, toksin, radyasyon, UV-ışın gibi çeşitli stres uyaranlarına yanıt olarak üretilebilirler. Hücre içinde TNF- α 'nın etkilerine aracılık ettiği bildirilmektedir. Hücrede seramid düzeyindeki artış; direkt veya indirekt olarak, MAP kinazlar, seramid aktive edici serin/treonin fosfatazlar, protein kinaz C, fosfolipazlar ve bazı transkripsiyon faktörlerini de içeren, apoptozisin başlatılması ve devamında rolü olan birtakım enzim ve sinyal yollarını aktive eder [37, 43].



Şekil 1.2. Sfingolipid metabolizması.

Hücresel strese yanıt olarak seramidlerin sentezi ve/veya birikmesinin kanser hücrelerinde çeşitli mekanizmalarla hücre ölümünü sağladığı bilinmektedir. Bu mekanizmalar arasında; apoptoz, nekroptoz, otofaji ve endoplazmik retikulum stresinin indüklenmesi önemlidir. Bu seramid-aracılı hücre ölümü yollarının düzenlenmesi, hücre ve doku tipine, seramidin hücresel düzeyde lokalizasyonuna bağlı olarak değişkenlik göstermektedir [42]. Birçok insan tümör hücresi tipinde seramid düzeylerinin normalden düşük olduğu gösterilmiş ve malignitenin progresyonu ile de düzeyinin düşmeye devam ettiği bildirilmiştir. Bununla birlikte; birçok tümör baskılayıcı sinyalin de seramid üretimini uyardığı ve bu şekilde kanser hücrelerini apoptoza yönlendirdiği bilinmektedir. Bu nedenle antineoplastik tedaviye yeni yaklaşımlar getirmek için yapılan çalışmalarda, hücre içi seramid düzeylerini kontrol eden enzim yolları incelenmekte ve kullanılmaktadır [11].

1.5.3. Seramidaz inhibitörleri

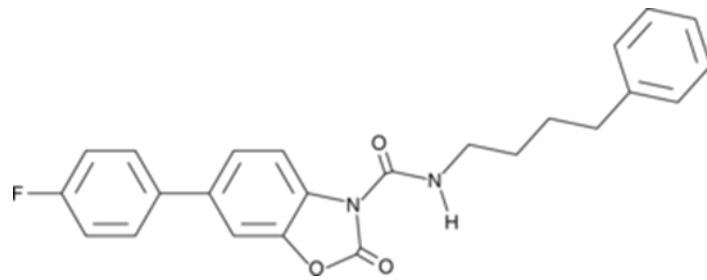
Seramidazlar; seramidlerin katabolizmasında yer alan bir grup lizozomal enzimin ortak adıdır. Seramid; seramidazlar yardımı ile sfingozin ve yağ asitine dönüştürülür (Şekil 2). Seramidazlar, başlıca 3 grup altında toplanırlar; asit seramidaz (AC), nötral seramidazlar (ASAH) ve alkalın seramidaz (ACER). Seramidaz genlerinde oluşan mutasyonlar sonucu enzimlerin regülasyonunun bozulması; inflamatuvar hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve tümörögenез ile ilişkili bulunmuştur [44]. Seramidazlar arasında hastalıklarla ilgisi en çok araştırılan, asit seramidaz'dır.

Asit seramidaz (AC, N-açilsfingozin, ASAH); seramidi sfingozin ve yağ asitine hidrolize eden bir sistein amidazdır. AC; hücredeki seramid düzeyinin belirlenmesinde rol alır ve bu lipid yapıdaki mediatörün hücrenin sağkalımı, büyümesi ve ölümü üzerine etkilerini düzenler [11]. AC'in genetik mutasyon sonucu eksik olmasına bağlı, eklem deformasyonları ve cilt altı nodüllerle karakterize olan Farber hastalığı ortaya çıkar [44]. Birçok tümör hücresinde AC'in yüksek düzeyde eksprese olduğu ve yine serumdaki düzeylerinin de arttığı bildirilmektedir. AC'in artışının kanserli hücrelerin ilaçlarla apoptoza götürülerek tedavi edilmesini de zorlaştırdığı; bununla birlikte AC aktivitesi azaltılabilirse tümörün tekrar kemoterapi ve radyoterapiye duyarlılığının arttığı gösterilmiştir [45].

AC'nin inhibisyonu, seramidlerin hücresele seviyelerini arttırdığından ve böylece sfingozin ve SIP seviyelerini düşürdüğünden, bu biyoaktif lipidlerin anormal düzeyleri ile ilişkilendirilmiş belirli kanser türleri ve inflamasyon da dahil olmak üzere birçok hastalıkta güncel tedavi stratejilerinde yer almaya başlamıştır. Bu gruba ait maddeler, tümörde bir çeşit kemo-duyarlılığı artırıcı etki oluşturarak antineoplastik ilaçlarla sinerjistik etki gösterirler. Bilimsel uygulamalarda çok az sayıda AC inhibitörünün adı geçmekle birlikte, ceranib 1 ve 2 gibi kemoterapinin etkisini güçlendirmek için tedavi protokollerine girmiş olanlar da mevcuttur [46].

1.5.3.1. ARN14974

Genişletilmiş moleküler yapı-aktivite ilişkisi çalışmaları sonucunda; benzoksazolon-karboksamid türevi maddelerin AC'in stabil ve sistematik olarak aktif inhibitörleri olduğu keşfedilmiştir. Bunlardan bir tanesi; 6-(4-fluorophenyl)-2-oxo-N-(4-phenylbutyl)-1,3-benzoxazole-3-carboxamide veya ARN14974'dir [47] (Şekil 3).



Şekil 1.3. ARN14974'ün moleküler yapısı

ARN 14974; AC aktivitesini inhibe ederek, hücrede sfingozin ve dihidroseramid seviyelerini düşürür. 0.1-20 mM arası konsantrasyonlarda kullanıldığında, SW403 adenokarsinoma hücrelerinde ve RAW 264.7 fare makrofaj hücrelerinde seramid düzeylerini artırdığı gösterilmiştir. *In vivo* olarak da farede; beyin, karaciğer, kalp, akciğerler ve böbrekleri de içeren birçok organda AC aktivitesini düşürdüğü, seramid seviyelerini artırdığı gösterilmiştir [48].

1.6. Apoptoz

1.6.1. Apoptozun morfolojisi

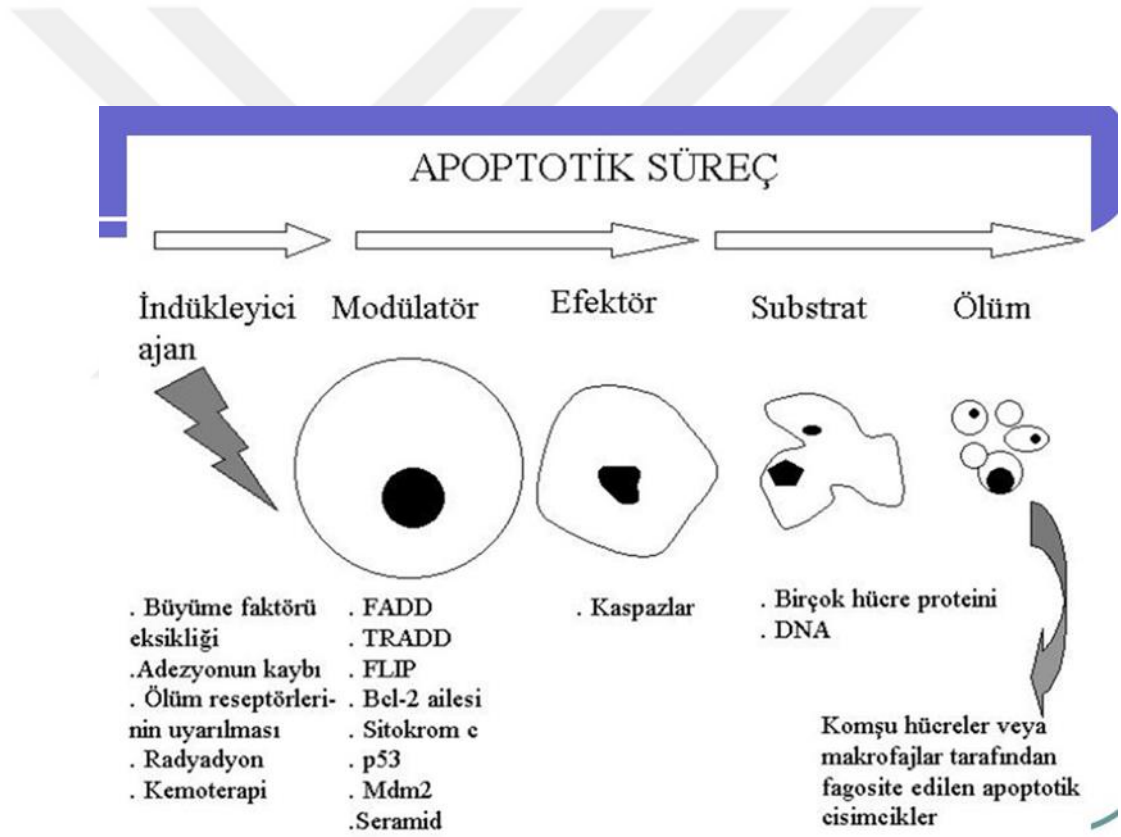
Yetişkin bir insan organizmasında birçok farklı tipte, toplamda ortalama 3.72×10^{13} hücre vardır. Bu hücre tiplerinin her birinin farklı yaşam süreleri vardır (örn; eritrositler 120 gün, nötrofiller 8-10 saat, hepatositler 150 gün, kortikal nöronlar yaşam boyu vs.) Bu kompleks yapıda; her gün 10 ile 100 milyar arası yeni hücre oluşur ve vücudun homeostazının sağlanması için aynı sayıda hücre yok olur [49].

Kerr ve arkadaşları; insan organizmasında iki tip hücre ölümü tanımlamışlardır; nekroz ve apoptoz. Nekroz genellikle vücuttaki bir inflamasyon veya infeksiyon durumunda görülür ve beraberinde immün sistem aktivasyonu oluşur. Nekroza uğrayan hücre şişer, plazma membranı yırtılır ve hücre içeriği dışarı boşalır. Apoptoziste ise hücre küçülür, plazma membranı bütünlüğü bozulmaz ancak buruşur, hücre bileşenleri hemen dışarıya salınmaz, çekirdekte bulunan yapısal proteinlerin yıkılması sonucu; çekirdek yoğunlaşır ve parçalanır. Apoptotik hücre; makrofajlar tarafından diğer hücrelerden ayırdedilebilecek apoptotik cisimciğe dönüşür. Apoptotik cisimcik; makrofajlar tarafından hızla fagosite edilerek hücre içeriğini dışarı boşaltması önlenir. Bu sayede inflamatuvar faktörlerin de aktive olması önlenmiş olur. Bu nedenle apoptoza 'temiz hücre ölümü' adı verilir (Tablo 2.1) [50].

Tablo 1.1. *Apoptoz ve nekrozun karşılaştırılması*

	Apoptoz	Nekroz
Neden	Fizyolojik veya patolojik	Patolojik
Hücre	Büzülme ve hücre-hücre temasının kaybı; makrofajlar tarafından fagositoz	Şişme, hücre yıkımı
Hücre zarı	Hücre bütünlüğü bozulmadan tomurcuklanma, geç aşamalarda apoptotik cisimlerin oluşumu	Bütünlüğün bozulması, geçirgenlik artışı
Çekirdek	Kromatin yoğunlaşması ve parçalanma	Kromatin yoğunlaşması ve parçalanma
Mitokondri	Membran değişiklikleri, şişme	Fonksiyon kaybı, şişme ve parçalanma
DNA	Endonükleaz-aracılı belirli uzunluktaki parçalara ayrılma (merdiven görünümü)	Genomik DNA'nın yaygın ve rastgele bozulması
Proteinler	Fosfataz, kaspas ve nükleazların aktivasyonu	Spesifik olmayan bozulma
Enerji	ATP bağımlı	ATP bağımsız
Doku cevabı	-Hedef hücre ile sınırlı -Fizyolojik değişiklikler tarafından başlatılır (kalsiyum, serbest radikaller, hormonlar vs.) - İnflamasyon yok	-Hücre grupları halinde etkilenir -Eksternal ve internal patolojik etkenler tarafından başlatılır - İnflamasyon var
Ölüm sonrası temizlik	Fagositoz	Fagositoz olmadan hücre yıkımı

Apoptozis; çoğunlukla fizyolojik şartlar altında gerçekleştiği için ona 'programlanmış hücre ölümü' adı verilir. Embriyogenez sırasında vücut şekillenirken, birçok hücre fazla ve gereksizdir. Bu hücreler gelişimsel sürecin bir parçası olan programlanma ile ölüme giderler. Ölen hücreler ise makrofajlar tarafından hızla tanınır ve yok edilir. Bu süreç, embriyoda parmak aralarının oluşumu, seksüel farklılaşma, sinir ağının oluşumu ve immün sistemin gelişimi gibi birçok durumda görülür [51]. Bununla birlikte organizmada apoptoz hayat boyu devam eder. Yaşlanan veya onarılamayacak düzeyde DNA hasarı oluşan hücreler, yine virüsle enfekte olmuş hücreler de bu yolla yok edilir ve yenilenirler. Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Apoptotik süreç

Memelilerin sisteminde ‘intrinsek’ ve ‘ekstrinsek’ olmak üzere iki tip apoptoz yolu tanımlanmıştır. İntrinsek yol; hücre içi uyarılar sonucu mitokondrinin aktive edilmesi ile başlatılırken, ekstrinsek yol; hücredeki ölüm reseptörlerinin hücre dışı uyaranlar tarafından aktiflenmesiyle başlatılır. Hücreye gelen hem intrinsek hem ekstrinsek sinyaller, kaspaslar adı verilen, kaskad şeklinde etkileşen özel sistein proteaz sistemini aktifler. Kaspas sisteminin aktivasyonu, sonuç olarak hücreyi makrofajlara sunarak fagosite edilmesini sağlar [49].

1.6.2. Apoptoz ve kanser ilişkisi

Apoptozun hücrelerde uygun şekilde gerçekleşmemesi, canlılarda oluşan birçok hastalıkla bağlantılıdır. Aşırı derecede oluşan apoptoz dejeneratif hastalıklara zemin hazırlarken, yetersiz düzeyde oluşan apoptoz ise neoplastik hastalıkların oluşumunda rol alabilmektedir. Normal yaşam sürelerinin sonunda veya normal dışı bir DNA hasarında apoptoza götürülemeyen hücreler, kanser hücresine dönüşme potansiyeline sahiptirler. Kanser hücrelerinin, hücrenin imha mekanizmalarını devre dışı bırakarak apoptozdan kaçındıkları ve böylece normal dışı şekilde hayatta kalmayı sürdürdükleri bildirilmektedir. Kanser hücreleri apoptozdan kaçınmayı, çoğunlukla antiapoptotik BCL-2/BAX protein ailesi üyelerinin aşırı ekspresyonu ve/veya proapoptotik BCL-2/BAX protein ailesi üyelerinin inhibe edilmesi yolu ile yaparlar. Yine tümöral dönüşüm gösteren hücrelerde; hücre yüzeyinde bulunan ve apoptozda rolü olduğu düşünülen TNF reseptör ailesine ait APO-1 (fas) reseptörünün işlevselliğini kaybettiği gösterilmiştir [53]. Bunun yanısıra; p53 gibi tümör baskılayıcı genlerin mutasyonu veya inaktivasyonu da benzer sonuçlar doğurmaktadır. P53 gen mutasyonuna özellikle akciğer kanseri türlerinde sık rastlanmaktadır, yine BCL-2 gen mutasyonu da özellikle küçük hücreli akciğer kanserinde %90'lara varan oranda görülmektedir (Tablo 2.2) [54]. İlave olarak; kanser hücreleri, apoptoza direnç sağlayan birtakım metabolik değişimlere de uğrarlar. Glikolitik yoldaki ve lipid metabolizmasındaki değişimler buna örnektir [55].

Tablo 1.2. Apoptozis ile bağlantılı genler

Apoptozisi Baskılayanlar	Apoptozisi indükleyenler
<ul style="list-style-type: none">• Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1• c-abl geni• ras onkogeni• p35• A20	<ul style="list-style-type: none">• Bcl-2 grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bad, bik, Hrk1Apoptozis ile bağlantılı genler • c-myc• p53, p21• fas (CD95/APO1)FADD/MORT, RIP, FAST• interlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (ICE)• LOH (MTS1/CDK41)

1.6.3. Sfingolipidlerin apoptoz ve kanser oluşumu ilişkisi

Tümörögenizde etkili olan hücre sel değişimlerin üzerinde lipidlerin de etkisi olduğuna dair kanıtlar son yıllarda artmaktadır. Hücre sel sfingolipid metabolizmasının apoptozis, hücre siklusu ve proliferasyonu ve yaşlanma süreçlerindeki rolüne yoğunlaşan çalışmalar, bu metabolizmada enzimsel düzeydeki değişimlerin apoptozisin baskılanması, kanser oluşum süreci ve kemoterapötik ajanlara direnç ile ilişkili olabileceğine dair kanıtlar sunmaktadır [55,57].

Sfingolipid yolağının ana metaboliti olan seramid; pro-apoptotik özelliği en iyi bilinen lipid formudur. Uzun yıllar önce Obeid ve arkadaşları tarafından endojen seramidin ve sentetik analogunun lösemi hücrelerinde apoptoza neden olduğu gösterilmiştir [57]. Daha sonra yapılan çalışmalarla da seramidin hücrede BCL-2 protein ekspresyonunu, protein kinaz sinyal yollarını etkilemesi gibi apoptoz üzerine etki mekanizmaları açıklığa kavuşmuştur [55]. Birçok apoptotik sinyal (örn; TNF, FAS ligand, Growth faktör yoksunluğu, DNA hasarlanması ürünleri vs.) hücrede seramid üretimini artırır [58]. Bu veriler ışığında, seramidin apoptozuz hem intrinsek hem ekstrinsek yolunu düzenlediği düşünülmektedir.

Kanserleşme sürecindeki hücrelerin apoptotik süreçten kaçma mekanizmalarından birisi de seramidin metabolize edilmesidir. Glukozilseramid sentaz (GCS) enzimi; seramidi glukozilseramid'e dönüştürür, seramid kinaz (CK) enzimi ise

seramid-1-fosfat'a dönüştürür (Şekil 2.2). Böylece seramidin neden olduğu apoptoz Böylece seramidin neden olduğu apoptoz engellenmiş olur. Seramidin GCS veya CK enzimleri ile metabolize edilmesinin önlenmesi; tümörögenezi baskılayacağı gibi, kanser hücrelerinin standart kanser terapilerine duyarlılığını da artırmaktadır [59].

1.6.4. Apoptoz tayin metodları

Işık Mikroskopisi: Kullanılan en eski morfolojik görüntüleme yöntemlerinden biridir. Hazırlanan doku kesitleri, hematoksilin-eozin ve/veya giemsa boyaları ile boyanarak hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve nükleustaki değişimler ortaya konabilir.

Floresan Mikroskopu/Lazerli Konfokal Mikroskop: DNA'ya bağlanabilen floresan boyalarla boyanan doku kesitlerinde nükleus daha kolay incelenebilir. Bu şekilde hücrede kromatin yoğunlaşması ve nükleus fragmentasyonu araştırılır.

Elektron Mikroskopisi: Elektron mikroskobu, biyolojik veya biyolojik olmayan örneklerin görüntülerini yüksek çözünürlüklü olarak incelenmesini sağlar. Araştırmalar da dokuların, hücrelerin, organellerin ve makromoleküler komplekslerin detaylı yapısını araştırmak için kullanılır. Hücrede plazma membranında kabarcıklanma, kromatin yoğunlaşması gibi morfolojik değişimlerin görülmesini sağlar. Ancak bazı erken evre morfolojik değişiklikler gözlenemeyebilir, ayrıca hücrelerin elektron mikroskopik incelemeye hazırlanması uzun zaman alan ve tecrübe isteyen bir süreçtir. Analiz sonrası incelenen hücreler hayatta kalamayacağı için, analizde son adım olarak kullanılmalıdır.

Geçirimli elektron mikroskopisi (TEM= Transmission Electron Microscopy); maddenin morfolojik özellikleri ile kristalografik yapısının aynı anda belirlenmesini sağlayan özel bir yöntemdir. Çok ince kesitler halinde hazırlanan bir numuneden geçirilen hızlandırılmış, yüksek enerjili elektronlar yolu ile görüntü elde edilmesi prensibine dayanır. Elde edilen üç boyutlu görüntülerin yorumlanması uzmanlık gerektirmektedir.

Proteomik ve Genomik Metodlar: DNA içeriğine veya kromatin bileşimine odaklanan yöntemler, apoptotik mekanizmaların DNA'yı homojen bir şekilde bozmasına dayanır. Bunlar içinde en sık kullanılan DNA jel elektroforezidir, apoptotik hücrede azalan DNA içeriğini belirler. Sitokrom-C veya kaspas düzeyini ölçen protein-bazlı

ölçüm yöntemleri de mevcuttur. Elektron mikroskopisi gibi invaziv olan bu yöntemlerde de işlem sonrası hücreler hayatta kalmaz.

Spektroskopik teknikler: Apoptoz tayini için kullanılan spektroskopik tekniklerin çoğu floresans yöntemine dayanır. Apoptozis markırları için floresant incelemeleri flow-sitometri, mikroskopi, mikroarray gibi çeşitli formatlarda okunabilir. Spektroskopik teknikler, immunokimyasal sınıflandırmaları yapmak için kullanılabilir. Apoptozis çalışmak için; annexin V boyaması, Tunnel analizi, mitokondri membran potansiyeli ölçümü gibi birçok spektroskopik teknik mevcuttur.

Flow Sitometri: Apoptoz tespiti veya doğrulamasında diğer birçok teknikle birlikte kullanılan ortak yöntemdir. Floresan madde ile işaretlenmiş bir antikor kullanılarak, apoptozise özel ortaya çıkan herhangi bir işaretleyici ortaya çıkarılabilir. Teknik olarak spektroskopik bir teknik olsa da yüksek sayıda hücre sayımı, bazı durumlarda hücrelerin sınıflandırılabilmesi, hücre analizine çok uygun bir yöntemdir. Bununla birlikte, belirli bir hücre grubu için sadece tek bir noktayı ölçebilir. Apoptoz uygulamalarında, hücre canlılığını ölçerek apoptotik hücrelerin oranı hakkında bilgi verir.

Kaspaz Aktivitesi Tayini: Kaspaslar apoptoz tarafından aktive edilen, kaskad halinde etki eden bir grup proteindir. Protein yapıları rastgele bozmaktan ziyade seçici olarak parçalayan bu ürünler, apoptoz için biyoışaretleyiler olarak kullanılır. Western blotting gibi yöntemlerle saptanabilirler.

Mikroakışkan Uygulamaları: Çoklu hücre gruplarında az sayıda hedef hücrenin yakalanmasında kullanılan bu tür cihazların çoğunda mikroakışkan, çip-üstü akış sitometrisi ile uygulanır.

Elektrokimyasal Metodlar: Ultra mikro elektrodlar kullanarak hücre içi elektriksel aktivitenin kaydını alabilen cihazlarla yapılır. Bazı peptidlerin yarılması hücre içi elektriksel sinyallerin azalmasına neden olur, bu durumun tespiti, apoptozis tayinine yardımcı olur. Elektrokimyasal yöntemlerin en büyük avantajı hassasiyeti, ucuz olması ve kullanım kolaylığıdır [60].

1.7. In Vitro Sitotoksosite Testi

In vitro sitotoksosite testleri; bir maddenin hücresel düzeyde toksisite derecesini ortaya koyabilmek amacıyla hücre kültürleri üzerinde yapılan testlerdir. Genellikle kanser araştırmalarında, ilaç taraması ve geliştirilmesi çalışmalarında, hayvan deneylerine alternatif olarak veya bunların öncesinde kullanılırlar. Ucuz olması ve çok sayıda örneğin kısa zamanda test edilebilmesinden dolayı, hayvan deneylerine göre daha avantajlıdır. Ayrıca toksisitesi kesinleşen maddeler hayvan deneylerinde kullanılmadan elenebilirler. Dezavantajları ise; her deneyde sadece bir tür hücre kullanılabilmesi ve in vitro hücre ortamının canlı organizmadakinden farklılıklar gösterebilmesidir [61].

Tetrazolyum Testleri (MTT, MTS, XTT, WST): Tetrazolyum tuzları; dışarıdan elektron alarak indirgendiklerinde renkleri değişime uğrayan bir grup tuzdur. Bu tuzları indirgeyebilme yeteneğine yalnızca aktif mitokondrisi olan canlı hücreler sahiptir. *In vitro* deneysel çalışmalarda, etkisi araştırılan toksik maddeye maruz bırakılan hücre kültürlerine daha sonra tetrazolyum tuzlarından biri eklenerek, spektrofotometrik olarak ortaya konulacak renk değişimine göre hücrenin canlılığına karar verilir. Hassasiyeti çok yüksek olmayan kolorimetrik bir yöntemdir [62].

LDH Enzim Salınım Testi: Tüm hücrelerin stoplazmasında bulunan LDH (laktat dehidrogenaz) enzimi, hücre ölümü ve bütünlüğünün bozulması ile hücre dışına çıkar ve kültür medyumuna salınır. Toksik maddeye maruziyet sonrası hücre dışına sızan LDH düzeyi ölçülür. LDH yarı ömrü kısa bir enzim olduğu için, bu test uzun süreli toksisite çalışmalarına uygun değildir.

Sülforadamine B Testi: Sülforadamine B testi (SRB), hücre bazlı çalışmalarda sitotoksisiteyi araştırmak amacıyla kullanılan yüksek maliyetli taramalar için tercih edilen bir yöntemdir. Hücresel protein içeriğinin ölçümüne dayanarak hücre yoğunluğunun saptanabilmesi amacıyla kullanılır. Hücrelerin 96 kuyucuklu plakalara ekimi yapılır. Belirlenen inkübasyon süresinin ardından, hücreler %10 (ağırlık / hacim) trikloroasetik asit ile sabitlenir. 30 dakika boyunca hücreler SRB boyası ile boyanır. Süre bitiminde fazla boya, birkaç tekrar ile %1 (hacim / hacim) asetik asit ile yıkanarak çıkarılır. Proteine bağlı boya, 10 mM Tris baz solüsyonunda çözündürülür bir mikropłaka okuyucu kullanılarak 510 nm'de ölçülür.

ATP Biyoluminesans Testi: Nükleotid adenozin trifosfat (ATP), biyolojik sistemlerde enerji değişiminde önemli bir rol oynar. Tüm metabolik olarak aktif hücrelerde bulunan ATP, hücrelerin canlı kalması ve uzmanlıklarını gerçekleştirme için gereklidir. ATP'nin ölçümü bu nedenle canlı süreçlerin incelenmesi için temeldir. Doğal olarak luminesans özelliği olan ve hücre içi bazı moleküllere bağlanan veya hücre içine girdiğinde aktiflenerek luminesans özellik gösteren maddeler kullanılarak hücrenin canlılığı hakkında bir kanıya varılabilir. Bu deneyler sırasında hücreler yıkıma uğramadığından, diğer testlerle birlikte uygulanabilme avantajına sahiptir. Dezavantajı ise diğer testlere göre daha pahalı olmasıdır [61].



2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan hücre serileri

Çalışmada kullanılan A549 insan küçük hücreli dışı akciğer kanser ve Beas-2B sağlıklı insan akciğer hücre hattı American Type Culture Collection'dan (ATCC) temin edilmiştir. Hücreler ATCC protokolüne göre çoğaltılıp -196 °C'de sıvı azotta stoklanmıştır.

2.1.2. Kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

ARN14974 (Cayman), Dimetil sülfoksit (DMSO), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyl tetrazolium bromid), Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), Fetal Bovine Serum (FBS), Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000 U/mL penisilin, 10mg/mL streptomisin), Tripsin-Etilendiaminotetraasetik asit (Tripsin/EDTA), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Sigma); Osmium tetraoksit, Glutaraldehit, Araldit, Propilen oksit, Uranil asetat, Kurşun sitrat (Electron Microscopy Science); Annexin V apoptosis detection kit (BD, Pharmingen, USA); firmalarından temin edilmiştir. 25 ve 75 cm²'lik flask (TPP, İsviçre); 96 ve 6 kuyucuklu plakalar (TPP, İsviçre); cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 mL hacimlerinde), pastör pipetler, enjektörler (10, 20 ve 50 mL hacimlerinde), steril falkon tüpler (15 ve 50 mL) (TPP, İsviçre); steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), kryotüp, yuvarlak lamel (Biolab) ve bakır grid (EMS) firmalarından temin edilmiştir. Agar(500g), Trikloroasetik asit (TCA), 10 mM tamponsuz Tris baz Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir.

2.2. Metod

2.2.1. A549 ve Beas-2B hücrelerinin çoğaltılması

Akciğer kanser hücreleri A549 ve sağlıklı akciğer hücre hattı Beas-2B hücreleri tüp içerisinde stok halinde buldukları sıvı azot tankından çıkarılıp, eriyen tüp içeriği %10 serum (Fetal Bovine Serum/FBS) içeren RPMI besi yerinin içerisine eklenerek, 1200 rpm'da 10 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından oluşan süpernatant kısım dökülüp pellet üzerine taze besi yeri eklenerek süspanse edilen hücreler kültür flasklarına alınarak 37 °C'de %5 CO₂ içeren ve uygun nem şartlarını sağlayan

inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübe süresi boyunca kültür flaskları Inverted mikroskop (Nikon Eclipse TS100, ABD) ile kontrol edilip hücre çoğalmaları takip edilmiştir. 2 günlük inkübasyon süresi sonunda yüzeyinin tamamı hücrelerle kaplanan flaskın içerisindeki besiyeri pipet yardımıyla atılıp, PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Flask içersine 1X tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek inkübatörde 5 dk boyunca hücrelerin flask tabanından kalkması beklenmiştir. Tabandan kalkan hücrelerin üzerine taze besi yeri eklenerek yeni flasklara bölünmüştür. Hücreler 6. Pasajdan sonra deneyde kullanılmıştır.

2.2.2. ARN14974'ün hazırlanması

Çalışmada ilaç olarak kullanılan ARN14974 maddesinden ana stok olarak DMSO'da 100 mM hazırlanmıştır. Ana stok üzerinden 400 µM'lık ara stok hazırlanmıştır. Ara stoktan plakaya en yüksek doz 100 µM olacak şekilde ilave edilmiştir.

2.2.3. MTT kolorimetrik sitotoksisite testi

96 kuyulu plaka içine tüm kuyulara eşit miktarda besi yeri konulup üzerine ARN14974=BOC maddesinden en yüksek doz 100 µM olacak şekilde (100-50-25-12.5-6.25 µM konsantrasyon aralığında) seri dilüsyon yapılmıştır. Her kuyuya 5000 hücre ekilip 24, 48, 72 saatlik periyotlarda 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübe süresi bitiminde plakadaki her kuyuya 20 µL MTT (5mg/mL) boyası eklenip 4 saat boyunca tekrar inkübe edilmiştir. Bu sürenin bitiminde canlı hücrelerin oluşturduğu kristallenmeyi çözmek amacıyla her kuyuya 100 µL SDS eklenerek 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda plaka optik yoğunluğu (absorbans) spektrofotometrede 570 nanometre dalga boyunda okutulmuştur. ARN14974=BOC ile muamele edilmeyen hücre grubu kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Her doz için ayrı ayrı canlılık değerleri kontrol grubuna göre hesaplanıp uygulanan maddenin A549 hücreleri ve Beas-2B hücreleri üzerindeki IC₅₀ konsantrasyonu zamana bağlı olarak bu canlılık değerleri kullanılarak GraphPad Prism 6.0 programı ile hesaplanmıştır.

2.2.4. Sulforhodamine B metodu

96 kuyulu plakanın her bir kuyucuğuna kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıp 100 µL besi yeri eklenmiştir. Hücrelerin adaptasyonu için 24 saat boyunca plaka inkübasyona bırakılmıştır. Süre bitiminde her kuyucuğa belirlenen doz aralığında ARN14974 maddesi eklenip 24,48,72 saat periyotlarında plaka inkübatöre bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda her kuyudaki hücreler 50 µL %10'luk Trikloroasetik asit (TCA) ile fikse edilmiştir. Bu işlemden sonra plaka 5 defa distile su ile yıkanmıştır. Hücre popülasyonunu ölçebilmek için hücreler %1'lik asetik asit içinde SRB ile boyanmıştır. Hücrelere bağlanan boya muamele süresi bitiminde 10 mM Tris bazı solüsyonunda çözündürülmüştür. Plakanın optik yoğunluğu 530 nm'de ELISA "microplate" okuyucusunda (HTX Biotek, USA) ölçülmüştür.

2.2.5. ATP canlılık testi

A549 ve Beas-2B hücreleri 5×10^3 kuyu başına olmak üzere 96 kuyucuklu hücre kültür kablarına ekilmiştir. Belirlenen doz aralığında (100-50-25-12.5-6.25 µM) ARN14974 24 saat süresince bu hücrelere uygulanmıştır. Deney grubu ve kontrol grubu hücrelerdeki ATP miktarı lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometrede (Bio-Tek, USA) ölçülmüştür. Deney ve kontrol hücrelerinden elde edilen rölatif ışık ünitesi değerlerine göre örneklerin canlılığı yüzde değerler olarak aşağıda yer alan formül ile hesaplanmıştır.

$$\text{Canlılık (\%)} = [100 \times (\text{Örnek RLU}) / (\text{Kontrol RLU})]$$

2.2.6. Konfokal mikroskopi yöntemi

2.2.6.1. Hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopi yöntemi ile tayini

A549 ve Beas-2B hücrelerinin, hücre içi yapılarındaki değişiklikleri inceleyebilmek için 6 kuyulu plakalara, steril lameller üzerine her kuyuda 3×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılarak deney kuyuları ARN14974 maddesinin IC₅₀ konsantrasyonları ile 24 saat süresince inkübe edilmiştir. Kontrol kuyuları hiçbir madde uygulanmadan inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda kuyulardaki besi yeri uzaklaştırılıp hücreler PBS ile yıkanmıştır. Ardından gluteraldehit kullanılarak hücreler 15dk. fikse edilmiştir. Bu işlemleri takiben hücrelerin çekirdek morfolojilerini

görüntüleyebilmek için akridin oranj, hücre iskeletlerini görünür kılabilmek için de falloidin ile ikili boyama uygulaması gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar konfokal mikroskop (Leica TCS-SP5 II, Germany) kullanılarak görüntülenmiştir.

2.2.7. Geçirimli elektron mikroskopi yöntemi

2.2.7.1. Geçirimli elektron mikroskopunda A549 ve Beas-2B hücrelerinin takibi

A549 ve Beas-2B hücrelerinin ince yapısal değişikliklerini incelemek için geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. 1×10^6 /mL yoğunluğundaki A549 ve Beas-2B hücreleri ile deney ve kontrol grupları oluşturulmuştur. Her grup için üçer tekrarlı olacak şekilde toplamda 12 steril flask kullanılmıştır. Deney grupları, ARN14974'ün IC₅₀ konsantrasyonu ile 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grupları ilgili madde ile muamale edilmeden 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda flask içindeki hücreler gece boyu +4 °C'de glutaraldehit ile fikse edilmiştir. Fikse edilen hücreler tampon ile yıkandıktan sonra osmium tetraoksit (OSO₄) ile ikincil fiksasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlemlerin ardından hücrelere çeşitli etil alkol oranlarında (%50, %70, %90, %96 ve absöü etil alkol) dehidrate işlemi uygulanmıştır. Hücrelerin şeffaflaştırılma işlemi için propilen oksit kullanılmıştır. Şeffaflaştırma sonrasında hücreler resin ile bloklanarak 48 saat, 60°C'de etüv içerisinde polimerasyonu sağlanmışır. Bakır gridler üzerine bloklardan 80-100 nm'lik kesitler alınarak sitrat ve uranil asetatda boyama işlemi yapılmıştır. Geçirimli elektron mikroskobu (Biotwin FEI, Germany) ile kesitler görüntülenmiştir.

2.2.8. Akış sitometri yöntemi

2.2.8.1. Akış sitometrisinde anneksin V-FITC ve PI boyama yöntemi

Sağlıklı hücrelerde hücre membranının iç yüzeyinde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Hücre apoptoza giderken PS molekülleri membranın iç yüzeyinden dış yüzeyine doğru geçer. Bu yer değişim hücrenin erken apoptoza gittiği durumlarda görülür. Anneksin V proteinin PS'ye bağlanabilme özelliğinden dolayı floresan bir madde ile işaretlenerek apoptoza giden hücre görünür hale getirilebilir.

Anneksin V ve PI boyama yöntemi için ilk olarak 6 kuyulu plakaya her bir kuyu için 5×10^5 hücre ekimi yapılmıştır. Ekimi yapılan hücreler 24 saat boyunca inkübasyona

bırakılmıştır. İlgili sürenin sonunda deney kuyularına ARN14974'ün IC₅₀ konsantrasyonları ile muamele yapılmıştır. Tekrardan plaka 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ardından plaka içersindeki hücreler 2 kez PBS ile yıkanarak santrifüjlenmiştir. Santrifüjlenen hücrelerin 1 mL içersindeki sayısı hesaplanmıştır. Her bir akış sitometri tüpüne 100 µL hücre süspansiyonu eklenmiştir. Üzerlerine 100 µL Muse™ Annexin V solüsyonu eklenmiştir. Tüpleri orta hızda 3 ila 5 saniye boyunca vorteksleyerek tüp içeriklerinin iyice karışması sağlanmıştır. Karanlıkta ve oda sıcaklığında 20 dakika boyunca örneklerin inkübasyonu yapılmıştır. Sonuçlar (Muse™ Cell Analyzer Merck, Millipore, Hayward, California, USA) cihazında analiz edilmiştir.

2.2.8.2. Akış sitometride kaspaz 3/7 analizi

Hücreler 6 kuyucuklu plakalara ilgili IC₅₀ değerlerine göre 24 saat kültüre edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler PBS ile yıkanarak santrifüjlenmiştir. 50 µL'lik hücre süspansiyonunun üzerine Muse™ Kaspaz-3/7 Reaktif çalışma solüsyonundan 5 µL her tüpe eklenmiştir. Tüpler 3 ile 5 saniye boyunca vortekslenmiştir. Tüpler %5 CO₂ içeren 37 ° C inkübatörde 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Sonraki aşamada tüplere Muse™ 7-AAD solüsyonundan 150 µL eklenmiştir. Tekrar vorteks işleminden sonra tüpler oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 5 dk bekletilmiştir. Sonuçlar (Muse™ Cell Analyzer Merck, Millipore, Hayward, California, USA) cihazında görüntülenmiştir.

2.2.8.3. Akış sitometride hücre döngüsü analizi

A549 ve Beas-2B hücrelerinin DNA analizini yapabilmek için hücreler 24 saat boyunca ARN14974 maddesinin IC₅₀ konsantrasyonlarına maruz bırakılmıştır. Hücreler toplanıp ayrı tüplerde santrifüjlenmiştir. Oluşan süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve tripsinli tampon solüsyonundan her tüpe ayrı ayrı 250 µL ilave ederek tüpler 3 saniye vortekslenmiştir. 200 µLRNAaz enzimi kullanarak RNA uzaklaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüplere 200 µL Propidyum iyodür (PI) boyası ilave edilmiştir. Tüpler buzdolabında ve ışıksız ortamda 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. 50 µm lik filtreden geçirilen hücre örneklerinin akış sitometri cihazında (Muse™ Cell Analyzer Merck, Millipore, Hayward, California, USA) analizi gerçekleştirilmiştir.

2.2.8.4. Akış sitometride mitokondriyal zar potansiyelindeki değişikliklerin incelenmesi

Mitokondri hücresel enerji dengesini koruyan önemli hücresel organellerdir. Serbest radikallerin üretimi ve apoptoz gibi hücre ölümü süreçlerinin anahtar düzenleyicilerini içerir. Mitokondriyal membran potansiyel değişiklikleri apoptoz, nekrotik hücre ölümü ve kaspaz bağımsız hücre ölümünde görev almaktadır. Yüksek membran potansiyeli, sağlam mitokondrinin iç membranında mitopotansiyel boya birikimine yol açar ve bu da yüksek flüoresansa neden olur. Mitopotential kit sayesinde, mitokondriyal işlevi olmayan ölü hücreler kırmızı floresana neden olurken yaşayan hücreler sarı-turuncu floresana neden olur. Bunları tespit etmek için de 7-AAD kullanılır.

Protokole uygun olarak, hücreler ARN14974 maddesinin hücrelerin %50 sini öldüren doz ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Muamele süresinden sonra hücreler tripsin ile kaldırılarak santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım uzaklaştırılıp besiyeri eklenmiştir. 100 µL hücre örneklerinin üzerine 95 µL MitoPotential çalışma solüsyonu eklenmiştir. Örnekler 30 dakika boyunca inkübatöre bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda örnekler üzerine 5 µL Muse MitoPotential 7-AAD reaktifi eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar, hücre analiz cihazı (Muse™) kullanılarak analiz edilmiştir.

2.2.9. Yara iyileşme deneyi

Yara iyileşme deneyi araştırmacının, hücre göçünü ve hücre-hücre etkileşimlerini inceleyebilmesine olanak sağlar. Deneyde bir boşluk (yara) yaratılır ve bu boşluğun hücrelerin göç edebilme özelliğine bağlı olarak hücrelerin boşluğun merkezine doğru göç ederek yaranın iyileşmesi izlenir. Genel anlamda yara iyileşme deneyi bir hücre popülasyonunun koordineli hareketini incelemek için kullanılır. Yani hücreler boşluğa göç edecek ve aynı zamanda çoğalacaktır. İstenen sonuç ise kanserli hücrelerde bu proliferasyonu baskılamaktır.

Flaska ekilen hücreler %80 yoğunluğa ulaşıncaya tripsin ile kaldırılır. Hücre sayım işleminin ardından 6 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 5×10^5 hücre ekilir. Üzeri hesaplanan miktarda besi yeri ile tamamlanır. Bir gün boyunca inkübasyona bırakılıp süre bitiminde tüm besi yeri çekilip atılır. 6 kuyunun tümü steril pipet ucu ile düz bir hat olacak şekilde her bir kuyucuğun tam ortasından kazınır. Hasarlı veya ölü hücre kalıntılarını temizlemek için kuyular 1X PBS ile yıkanmıştır. Deney kuyuları ARN14974'ün IC50 değerleriyle muamele edilir. Deney bitiminde plaka inverted mikroskobuna konulup

fotoğrafları çekilir. Bu sıfıncı saat olarak kayıtlara geçirilir. İlk 12 saat, bir saat aryla görüntü alınır. Daha sonra deneyin 24-48-72 saatlerinde de görüntü alınıp analiz edilir.

2.2.10. Yumuşak agar koloni oluşum deneyi

Sağlıklı hücreler, ankraj bağımlı (hücrelerin yalnızca cam veya plastik gibi bir yüzeye bağlandığında yaşamını sürdürebilme özelliği) hücrelerdir. Ankraj bağımlı hücreler ancak katı bir yüzeye bağımlı olarak büyüyüp bölünebilirler. Bu hücreler büyüyebilmek ve bölünebilmek için hücre dışı matris temasına bağılı olmalıdırlar. Normal hücrelerin anoikis (ankraj bağımlı hücrelerde çevredeki hücre dışı matrsten ayırdıklarında meydana gelen programlanmış hücre ölümü şekli) terimi ile ifade edilen belirli bir apoptotik ölüm sayesinde ankraj bağımsız büyümeleri önleniyor. Bunun aksine kötü huylu/transforme edilmiş hücreler bir yüzeye bağlanmadan çoğalabilme yeteneğine sahiptir. Kötü huylu hücrelerde ankraj bağımsız (katı yüzeyden bağımsız büyüme) hücreler olarak isimlendirilir ve karsinogenezin ayırt edici özelliğidir. Yumuşak agar koloni oluşumu deneyi, hücre farklılaşması, transformasyonu ve tümörjenezin yanı sıra anti-tümör tedavisinin etkinlik değerlendirmesine yönelik araştırmalar için geniş çapta kullanılmaktadır.

6 kuyulu petri kabına ilk olarak kuyuların alt katmanlarını kaplamak için 1:1 oranında %1'lik agaroz hazırlanıp kuyulara ilave edilip donması beklenmiştir. Her kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde yine 1:1 oranında karıştırılmış %10 PBS içeren RPMI ve %0,6'lık agaroz karışımı alt tabaka olan donmuş ağarın üzerine eklenmiştir. Kuyularda hava kabarcıklarının oluşmaması için dikkatli çalışılmalıdır.

Deney kuyularına hesaplanan miktarlarda ilaç uygulaması yapılmıştır. Bu deney 20 gün süre ile devam ettirilmiştir ve haftada 2 defa üst besi yeri taze besi yeri ile değiştirilmiştir. 20 gün sonunda kuyucuklar %0,005'lik kristal viole ile muamele edilmiş ve 20 dk bekletilmiştir. Boyama sonrasında oluşan koloniler mikroskop yardımı ile incelenmiştir.

2.2.11. İstatiksel analiz

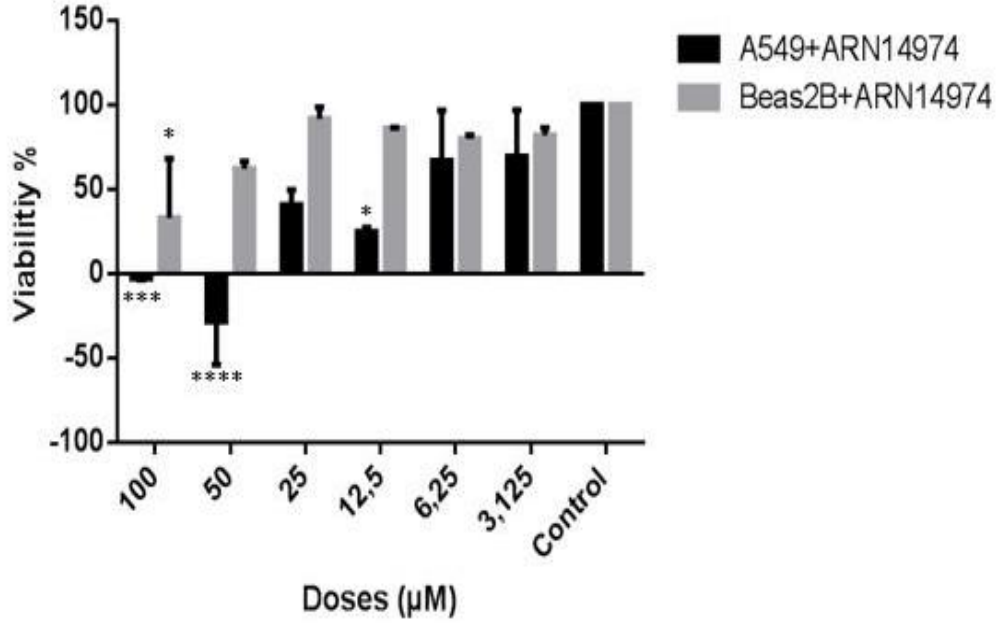
GraphPad 9.0 programı kullanılarak sitotoksisite test sonuçları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilmiştir. Tüm testler $p < 0,05$ anlamlılık düzeyinde analiz edilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. MTT Kolorimetrik Sitotoksisite Testi

3.1.1. ARN14974 'ün A549 ve Beas-2B hücreleri üzerindeki sitotoksisite bulguları

ARN14974'ün çeşitli konsantrasyonları (100-50-25-12,5-6.25 μ M) insan akciğer kanser hücre hattı A549 ve insan sağlıklı akciğer hücre hattı Beas-2B hücreleri üzerinde 24 saat MTT yöntemi ile muamele edilerek, bu hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi belirlenmiştir. ARN14974'ün A549 hücre hattı üzerindeki canlılık yüzdeleri kontrol grubu ile kıyaslandığında ARN14974 konsantrasyonu arttıkça deney grubundaki hücrelerin canlılığı doza bağlı olarak belirgin bir şekilde azalmıştır. Canlılığın en fazla azalma gösterdiği konsantrasyon değeri 50 μ M olarak gözlemlenmiştir. Deneyde A549 hücreleri ile karşılaştırılmak için kullanılan sağlıklı Beas-2B hücrelerinde ise, ARN14974'ün sağlıklı akciğer hücrelerinin proliferasyonunda düşük miktarda azalmaya sebep olduğu ancak aşırı şekilde sitotoksik bir etki oluşturmadığı belirlenmiştir. Tekarlı deneyler sonucunda, Microsoft Office Excel programı ile hücrelerin canlılık değerleri belirlenmiştir. GraphPad 8.0.1 programı ile bu canlılık değerlerini gösteren Şekil4.1'deki grafik oluşturulmuştur. Excel programı ile hesaplanan canlılıklar sonucunda A549 hücrelerinin IC₅₀ değeri 35,36 μ M bulunmuştur. Beas-2B hücrelerinin IC₅₀ değeri ise 35,11 μ M olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar doğrultusunda ARN14974'ün A549 hücreleri üzerinde antiproliferatif ve sitotoksik etkisi olduğu saptanmıştır. Aşağıda verilen Şekil 4.1.'de ARN14974'ün A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde 24 saatlik uygulaması sonucu elde edilen % canlılık konsantrasyonu ve anlamlılık değerini göstermektedir.



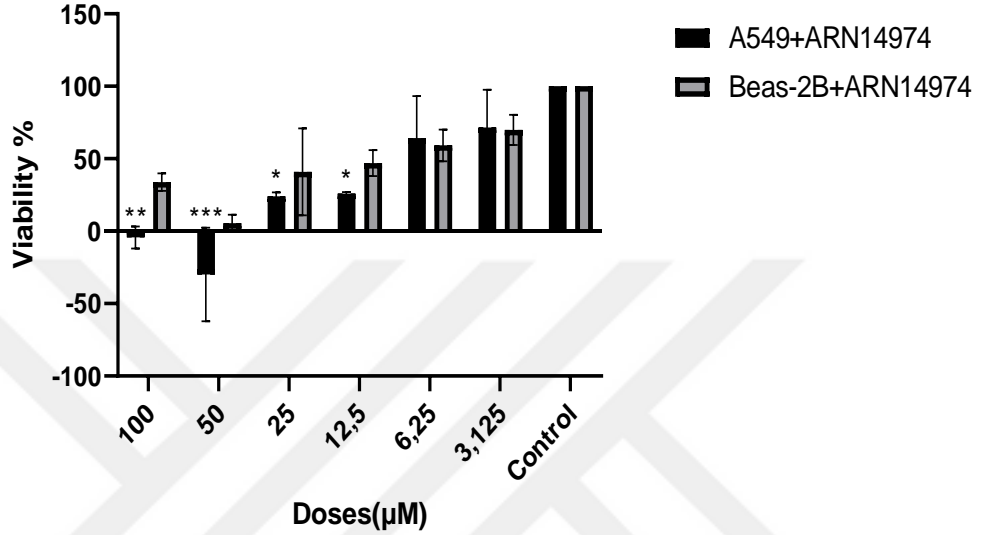
Şekil 3.1. ARN14974'ün, insan akciğer kanser hücresi A549 ve sağlıklı insan akciğer hücresi Beas-2B ile 24 saatlik MTT muamelesi sonucu elde edilen canlılık grafiği

3.2. Sulforhodamine B Sitotoksosite Testi Bulguları (SRB)

3.2.1. ARN14974'ün A549 ve Beas-2B hücreleri üzerindeki sitotoksosite bulguları

A549 ve Beas-2B hücreleri ARN14974'ün farklı konsantrasyonlarıyla (100-50-25-12,5-6.25 µM) 24 saat boyunca muamele edilmiştir. İlaçla muamele edilmeyen hücreler A549 kontrol ve Beas-2B hücreleri kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. SRB yöntemi ile ARN14974'ün ilgili hücreler üzerindeki sitotoksitesini ölçülmüştür. A549 hücrelerinin hücre protein kütle yüzdesinde doza bağımlı olarak anlamlı bir oranda azaldığı görülmüştür. En fazla azalmanın 100-50 µM konsantrasyon aralığında olduğu belirlenmiştir. Deney sonucunda hücrelerin IC₅₀ değerleri Microsoft Office Excel programında hesaplanarak bulunmuştur. A549 hücre hattının IC₅₀ değeri 34,2 µM Beas-2B hücre hattının IC₅₀ değeri 64,25 µM olarak bulunmuştur. GraphPad PRISM 9.01 programı kullanılarak uygulanan konsantrasyon aralığında, hücre protein kütle miktarının anlamlılık değeri analiz edilmiştir. ARN14974'ün A549 insan akciğer karsinoma hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı olarak yüksek oranlarda canlılıkta azalma görülmüştür. Beas-2B sağlıklı akciğer hücrelerinde canlılık oranlarında ciddi bir

azalma görülmemiştir. Aşağıda verilen Şekil 4.2.'de ARN14974'ün A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde 24 saatlik uygulaması sonucu elde edilen % canlılık hücresel protein kütle miktarı ve anlamlılık değerini göstermektedir.



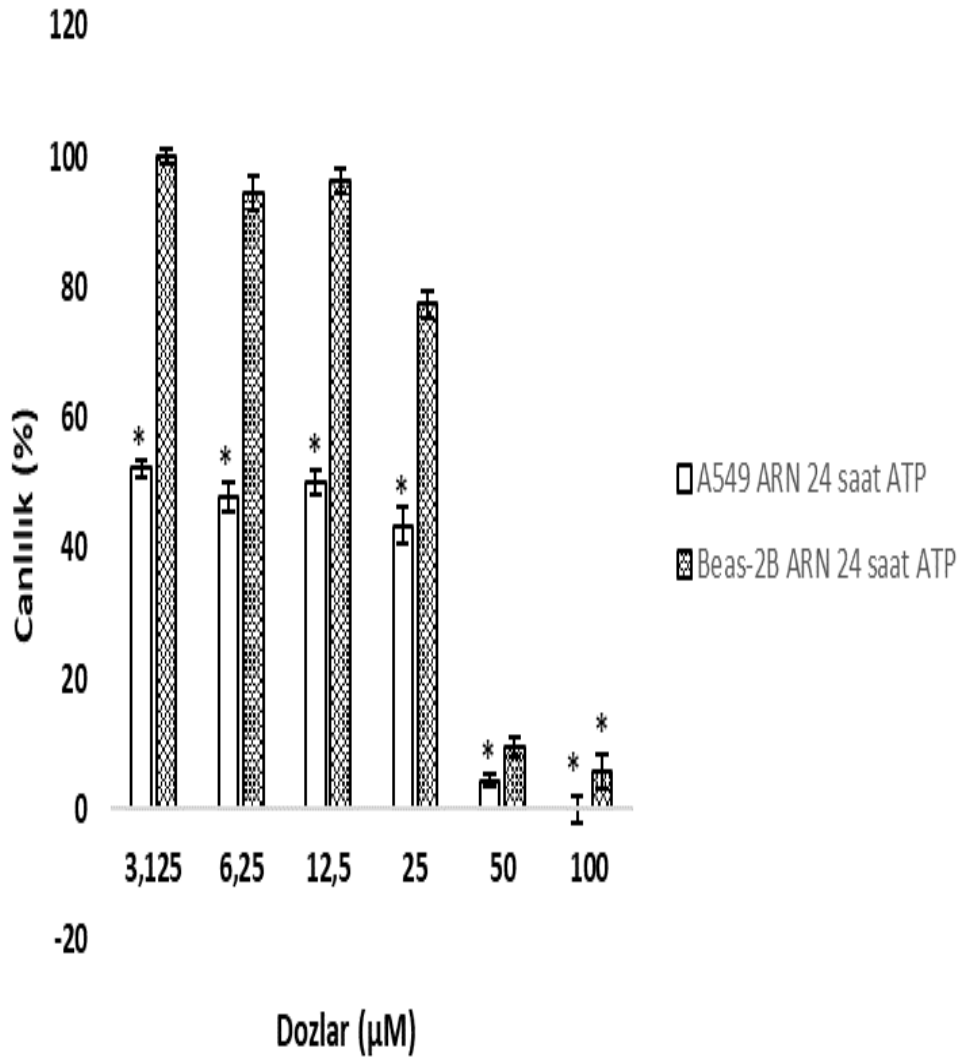
Şekil 3.2. ARN14974'ün, insan akciğer kanser hücresi A549 ve sağlıklı insan akciğer hücresi Beas-2B ile 24 saatlik SRB muamelesi sonucu elde edilen canlılık grafiği

3.3. ATP sitotoksosite bulguları

3.3.1. ARN14974'ün A549 ve Beas-2B hücre hatları üzerindeki sitotoksosite bulguları

A549 ve Beas-2B hücreleri 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildikten sonra, ARN14974=BOC tedavisi, belirlenen doz aralığında (100-50-25-12,5-6.25 µM) 24 saat uygulanmıştır. Deney sonucunda hücrelerin IC₅₀ değerleri Microsoft Office Excel programında hesaplanarak bulunmuştur. A549 hücre hattının IC₅₀ değeri 12,50 µM Beas-2B hücre hattının IC₅₀ değeri 35,7 µM olarak bulunmuştur. GraphPadPRISM 9.01 programı kullanılarak uygulanan konsantrasyon aralığında, anlamlılık değerleri analiz edilmiştir. ARN14974'ün A549 insan akciğer karsinoma hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı olarak yüksek oranlarda canlılıkta azalma görülmüştür. Beas-2B sağlıklı akciğer hücrelerinde canlılık oranlarında sadece

25-50 μM konsantrasyon aralığında ciddi azalma görülmüştür. Aşağıda verilen Şekil 4.3.'de ARN14974'ün A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde 24 saatlik uygulaması sonucu elde edilen anlamlılık değeri gösterilmektedir.

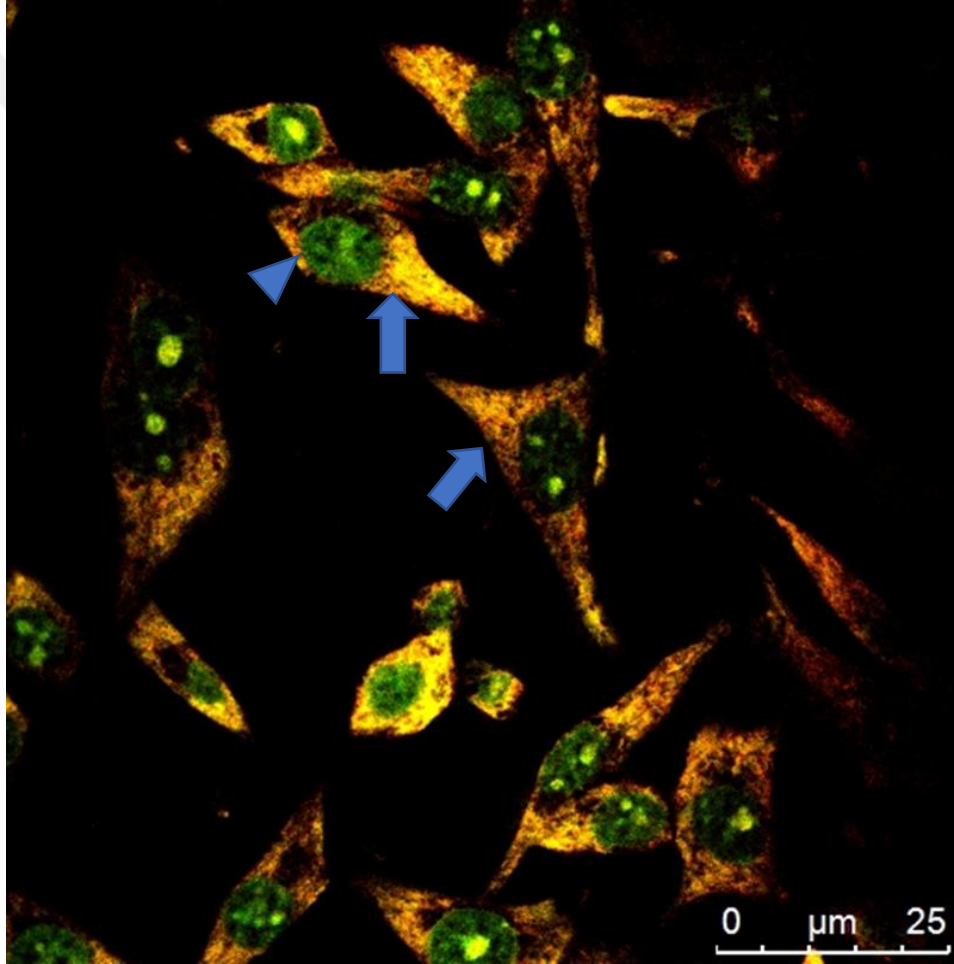


Şekil 3.3. ARN14974'ün, insan akciğer kanser hücresi A549 ve sağlıklı insan akciğer hücresi Beas-2B ile 24 saatlik ATP muamelesi sonucu elde edilen canlılık grafiği

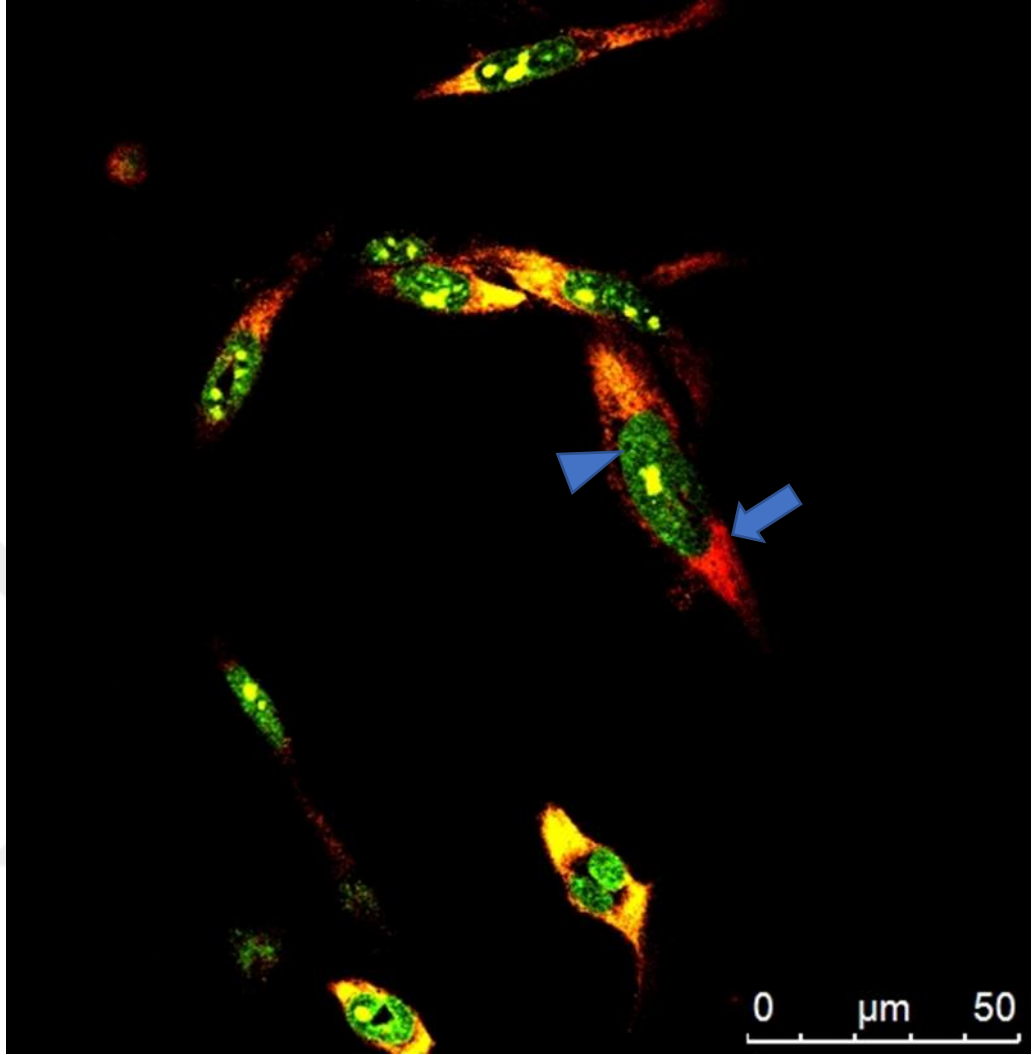
3.4. Konfokal Mikroskopik Bulgular

3.4.1. A549 ve Beas-2B kontrol hücrelerindeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları

Akridin oranj ve Falloidin ile boyanmış A549 ve Beas-2B hücrelerinin konfokal mikroskop görüntüleri Görsel 3.1. ve Görsel 3.2.'de gösterilmiştir.



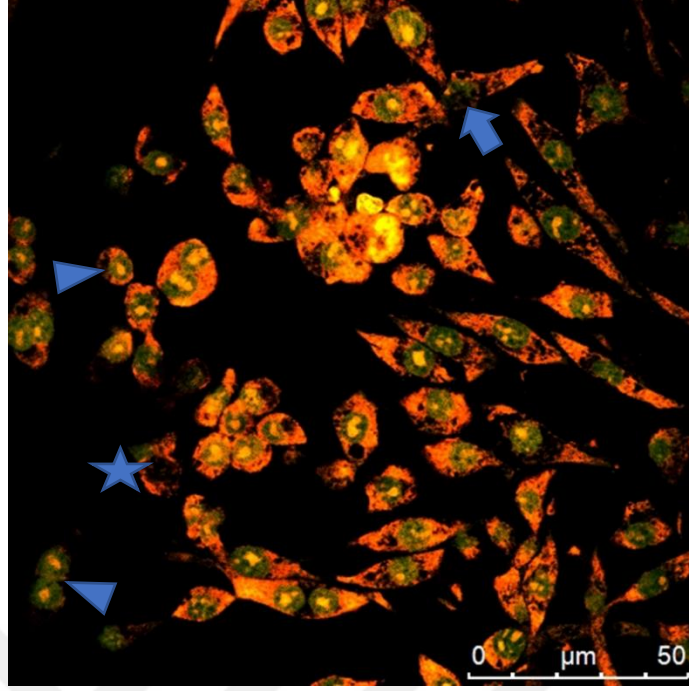
Görsel 3.1. Akridin oranj ve Falloidin kullanılarak boyanmış A549 ilaç ile muamele edilmemiş hücrelerin Konfokal Mikroskop Görüntüsü (40x) Ok başı;Normal Hücre Çekirdeği Ok; Normal hücre iskeleti



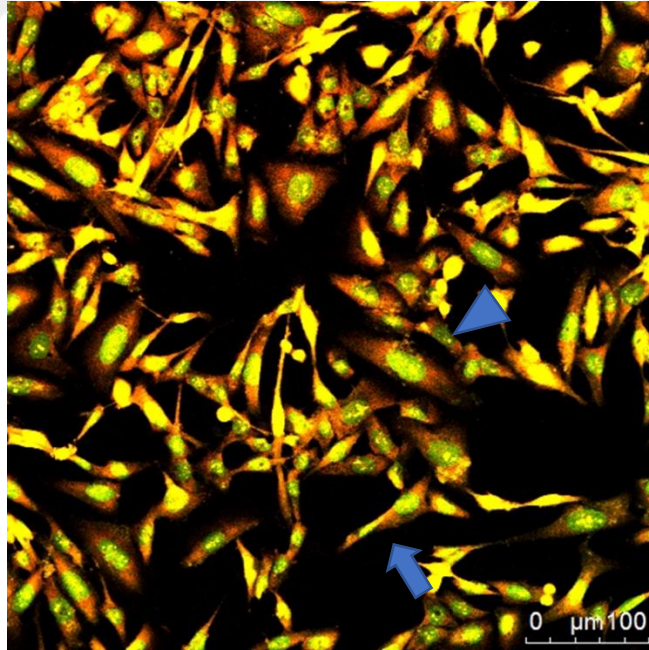
Görsel 3.2. Akridin Oranj ve Falloidin ile boyanmış Beas-2B kontrol hücrelerinin Konfokal mikroskop görüntüsü(40x) Ok: Normal hücre iskeleti Ok başı: Normal hücre çekirdeği

3.4.2. ARN14974'ün A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde neden olduğu değişikliklerin konfokal mikroskopik bulguları

ARN14974'ün 24 saatlik IC₅₀ değerinin A549 ve Beas-2B hücrelerinde neden olduğu morfolojik değişiklikler akridin oranj ve falloidin kullanılarak Konfokal mikroskopta görüntülenmiştir. Görsel 3.3. ve Görsel 3.4.'de gösterilmiştir.



Görsel 3.3. ARN14974 'ün A549 hücresi üzerinde neden olduğu morfolojik yapısal değişikliklerin konfokal mikroskobik görüntüsü(40X) Ok başı: Hücre büzüşmesi, Ok: DNA parçalanması, Yıldız; Bütünlüğü bozulmuş hücre

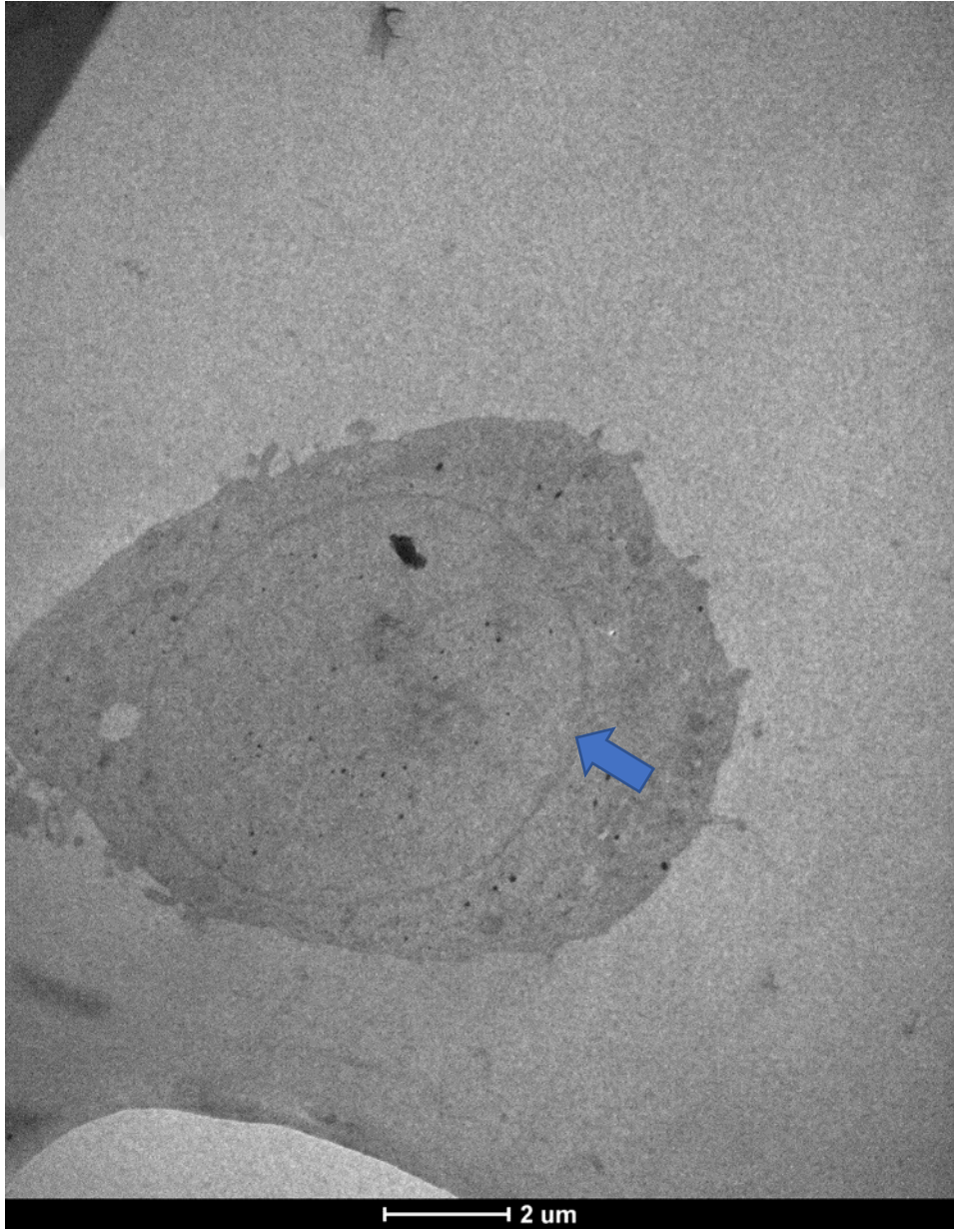


Görsel 3.4. ARN14974 'ün Beas-2B hücresi üzerinde neden olduğu morfolojik yapısal değişikliklerin konfokal mikroskobik görüntüsü(40x) Ok: Normal hücre iskeleti Ok başı: Normal hücre çekirdeği

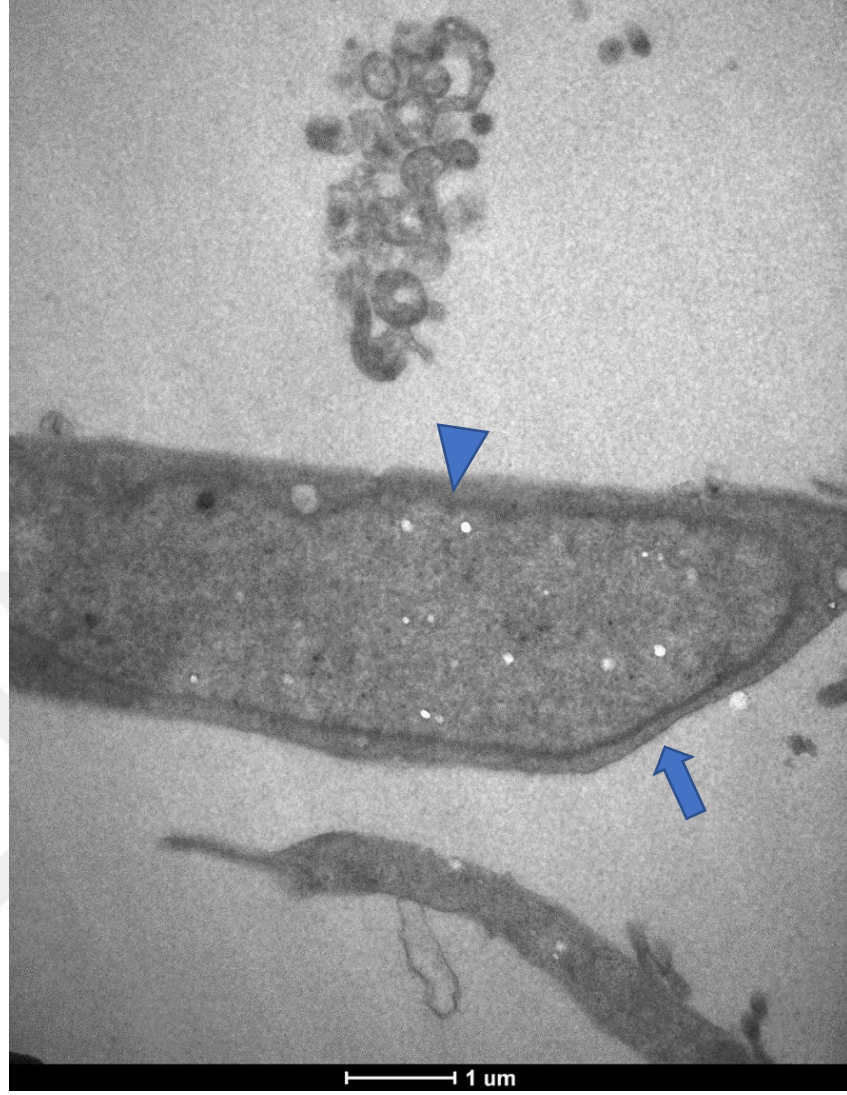
3.5. Geçirimli Elektron Mikroskopik Bulguları

3.5.1. A549 ve Beas-2B kontrol hücrelerinin ince yapısının geçirimli elektron mikroskopik bulguları

A549 ve Beas-2B kontrol hücrelerine ait geçirimli elektron mikroskobu bulguları sırasıyla Görsel 3.5 ve Görsel 3.6'da gösterilmiştir.



Görsel 3.5. İlaçsız A549 hücrelerinin geçirimli elektron mikroskop görüntüsü(6000x) Ok; Normal hücre iskeleti, Ok başı; Hücre zarı ve organeller



Görsel 3.6. *Beas-2B kontrol hücrelerinin Geçirimli elektron mikroskopik görüntüsü(6000x) Ok;Normal hücre Ok başı; Hücre çekirdeği*

3.5.2. ARN14974'ün A549 ve Beas-2B hücrelerinde sebep olduğu ince yapısal değişimlerin geçirimli elektron mikroskopik bulguları

A14974 ile muamele edilmiş A549 ve Beas-2B hücrelerinin geçirimli elektron mikroskopik bulguları Görsel 3.7 ve Görsel 3.8'de gösterilmiştir.



Görsel 3.7. ARN14974 'ün A549 hücreleri üzerindeki etkisinin geçirimli elektron mikroskop görüntüsü(6000x) Ok başı:Hücre çekirdek membranında ondülasyon Ok; vakuol oluşumu



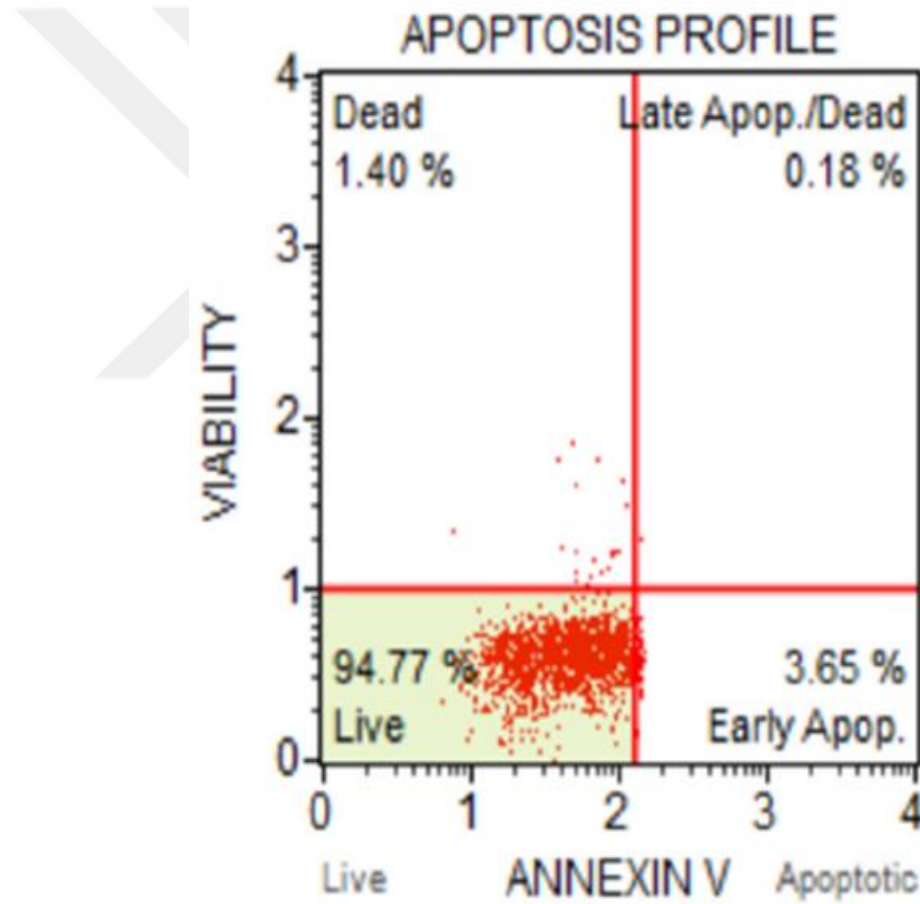
Görsel 3.8. ARN14974 'ün Beas-2B hücreleri üzerindeki etkisinin geçirimli elektron mikroskop görüntüsü(6000x) Ok:Normal hücre iskeleti

3.6. Akış Sitometri Bulguları

3.6.1. Anneksin V uygulamasının akış sitometrisindeki bulguları

3.6.1.1. A549 ve Beas-2B hücrelerinin anneksin V uygulaması ile akış sitometrisindeki bulguları

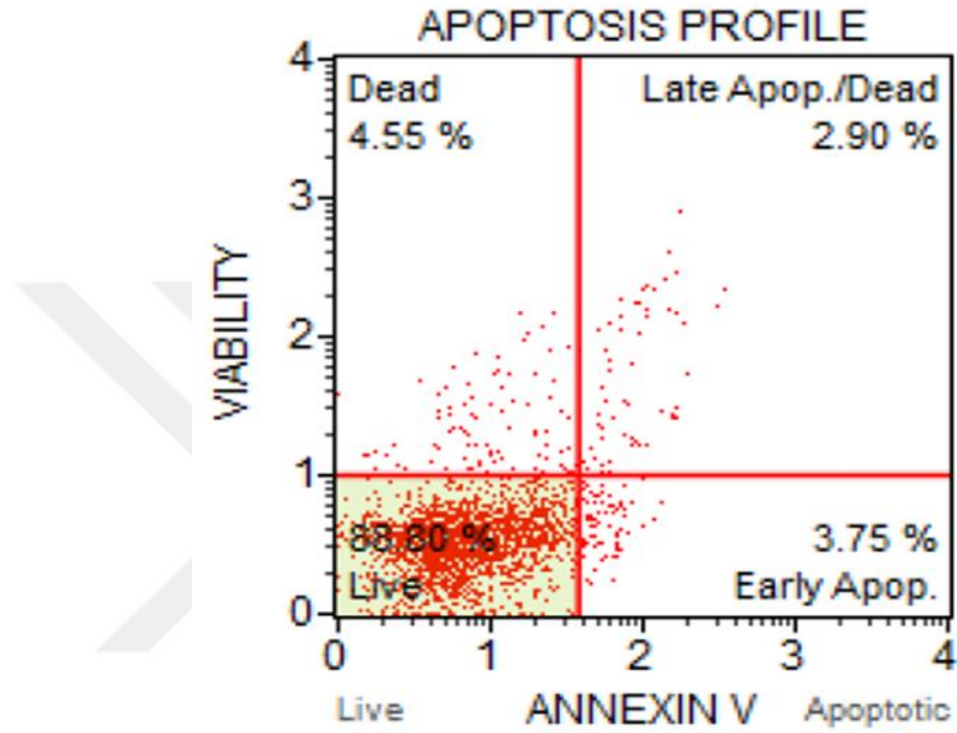
İlaçsız A549 hücrelerinin apoptotik profili anneksin V uygulaması ile akış sitometride incelenmiştir. Buna göre, A549 hücrelerine ait ilaçsız grupta ölü hücreler %1,40, geç apoptotik/ölu hücreler %0,18, canlı hücreler %94,77 ve erken apoptotik hücreler %3,65 olarak bulunmuştur. (Bkz. Şekil 3.4)



Şekil 3.4. A549 ilaçsız hücrelerinin anneksin-V boyama bulguları

Kontrol grubu Beas-2B hücrelerinin apoptotik profili Anneksin V uygulaması ile akış sitometride incelenmiştir. Buna göre, Beas-2B hücrelerine ait kontrol gruplarında;

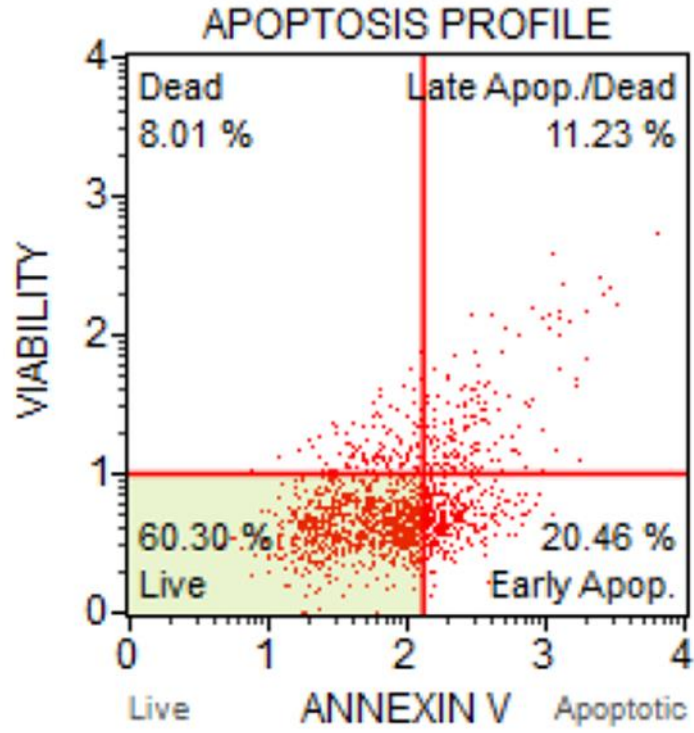
ölü hücreler %1,40, geç apoptotik/ölü hücreler %0,18, canlı hücreler %94,77 ve erken apoptotik hücreler %3,65 olarak bulunmuştur. (Bkz. Şekil 3.5)



Şekil 3.5. Beas-2B kontrol hücrelerinin anneksin-V boyama bulguları

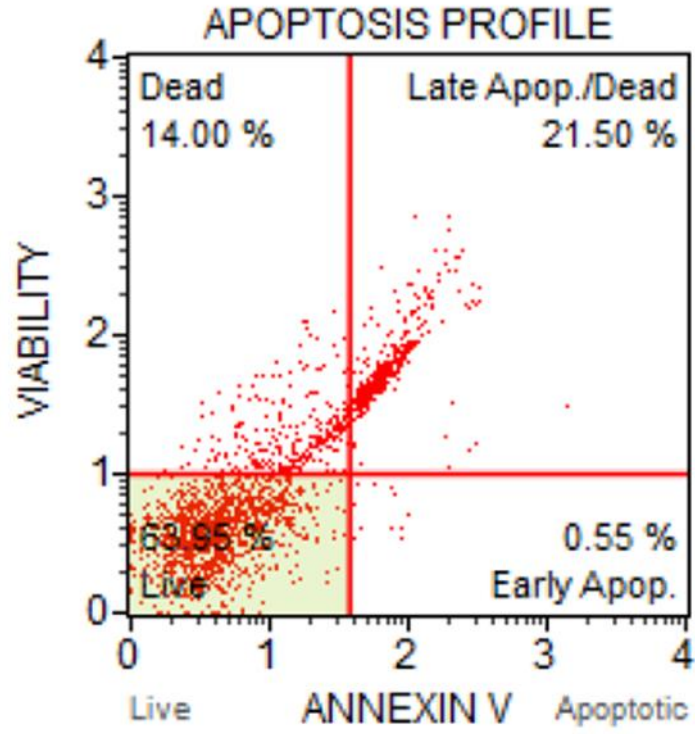
3.6.1.2. ARN14974 (BOC) ile muamele edilen A549 ve Beas-2B hücrelerinin anneksin V uygulaması ile akış sitometrisindeki bulguları

ARN14974'ün IC₅₀ değerine 24 saat boyunca maruz bırakılan A549 hücrelerinin apoptotik profili incelendiğinde; ölü hücreler %8,01 geç apoptotik/ölü hücreler %11,23 canlı hücreler %60,30 ve erken apoptotik hücreler %20,46 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda ARN14974'ün IC₅₀ konsantrasyonu A549 hücrelerinin canlılığını %60,30'a düşürdüğü tespit edilmiştir. (Bkz. Şekil 3.6)



Şekil 3.6. ARN14974 ile muamele edilmiş A549 hücrelerinin aneksin-V boyama bulguları

Beas-2B hücrelerine ait deney gruplarında; ölü hücreler %14,0, geç apoptotik/ölu hücreler %21,5, canlı hücreler %63,95 ve erken apoptotik hücreler %0,55 olarak bulunmuştur. (Bkz. Şekil 4.7)

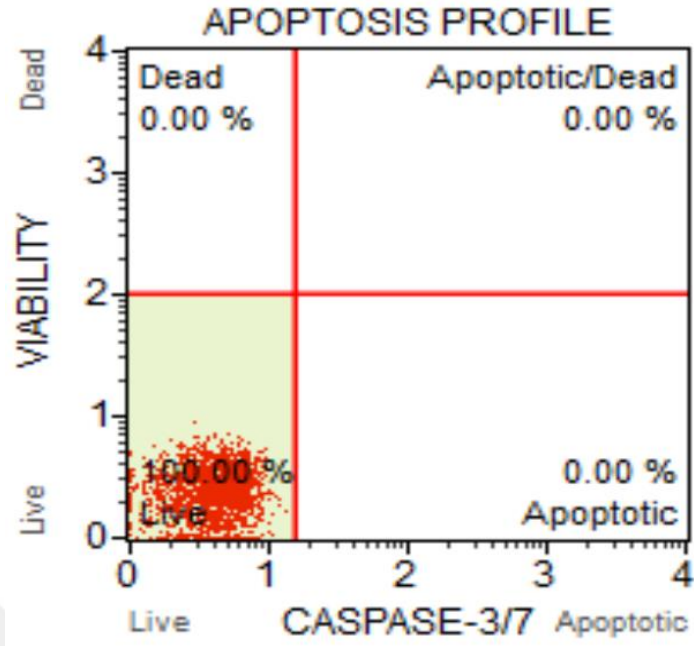


Şekil 3.7. ARN14974 ile muamele edilmiş Beas-2B hücrelerinin anneksin-V boyama bulguları

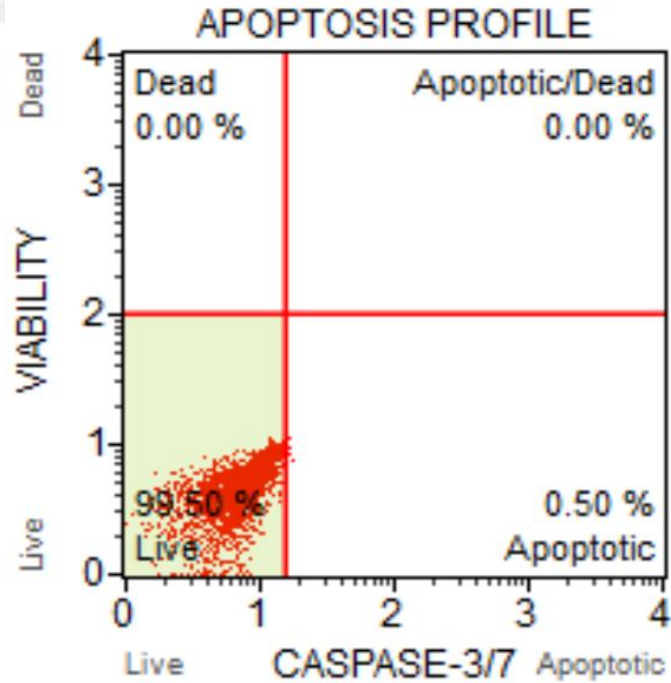
3.7. Kaspaz 3/7 Uygulamasının Akış Sitometrisindeki Bulguları

3.7.1. A549 insan akciğer kanser hücrelerinin kaspaz 3/7 uygulaması ile akış sitometrisindeki bulguları

A549 kontrol ve ARN14974'ün 24 saatlik konsantrasyonu ile muamele edilmiş A549 deney hücrelerinin apoptotik profili şekil 4.8. ve şekil 4.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 3.8. A549 ilaçsız hücrelerin Kaspaz3-7 değerlendirilmesi ile elde edilen histogram



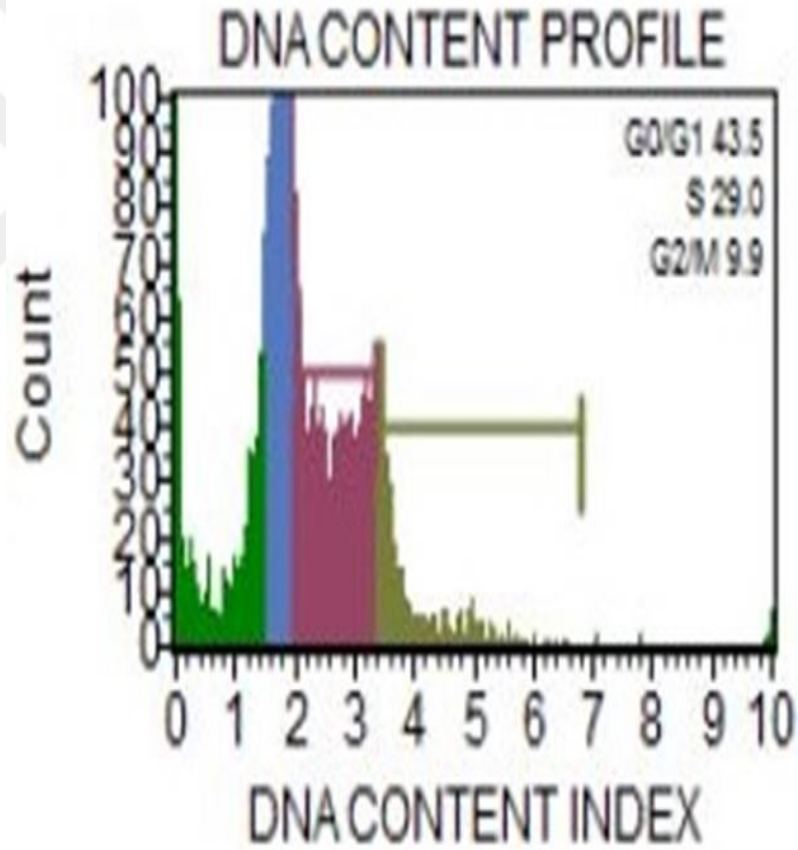
Şekil 3.9. ARN14974'ün 24 saatlik IC_{50} konsantrasyonunun uygulandığı A549 hücrelerinin kaspaz3-7 değerlendirilmesi ile elde eden histogram.

3.7.2. Akış sitometride hücre analiz bulguları

Kontrol ve ARN14974'ün IC₅₀ değerinin 24 saat boyunca uygulandığı A549 ve Beas-2B hücrelerinin hücre döngüsü analizi senkronik olarak akış sitometrisinde gerçekleştirilmiştir

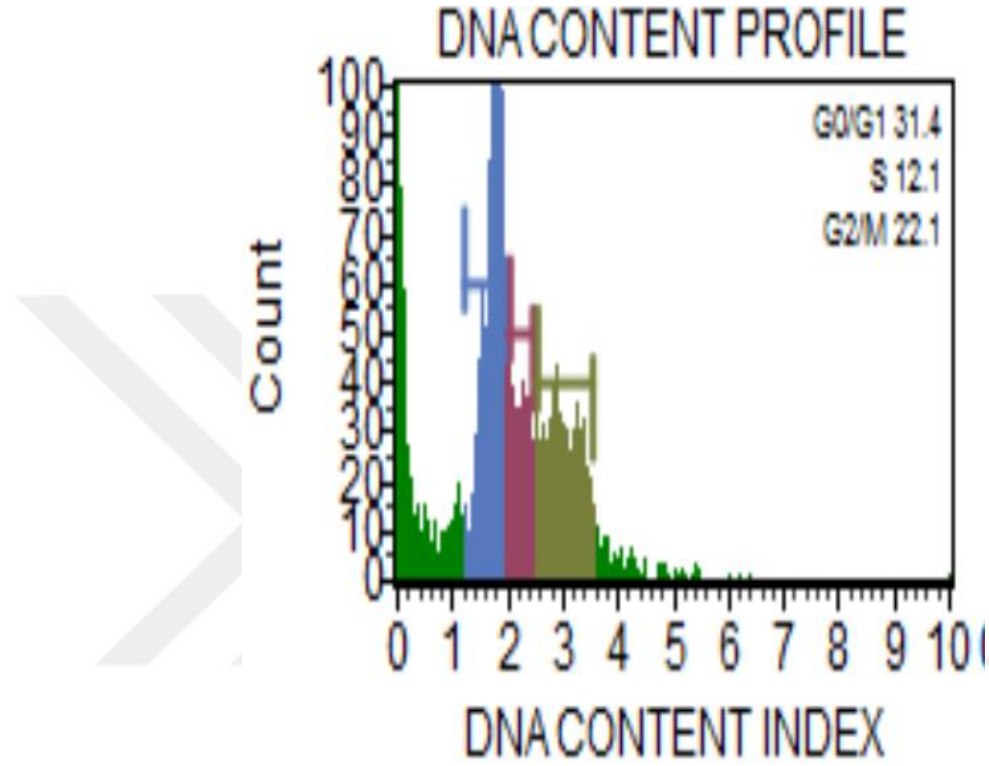
3.7.2.1. A549 ve Beas-2B kontrol hücrelerinin hücre döngüsü analiz bulguları

A549 kontrol grubunun akış sitometrisinde hücre döngü analizi şekil 3.10'da gösterilmiştir.



Şekil 3.10. A549 ilaçsız hücrelerinin hücre döngüsü analiz sonuçları

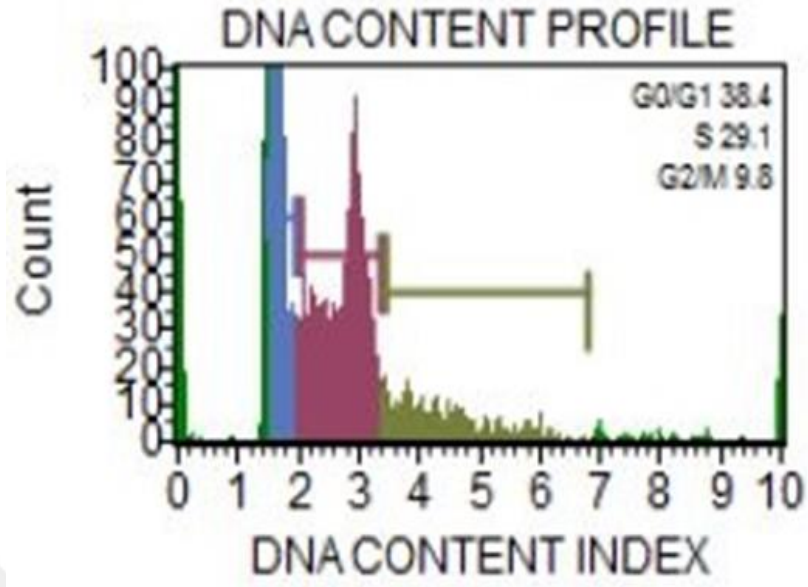
Beas-2B kontrol grubunun akış sitometrisinde hücre döngü analizi şekil 3.11’de gösterilmiştir.



Şekil 3.11. Beas-2B kontrol hücrelerinin hücre döngüsü analiz sonuçları

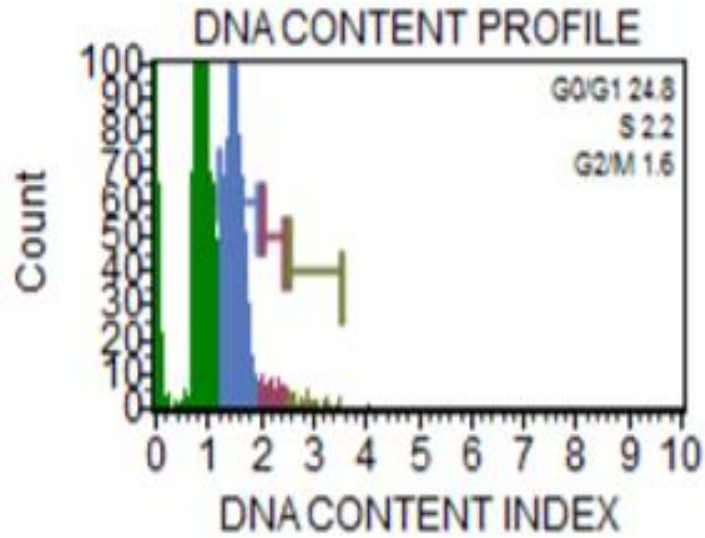
3.7.2.2. ARN14974 uygulanmış A549 ve Beas-2B hücrelerinin hücre döngüsü analiz bulguları

A549 kontrol grubunun akış sitometrisinde hücre döngü analizi şekil 3.12’de gösterilmiştir.



Şekil 3.12. ARN14974 ile muamele edilmiş A549 hücrelerinin hücre döngüsü analiz sonuçları

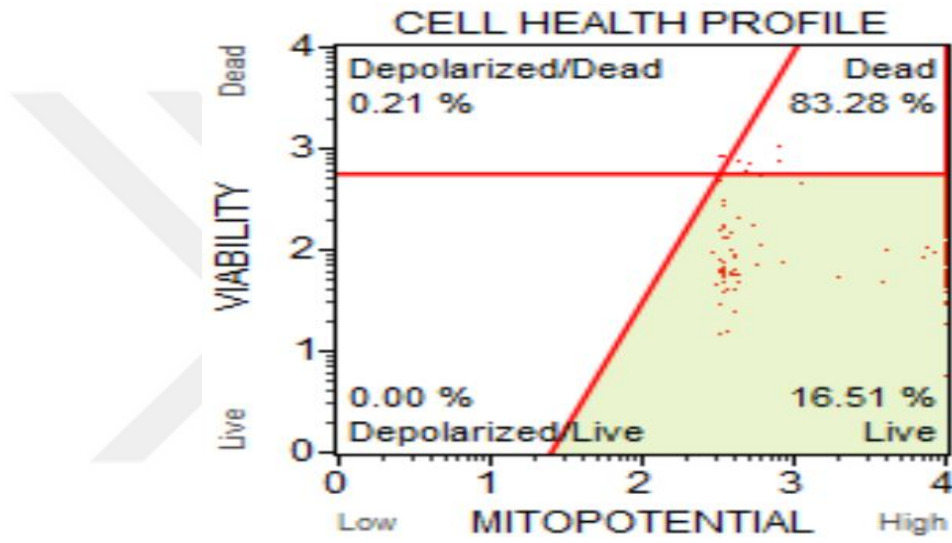
Beas-2B deney grubunun akış sitometrisinde hücre döngü analizi şekil 3.13'te gösterilmiştir.



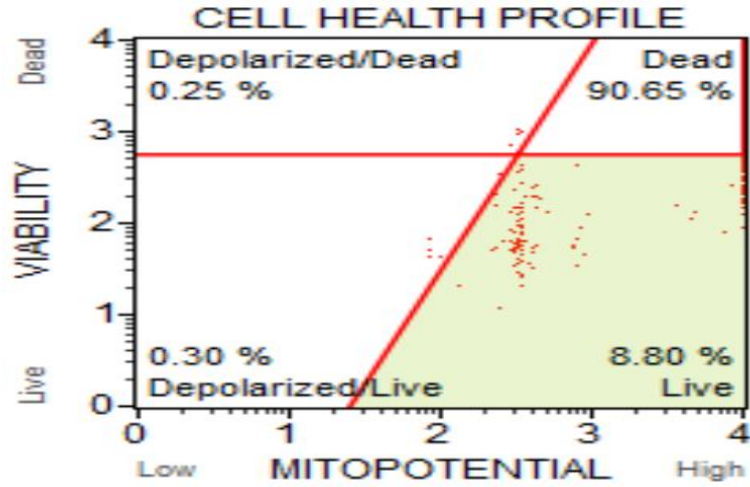
Şekil 3.13. ARN14974 ile muamele edilmiş Beas-2B hücrelerinin hücre döngüsü analiz sonuçları. Bu sonuçlara göre Beas-2B hücrelerinin G0/G1 evresinde bulunma yüzdesi

3.7.3. Akış sitometride mitokondri zar potansiyeli değişikliklerinin incelenmesi

Muse™ MitoPotential Kit iki önemli hücre sağlığı parametresinin aynı anda ölçülmesini sağlar: Apoptozun erken bir özelliği olarak kabul edilen mitokondriyal potansiyeldeki değişiklik ve hücrel plazma membran geçirgenliği veya hücre ölümü. Mitokondriyal membran depolarizasyonunu indüklemek için A549 hücreleri ARN14974 ile muamele edilmiştir. Sonuçlar, Muse™ MitoPotential Kit ve Muse™ Cell Analyzer cihazında analiz edilmiştir. Şekil 3.14. ve şekil 3.15'te gösterilmiştir.



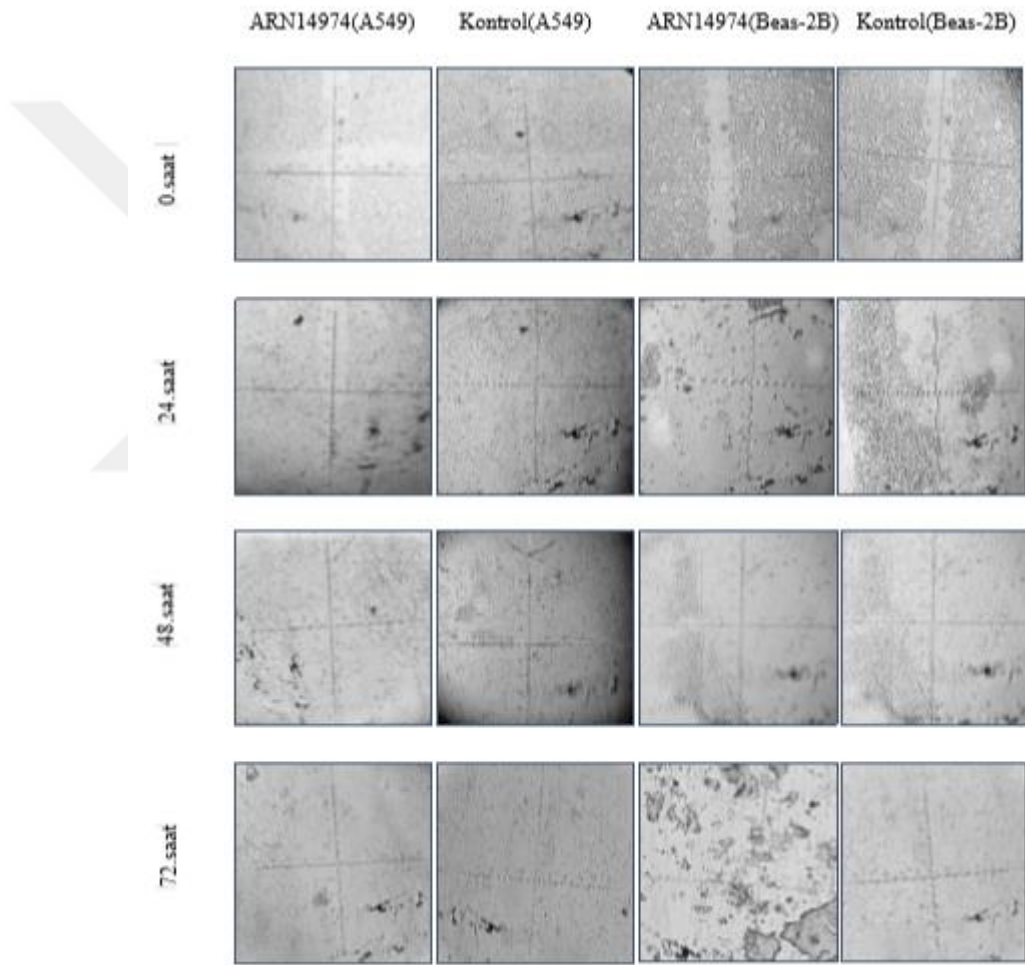
Şekil 3.14. A549 hücrelerinin mikondriyal membran potansiyel histogramı



Şekil 3.15. ARN14974'ün A549 hücreleri üzerindeki mikondriyal membran potansiyel etkisi

3.8. Yara İyileşme Deneyi Bulguları

ARN14974'ün hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimini gözlemleyebilmek için yara iyileşmesi deneyi yapılmıştır. Kuyucuklara yapışan A549 ve Beas-2B hücrelerine yara açılmıştır. Daha sonra ARN14974'ün IC₅₀ değerinin yara üzerindeki etkisi kontrol grupları ile karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Sonuçlara göre, kontrol grubunda yaranın zaman geçtikte kapandığı şekil 3.16'da gösterilmiştir. Sonuç olarak ARN14974'ün hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimi üzerinde etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

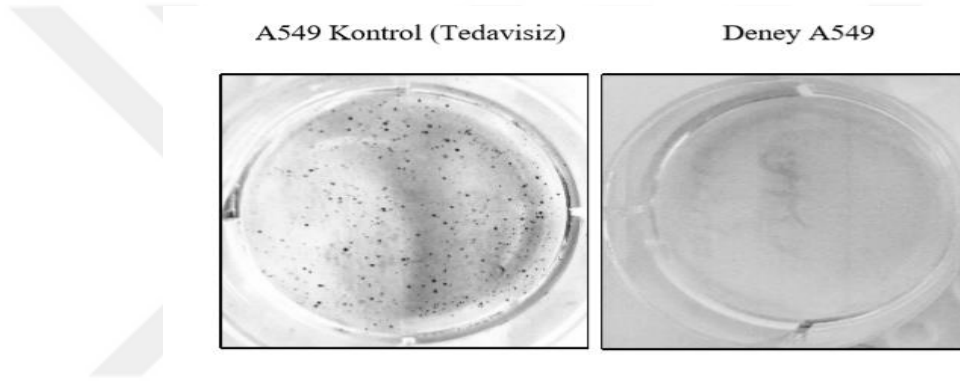


Şekil 3.16. ARN14974'ün ışık mikroskobu altında hücre göçü ve proliferasyon üzerindeki etkileri incelenmiştir

3.9. Yumuşak Agar Koloni Oluşum Deneyi Bulguları

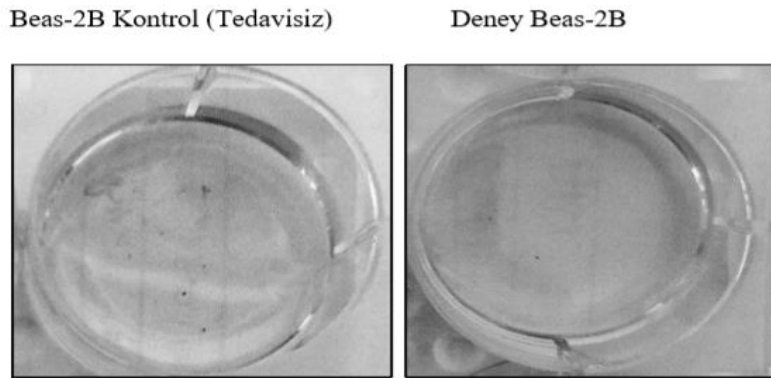
Hücrelerin koloni oluşturma yetenekleri belirleyebilmek için kristal viyole kullanılmıştır. Deneyde A549 ve Beas-2B hücreleri 14 gün boyunca ARN14974 ile muamele edilmiştir. Bu sürenin sonunda sonuçlar kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Her plaka analiz için fotoğraflanmıştır. ARN14974'ün A549 hücrelerinin yüzeyden bağımsız olarak büyümesini engellediği sonucuna varılmıştır.

Şekil 3.17 'de ARN14974 ile muamele edilen A549 hücreleri ile Tedavisiz A549 kontrol hücreleri kıyaslandığında deney grubu hücrelerinin önemli oranlarda koloni oluşturma yeteneklerinin tedavisiz gruba göre azaldığı saptanmıştır.



Şekil 3.17. A549 hücrelerinin koloni oluşturma yeteneği

Şekil 4.18 'de ARN14974 ile muamele edilen Beas-2B hücreleri ile tedavisiz Beas-2B kontrol hücreleri kıyaslandığında deney grubu ve kontrol grubu hücrelerinde değişiklik gözlemlenmemiştir.



Şekil 3.18. Beas-2B hücrelerinin koloni oluşturma deney görüntüleri

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Normal hücrelerin görevlerini yerine getirebilmeleri için belirli bir ömürleri vardır. Canlı kaldıkları süre boyunca düzenli bir şekilde büyürler, kontrollü bölünürler ve zamanında ölürlür. Hücrenin büyümesi, kontrollü çoğalması, farklılaşması ve sonunda apoptoza uğraması arasında hayati bir denge vardır. Genetik kaynaklı bir kusur, enfeksiyonlar, karsinojenler veya radyasyon gibi çok çeşitli nedenlerden dolayı bu hayati denge bozulabilir. Eğer canlı vücudunun bir veya birkaç bölümündeki hücreler kontrolsüz şekilde büyümeye başlarsa kanser gelişir [63]. Kanserli hücrelerin, vücudun farklı bölümlerinde kontrolsüz büyüebilme özelliklerinden dolayı çok çeşitli kanser türleri mevcuttur ve bu da kanser mekanizmasının anlaşılabilirliğini zorlaştırmaktadır [19]. Öldürücülüğü yüksek olan kanser türlerinden biri de akciğer kanseridir. Akciğer kanseri, Türkiye’de ve Dünya’da hala en tehlikeli kanser türlerinden biri olma özelliğini korumaktadır. Akciğer kanserinden ölenlerin sayısı her geçen yıl biraz daha artmaktadır. Yapılan araştırmalara göre akciğer kanserine yakalanan hastaların sağ kalım oranı %22 gibi düşük bir orandır [64]. Kanserli hücrelerin zamanla ilaçlara gösterdikleri dirençten dolayı bu oran mevcut ilaçlarla arttırılamamaktadır. Bu da bilim insanlarını yeni ajanları araştırmaya yöneltmektedir [65].

Ökaryotik hücrelerin ana bileşenleri sfingolipidler, zarda yapısal roller oynamakla birlikte Seramid, sfingomiyelin, sfingosin ve sfingosin-1-fosfat gibi metabolitlerin, biyoaktif sinyal molekülleri olarak hücre büyümesinde, farklılaşmasında, yaşlanmasında ve apoptozu indüklemesinde rol oynadıkları bilinmektedir [65]. Ayrıca sfingolipidler, birçok kanser türünde hücre ölümü, hayatta kalma ve ilaç direnci gibi biyolojik süreçlerde kritik rol oynar [66]. Özellikle lipid sinyal molekülü olan seramidinin çeşitli hücre tiplerinde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Seramidazlar, sfingozin üretebilmek için seramidi hidrolize ederek bu süreci kontrol eden anahtar enzimlerdir. Seramidazlar ilaçlara ve radyasyona direnç kazandırabilirler. Bu nedenle, seramidaz inhibitörleri, yeni antikanser ilaçlar olarak iyi derecede gelişme potansiyeline sahiptirler [67].

ARN14974 bir seramidaz inhibitörü olup hücrede seramid birikimine yol açmakta ve hücrenin apoptoza sürüklenmesine neden olmaktadır. Sfingozin ve seramid arasındaki denge hücreye ölüm veya yaşam göndermede önemlidir ve hücrenin kaderini belirlemektedir. ARN14974 ile yapılan bir çalışmada insan kolon kanser hücresi SW403 ve fare makrofaj benzeri Raw 264.7 hücreleri ARN14974 ile muamele edilmiştir.

ARN14974'ün SW403 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 825nm, Raw 264.7 hücreleri üzerindeki IC₅₀ değeri 400 nm olarak bulunmuştur. Sonuçlar, ARN14974'ün hücresel AC aktivitesini inhibe edebileceğini göstermiştir. Ayrıca ARN14974 ile inkübasyon, seramid miktarında bir artışa neden olmakla birlikte sfingozin miktarında da bir azalmaya yol açmıştır. Başka bir çalışmada farelere enjekte edilen ARN14974'ün, kalp, beyin, akciğer, gibi farklı organlarda AC aktivitesinde önemli seviyelerde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir [48]. Ancak literatürde ARN14974 ile yapılan çok fazla çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda, insan küçük hücreli dışı akciğer kanser hücre hattı A549 ve sağlıklı insan akciğer hücre hattı Beas-2B hücreleri üzerinde bir seramidaz inhibitörü olan ARN14974'ün sitotoksik, apoptotik ve antiproliferatif etkileri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Sitotoksik etkiyi belirlemek için kullanılan MTT yönteminde A549 hücrelerinin IC₅₀ değeri 35,36 µM Beas-2B hücrelerinin IC₅₀ değeri 35,11 µM olarak Microsoft Office Excel programı kullanılarak tekrarlı deneyler sonucunda hücrelerin canlılık değerleri bulunmuştur. GraphPad 8.0.1 programı ile bu canlılık değerlerini gösteren grafik oluşturulmuştur. Sonuçlara göre, A549 deney grubu, A549 kontrol grubu ile kıyaslandığında ARN14974'ün konsantrasyonu arttıkça deney grubu hücrelerinin canlılığı da belirgin miktarlarda doza bağlı olarak azaldığı saptanmıştır. 50µM konsantrasyonda canlılığın en fazla oranda azaldığı gözlemlenmiştir. Karşılaştırma amaçlı kullanılan sağlıklı Beas-2B hücrelerinde profilerasyonun düşük miktarlarda azaldığı görülmekte olsa da yüksek seviyelerde sitotoksik etki yaratmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda ARN14974'ün A549 hücreleri üzerinde antiproliferatif ve sitotoksik etkisi olduğu saptanmıştır.

SRB testi ARN14974'ün, A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini hücresel protein kütle yüzde miktarı anlamlılık değeri için kullanılmıştır. Deney de sonuçları karşılaştırmalı olarak analiz edebilmek adına sağlıklı akciğer hücre hattı Beas-2B hücreleri de kullanılmıştır. Hücrelerin canlılık değerleri Microsoft Office Excel programı kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplamalara göre A549 hücrelerinin IC₅₀ değeri 34,2 µM, Beas-2B hücrelerinin IC₅₀ değeri 64,25 µM olarak bulunmuştur. Excel programı ile hesaplanan canlılık sonuçları ile GraphPad 8.0.1 programı kullanılarak hücresel protein kütle miktarının anlamlılık değeri analiz edilmiştir. ARN14974'ün A549 akciğer karsinoma hücreleri üzerindeki konsantrasyona bağlı olarak yüksek oranlarda canlılıkta

düşüş görülmüştür ve en çok düşüşün 100-50 μM konsantrasyon aralığında olduğu belirlenmiştir. Beas-2B hücrelerinin canlılık oranlarında ciddi bir azalmanın olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak, A549 hücrelerinin hücresel protein kütle yüzdesinde doza bağımlı olarak anlamlı bir oranda azaldığı görülmüştür.

ATP biyoluminesans testi hücrelerdeki intrasellüler ATP içeriğinin ölçülebilmesi için kullanılmıştır. ATP, metabolik olarak aktif olan bütün hücrelerde enerji kaynağı olarak görev yapar. Hücre ölümü sırasında hücrenin sahip olduğu ATP 'yi sentezleyebilme yeteneğini kaybeder. Böylelikle ATPazlar, ATP'yi hızlı bir şekilde yıkıma uğrattırır. Bundan dolayı hücre içi ATP içeriği, hücre canlılığının temel göstergesi olarak nitelendirilmiştir. ATP testi canlılık belirleme metodları içerisinde yerini almıştır [68].

ARN14974'ün hücreler üzerindeki sitotoksitesini belirleyebilmek için kullanılan ATP testi sonuçlarına göre Microsoft Office Excel programında hücrelerin IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ARN14974'ü A549 hücreleri üzerindeki IC_{50} değerinin 12,50 μM , Beas-2B hücreleri üzerindeki IC_{50} değerinin 35,7 μM olduğu belirlenmiştir. GraphPad PRISM 9.01 programı kullanılarak deney sonuçlarının anlamlılık değerleri analiz edilmiştir. ARN14974'ün A549 insan akciğer karsinoma hücreleri üzerinde konsantrasyona bağlı olarak doz arttık yüksek oranlarda canlılıkta azalma görülürken, Beas-2B hücrelerinde ise sadece 25-50 μM konsantrasyon aralığında ciddi oranda azalma meydana gelmiştir.

Morfolojik olarak apoptozisin hücreler üzerindeki değişikliklerini inceleyebilmek için konfokal mikroskopi yönteminden yararlanıldı. ARN14974'ün IC_{50} konsantrasyonu ile muamele edilen A549 hücrelerinde; hücre büzüşmesi, DNA parçalanması, bütünlüğü bozulmuş hücre gibi değişiklikler belirlenmiştir. Hücrelerde meydana gelen ince yapısal değişiklikleri gözlemleyebilmek için geçirimli elektron mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. TEM bulgularına göre; ARN14974'ün A549 hücreleri üzerine uygulanan IC_{50} konsantrasyonu sonucunda hücre çekirdek membranında ondülasyon ve vakuol oluşumu gibi değişiklikler belirlenmiştir. Belirlenen tüm bu değişiklikler, hücrede apoptozun indüklendiğine dair işaretleyiciler olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda A549 ve Beas-2B hücreleri üzerinde karşılaştırılmalı olarak ARN1974'ün hücreler üzerindeki apoptozis profili akış sitometrisinde incelenmiştir. Buna göre Anneksin V uygulamasında A549 hücrelerine ait kontrol grubunda; ölü hücreler %1,40, geç apoptotik/ölu hücreler %0,18, canlı hücreler %94,77 ve erken apoptotik hücreler %3,65 olarak bulunmuştur. Buna karşın A549 deney hücrelerinde; ölü hücreler %8,01 geç apoptotik/ölu hücreler %11,23 canlı hücreler %60,30 ve erken apoptotik hücreler %20,46 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Beas-2B hücrelerine ait kontrol gruplarında; ölü hücreler %1,40, geç apoptotik/ölu hücreler %0,18, canlı hücreler %94,77 ve erken apoptotik hücreler %3,65 olarak bulunurken, Beas-2B deney hücrelerinde ise ölü hücreler %14,0, geç apoptotik/ölu hücreler %21,5, canlı hücreler %63,95 ve erken apoptotik hücreler %0,55 oranındadır. Anneksin V sonuçlarına göre ARN14974'ün A549 insan akciğer kanser hücreleri üzerinde antiproliferatif etkisi olduğu anlaşılmaktadır. Yine hücrenin apoptotik profil bakımından incelemek için akış sitometrisinde Kaspaz 3/7 uygulaması yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, A549 kontrol grubunda; canlı hücrelerin oranı %100,00 olarak bulunmuştur. A549 deney hücrelerinin oranı canlı hücreler %99,50, apoptotik veya erken apoptotik hücreler %0,50 oranında bulunmuştur. Sonuçlar gösteriyor ki kaspaz aktivasyonu olmadığından apoptoz kaspaz aracılı değildir ve buna bağlı olarak apoptozun farklı deneylerle araştırılması gerekir.

Tez çalışmamızda bir diğer hedefimiz, ARN14974'ün hücre döngüsünü durdurduğu evreyi tespit etmektir. Analizler sonucunda elde edilen veriler incelendiğinde kontrol A549 hücrelerinin G0/G1 evresinde bulunma yüzdesi; 38,4, S evresinde bulunma yüzdesi; 29,1, G2/M evresinde bulunma yüzdesi 9,8 olarak tespit edilmiştir. Beas-2B hücrelerinin G0/G1 evresinde bulunma yüzdesi; 38,4, S evresinde bulunma yüzdesi; 29,1, G2/M evresinde bulunma yüzdesi 9,8 olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar ARN14974'ün hücre siklusunu çoğunlukla G1 evresinde durdurduğunu göstermiştir.

Mitokondriyal membran potansiyel testi canlı hücrelerdeki mitokondriyal membran potansiyelindeki değişiklikleri akış sitometrisi ile ölçmek için kullanılır. Mitokondriyal membran potansiyeli hücre ölümünün göstergelerinden biri olarak kullanılan mitokondriyal foksiyonun önemli bir argümanıdır. İç mitokondriyal membran potansiyelinin depolarizasyonu, apoptoz, ilaç toksisitesi ve çoklu hastalık durumları çalışmasında giderek daha önemli hale gelen mitokondriyal disfonksiyon ve hücre sağlığın güvenilir bir göstergesidir. [69]. Analiz sonuçlarına göre A549 kontrol

hücrelerine bakıldığında mitokondriyal membrana sahip canlı hücreler (%16,51), depolarize veya mitokondriyal membranlı ölü hücreler (%83,28), sağlam mitokondriyal membrana sahip ölü hücreler (%0,21) oranında olduğu görülmektedir. A549 deney hücrelerinde; depolarize veya mitokondriyal membranlı canlı hücreler (%0,30), mitokondriyal membrana sahip canlı hücreler (%8,80), depolarize veya mitokondriyal membranlı ölü hücreler (%90,65), sağlam mitokondriyal membrana sahip ölü hücreler (%0,25) oranındadır. Sonuç olarak, depolarize canlıların membran potansiyelinde değişiklik olmuştur ve mitokondri membran geçirgenliğinin artmasıyla hücrenin kaspazlardan bağımsız apoptoza gitmesi söz konusudur.

Hücre göçü, embriyonik gelişimi, doku hasarı onarımın ve yara iyileşmesi gibi birçok önemli olaylar sırasında meydana gelir. Yara iyileştirme deneyi, bir hücre popülasyonunun koordineli hareketini izlememize olanak sağlar [70,71]. Yaptığımız çalışmada yara iyileşmesi deneyi kullanılarak ARN14974'ün A549 insan akciğer kanseri ve Beas-2B sağlıklı insan akciğer hücre hatları üzerindeki hücre göçü incelenmiştir. ARN14974'ün IC₅₀ değerinin ilgili hücreler üzerine uygulaması sonrasında 0.saatten 72. saate kadar hücre göçü izlenip fotoğraflandırılmıştır. Sonuç olarak, ARN14974'ün kanserli hücrede önemli derecede hücre göçünü engellediği belirlenmiştir. Ancak Beas-2B deney hücreleri üzerinde anlamlı düzeyde engellemediği görülmektedir. Bu sonuçlara dayanarak ARN14974'ün insan akciğer kanseri hücre hattı A549'un hücre göçünü ve hücre-hücre etkileşimlerini baskıladığını bağlantılı olarıktan hücrelerin metastaz yapma özelliğini engellediğini söyleyebiliriz.

Yumuşak agar koloni oluşumu deneyi, malign tümör hücrelerinin tümörjenik potansiyelini tespit etmek, hücrelerin ankrajdan bağımsız büyüme yeteneğini gözlemlemek ve hücrelerin koloniler oluşturma özelliğini anlamak için yapılan bir deneydir [72]. Yapılan bu çalışmada, ARN14974 ile muamele edilmiş kanser hücrelerinin ankrajdan bağımsız bir şekilde büyüyüp büyümediği araştırılmıştır. Normal hücreler ankrajdan bağımsız bir şekilde büyüyemezler ancak hücrelerin transformasyona uğrayarak malign hücre formuna geçmesiyle tümör oluşmaktadır. Bu transformasyon sayesinde hücreler yüzeyden bağımsız şekilde bölünebilme yetenekleri kazanırlar. Sonuç olarak, ARN14974 sayesinde A549 hücrelerinin hücre transformasyonunun büyük oranda baskılandığı ve büyümelerinin engellendiği bulunmuştur. A549 deney grubu

hücrelerinde ankrajdan bağımsız bir büyüme gerçekleşmesine karşın deney grubu A549 hücrelerinde ankrajdan bağımsız büyüme meydana gelmemiştir.

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen bulgular ile akciğer kanseri tedavisinde yeni yaklaşımlar ışığında, ARN14974'ün teranostik ve terapötik potansiyeli araştırılmış ve ilaç olabilmesi açısından önemli sonuçlar elde edilmiştir. ARN14974, A549 insan akciğer kanser hücrelerinde apoptozu indükleyerek kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediği belirlenmiştir. Bu sayede ARN14974'ün insan akciğer kanseri tedavisinde bir anti kanser ajan olma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir ancak bu ajandan yeni bir tedavi ajanı tasarlanması için daha ileri testlerin hem farklı hücre hatlarında hem de in vivo olarak gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Sonuç olarak, yapılan araştırmalar neticesinde, literatürde ilk kez ARN14974'ün, A549 insan akciğer kanser hücrelerinde hücre büyümesini, hücre göçünü ve hücre transformasyonunu büyük oranda baskıladığı gösterilmiştir. Literatürde ARN14974'ün hücreler üzerine etkilerinin araştırılmasına yönelik yapılan az sayıdaki çalışmalardan biri olması nedeniyle özgün bir nitelik taşımaktadır.

KAYNAKÇA

- [1] Thomson, P., Greenwood, M., Meechan, G. (2010). General medicine and surgery for dental practitioners. Part 6 – cancer, radiotherapy and chemotherapy. *British Dental Journal*, 209, 65–69.
- [2] Realini, N., Solorzano, C., Pagliuca, C., Pizzirani, D., Armirotti, A., Luciani, R., Maria, C.P., Bandiera, T., Piomelli, D. (2013). Discovery of highly potent acid ceramidase inhibitors with in vitro tumor chemosensitizing activity. *Scientific Reports*, 3,1035.
- [3] Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100. 57–70.
- [4] Lindsay, K., Ryland, T.E., Fox, X.L., Thomas, P., Mark, K. (2011). Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 11 (2), 138-149.
- [5] Segui, B., Andrieu-Abadie, N., Jaffrezou, J.P., Benoist, H., Levade, T. (2006). Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758 (12), 2104-2120.
- [6] Furuya, H., Shimizu, Y., Kawamori, T. (2011). Sphingolipids in cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 30 (3-4), 567–76.
- [7] Taha, T.A., Mullen, T.D., Obeid, L.M. (2006). A house divided: ceramide, sphingosine and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1758, 2027-2036.
- [8] Seelan, R.S., Qian, C., Yokomizo, A., Bostwick, D. G., Smith, D. I., Liu, W. (2000). Human acid ceramidase is overexpressed but not mutated in prostate cancer. *Genes, Chromosomes Cancer*, 29, 137–146.
- [9] Bach, A., Pizzirani, D., Realini, N., Vozella, V., Russo, D., Penna, I., Melzig, L., Scarpelli, R., Piomelli, D. (2015). Benzoxazolone Carboxamides as Potent Acid Ceramidase Inhibitors: Synthesis and Structure Activity Relationship (SAR) Studies. *Journal of medicinal chemistry*, 58 (23), 9258–9272.
- [10] Thomas, H.B., Joseph C.C., Marrison S.T., James, S.N., and Xiang, L. (2013). Interdiction of Sphingolipid Metabolism to Improve Standard Cancer Therapies. *Advances in Cancer Research*, 117, 1–36.
- [11] Seelan, R.S., Qian, C., Yokomizo, A., Bostwick, D.G., Smith, D.I., and Liu, W. (2000). Human acid ceramidase is overexpressed but not mutated in prostate cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 29, 137-146.

- [12] Sudhakar, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of Cancer Science Therapy*, 1 (2), 1–4.
- [13] Oliveira, P.A, Colaço, A., Chaves , R., (2007). Chemical Carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 79 (4), 593-616.
- [14] Doğan, A.L., Güç, D. (2004). Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35, 34-42.
- [15] Yokus, B., Ülker, D.Ü. (2012). Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 1, 7-18.
- [16] Parsa, N. (2012). Environmental factors inducing human cancers. *Iran Journal Public Health*, 41 (110), 1–9.
- [17] WHO. (2020). WHO Report of Cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: World Health Organization.
- [18] T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. (2014). Türkiye Kanser İstatistikleri.
- [19] Baykara, O. (2016). Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5 (3), 154-165.
- [20] Cruz, C.S.D, Tanoue, L.T, Matthay, R.A. (2011). Lung Cancer: Epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in Chest Medicine*, 32 (4), 605–644.
- [21] Alberg, A.J., Brock, M.V., Ford, J.G., Samet, J.M., Spivack S.D., (2013). Epidemiology of lung cancer: diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest*, 143 (5), 1-29.
- [22] Sorensen, J.B. (2004). Endobronchial metastases from extrapulmonary solid tumors. *Acta Oncologica*, 43 (1), 73-79.
- [23] Kaynak K. (2007). Akciğer Kanserinde Cerrahi Tedavi. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikler. Sempozyum Dizisi No:58*, 169-174.
- [24] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L, Torre, L.A, Jemal, A. (2018). Global cancer statistics: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer Journal for Clinicians*, 68 (6), 394–424.
- [25] World Health Organisation. (2018). Latest global cancer data: Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018. *International Agency for Research on Cancer*, 13–15.

- [26] Travis, W., Brambilla, E., Muller-Hermelink H., Harris, C.C. (2015). Pathology and genetics: tumors of the lung, pleura, thymus and heart. *Journal of Thoracic Oncology*, 10 (9), 1240-1242.
- [27] T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. (2017). Türkiye Kanser İstatistikleri.
- [28] Yang, Y., Tantai, J., Sun, Y., Zhong, C., Li, Z. (2017). Effect of hyperoside on the apoptosis of A549 human non-small cell lung cancer cells and the underlying mechanism. *Molecular Medicine Reports*. 16, 6483-6488.
- [29] Barash, O., Peled, N., Tisch, U., Bunn, P.A., Hirsch F.R., Haick, H. (2012). Classification of lung cancer histology by gold nanoparticle sensors. *Nanomedicine*, 8 (5), 580–589.
- [30] Raman, V., Chi-Fu, Y.J., Deng, J.Z., D’Amico, T.A. (2018). Surgical treatment for early stage non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 10 (7), 898–904.
- [31] Cooper, S., Spiro, S.G. (2006). Small cell lung cancer: Treatment review. *Respirology*, 11 (3), 241–248.
- [32] Aldarouish, M., Wang, C. (2016). Trends and advances in tumor immunology and lung cancer immunotherapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 35, 157.
- [33] Giard, D.J, Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W. (1973). In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors, *Journal of the National Cancer Institute*, 51 (5), 1417–23.
- [34] Maryland, F. (2018). A549 –A model for non-small cell lung cancer. *Bioresearch Retrieved*.
- [35] Fahy, E. (2009). Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research*, 50, 9-14.
- [36] Santos, C.R., Schulze, A. (2012). Lipid metabolism in cancer. *The FEBS Journal*, 279, 2610–2623.
- [37] Huang, C., Freter, C. (2015). Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 924-949.
- [38] Farese, R.V., Walther, T.C. (2009). Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell*, 139, 855–860.

- [39] Accioly, M.T., Pacheco, P., Maya-Monteiro, C.M., Carrossini, N., Robbs, B.K., Oliveira, S.S., Kaufmann, C., Morgado-Diaz, J.A., Bozza, P.T., Viola, J.P. (2008). Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Research*, 68, 1732–1740.
- [40] Menendez, J.A., Lupu, R. (2007). Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 7, 763–777.
- [41] Tennant, D.A., Durán R.V., Gottlieb, E. (2010). Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 10, 267–277.
- [42] Ogretmen, B. (2018). Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 18 (1), 33–50.
- [43] Saddoughi, S.A., Ogretmen, B. (2013). Diverse functions of ceramide in cancer cell death and proliferation. *Advances in Cancer Research*, 117, 37–58.
- [44] Coant, N., Sakamoto, W., Mao, C., Hannun, Y.A. (2017). Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Advances Biological Regulation*, 63, 122–131.
- [45] Mahdy, A.E. (2009). Acid ceramidase upregulation in prostate cancer cells confers resistance to radiation: AC inhibition, a potential radiosensitizer. *Molecular Therapy*, 17, 430–438.
- [46] Diamantia, E., Bottegonia, G., Goldonia, L., Realinia, N., Pagliucaa, C., Bertozzia, F., Piomelli, D., Pizzirania, D. (2016). Pyrazole-Based Acid Ceramidase Inhibitors: Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationships. *Synthesis*, 48, 2739–2756.
- [47] Bach, A., Pizzirani, D., Realini, N., Vozella, V., Russo, D., Penna, I., Melzig, L., Scarpelli, R., Piomelli, D. (2015). Benzoxazolone carboxamides as potent acid ceramidase inhibitors: synthesis and structure- activity relationship (SAR) studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 9258-9272.
- [48] Pizzirani, D., Bach, A., Realini, N., Armirotti, A., Mengatto, L., Bauer, I., Giroto, S., Pagliuca, C., Vivo, M.D., Summa, M., Ribeiro, A., Piomelli, D. (2014). Benzoxazolone carboxamides: Potent and systemically active inhibitors of intracellular acid ceramidase. *Angewandte Chemie International Edition*, 54 (2), 485-489.
- [49] Nagata, S. (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology*, 36, 489–517.

- [50] Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239–57.
- [51] Fuchs, Y., Steller, H. (2011). Programmed cell death in animal development and disease. *Cell*, 147, 742–58.
- [52] Akşit, H., Bildik, A. (2008). Apoptozis. *Yüzüncüyıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 19 (1), 55-63.
- [53] Kern, J.A, McLennan, G. (1998). Genetic and molecular changes of human lung cancer. Fishman's pulmonary diseases and disorders. Mc Graw-Hill Companies: New York. 1998; 2:1695-9.
- [54] Soini, Y., Paakkö, P., Lehto, V.P. (1998). Histopathological evaluation of apoptosis in cancer. *The American Journal of Pathology*, 153 (4), 1041-1053.
- [55] Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W., Kurokawa, M. (2016). Metabolic regulation of apoptosis in cancer. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 327, 43–87.
- [56] Öktem, S., Özhan, M.H, Özol, D. (2001). Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2 (1), 91-95.
- [57] Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A., Hannun, Y.A. (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science*, 259, 1769–1770.
- [58] Ogretmen, B., Hannun, Y.A. (2004). Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nature Reviews Cancer*, 4, 604–616.
- [59] Patwardhan, G.A., Levi, J.B., Leah J.S. (2016). Sphingolipids and mitochondrial apoptosis. *Journal of Bioenerg Biomembr*, 48(2), 153–168.
- [60] Martinez, M.M., Reif, R.D., Pappas, D. (2010). Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods*, 2, 996-1004.
- [61] Tokur, O., Aksoy, A. (2017). In Vitro Sitotoksosite Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6 (1), 112-118.
- [62] Aravinthan, A., Govarthanan, M., Selvam, K., Praburaman, L., Selvankumar, T., Balamurugan, R., Kamala-Kannan, S., Kim, J.H. (2015). Sunroot mediated synthesis and characterization of silver nanoparticles and evaluation of its antibacterial and rat splenocyte cytotoxic effects. *International Journal of Nanomedicine*, 1977-1983.
- [63] Allison, L. (2014). *Temel Moleküler Biyoloji*, (AO. Beldüz). Ankara: Palme.

- [64] Emami, B., Graham, M.V., Perez, C.A., Brady, L.W. (1998). Principles and Practice of Radiation Oncology. *Journal of the National Cancer Institute* ,1181-1220.
- [65] Bartke, N., Hannun, Y. (2009). Bioactive sphingolipids: metabolism and function. *Journal of Lipid Research*, 50, 91-96.
- [66] Kutlu, M., İzgördü, H., Çömlekçi, E., Sezer, C. (2019). Investigation of D-e-MAPP-derived cytotoxicity on human prostate cancer cells. *Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 6,204-212.
- [67] Draper, J.M., Xia, Z., Smith, R.A., Zhuang, Y., Wang, W., Smith, C.D. (2011). Discovery and Evaluation of Inhibitors of Human Ceramidase. *Molecular Cancer Therapy*, 10 (11), 2052-2061.
- [68] Tokur, O., Aksoy, A. (2017). In Vitro Sitotoksosite Testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6 (1), 112-118.
- [69] Russell, C., Scaduto, J.r., Grotyohann, L.W. (1999). Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives. *Biophysical Journal*, 76, 469–477.
- [70] Jonkman, J.E.N., Cathcart, J.A., Xu, F., Bartolini, M.E., Amon, J.E., Stevens, K.M., Colarusso, P. (2014). An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. *Cell Adhesion & Migration*, 8(5), 440–451.
- [71] Haider, M.T., Zarrer, J., Taipaleenmäki, H. (2020). Breast Cancer Bone Metastasis. *Encyclopedia of Bone Biology*, 324-341.
- [72] Borowicz, S., Scoyk, M.V., Sreedevi, A., Rathinam, M.K.K., Tauler, J., Bikkavilli, R.K., Winn, R.A. (2014). The soft agar colony formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, 27 (92), 51998.
- [73] <http://kanserlemucadele.blogspot.com> (Erişim tarihi:11.08.2007)
- [74] <https://www.drozdogan.com> (Erişim tarihi:06.10.2020)

ÖZGEÇMİŞ

ORCID NO: 0000-0002-9113-2935

Adı Soyadı: DİLA KUMAŞ

Yabancı Dil: İngilizce

Doğum Yeri ve Yılı: Bingöl / 1995

E-posta: dilakumas12@gmail.com

Eğitim ve Mesleki Geçmişi:

- 2020-2021, Koçak Farma İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş., Biyomühendis
- 2019-2020, ARDEB - 1002 Programı, Bursiyer
- 2017-2017, Berko İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş, Stajyer
- 2016-2016, Kafkas Üniversitesi, Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi, Stajyer
- 2013-2018, Kafkas Üniversitesi (Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, Biyomühendislik (Lisans)
- 2009-2013, Rekabet Kurumu Anadolu Lisesi

Bilimsel Faaliyetleri:

- 2020, Uygulamalı Mikroskopi ve Görüntü Analizi, MAİA Sağlık Danışmanlık
- 2020, GMP: İyi Üretim Uygulamaları, TSC Kariyer Enstitüsü
- 2020, GLP: İyi Laboratuvar Uygulamaları, TSC Kariyer Enstitüsü
- 2019, Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası/A Kategorisi, Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu (HADMEK) , Eskişehir Osmangazi Üniversitesi

- 2019, Lipit Araştırmalarında Kanser ve Lipidomiks alıştayı, Anadolu Üniversitesi Açık Öğretim Sistemi & Eskişehir Teknik Üniversitesi
- 2019, TÜBİTAK Destekli III.Lipid Araştırmaları alıştayı, Hacettepe Üniversitesi

Sunumlar:

2019, (Sözlü Sunum), Kumas D., Kutlu H.M., Bir Seramidaz İnhibitörü olan ARN14974'ün İnsan Akciğer Kanser Hücrelerindeki Sitotoksosite Etkisinin Araştırılması, EurasianBioChem 2019 Kongresi, Ankara

Ödüller:

2018, Birincilik Derecesi, Biyomühendislik Bölüm Birincisi, Kafkas Üniversitesi

2018, İkincilik Derecesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi İkincisi, Kafkas Üniversitesi

Burslar:

2020, TÜBİTAK 2210/C Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Bursu |