



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**SKUAMÖZ HÜCRELİ AKCİĞER KANSERİNDE 3 α -
ASETOKSİ-25-HİDROKSİ-OLEAN-12-EN-28-OİK ASİTİN
ANTİKANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seçil TAN

**Aralık 2024
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SKUAMÖZ HÜCRELİ AKCİĞER KANSERİNDE 3 α -ASETOKSİ-
25-HİDROKSİ-OLEAN-12-EN-28-OİK ASİTİN ANTİKANSER
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Seçil TAN

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Aydın DEMİRAY

Denizli, 2024

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Seçil TAN

İmza :

YAYIN BEYAN SAYFASI

Pamukkale Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği Uygulama Esasları Yönergesi Madde 24-(2) “Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora öğrencileri için: Doktora tez savunma sınavından önce, doktora bilim alanında kendisinin yazar olduğu uluslararası atıf indeksleri kapsamında yer alan bir dergide basılmış ya da basılmak üzere kesin kabulü yapılmış en az bir makalesi olan öğrenciler tez savunma sınavına alınır. Yüksek lisans tezinin yayın haline getirilmiş olması bu kapsamda değerlendirilmez. Bu ek koşulu yerine getirmeyen öğrenciler, tez savunma sınavına alınmazlar” gereğince yapılan yayın/yayınların listesi aşağıdadır (Özet metin/metinleri ekte sunulmuştur):

Ek-1.

Tan, S., Tan, S., Tokgün, O., Çetin, H., Tokgün, E., & Özdamar, S. (2024). Investigation of diabetes-related molecular changes in embryo-endometrium crosstalk. *Gene*, 922, 148557. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148557>

Ek-2

Kaymaz, S., Aydın, D., Uğur, K., Çobankara, V., & Tan, S. (2023). Expression Levels and Clinical Values of miR-195, miR-424, miR-10b, miR-103a-3p, and miR-542-3p in Vasculo- Behçet's Disease. *Mediterranean journal of rheumatology*, 35(2), 255–262. <https://doi.org/10.31138/mjr.030623.elc>

Ek-3

Tokgun, O., Tokgun, P. E., Turel, S., Inal, B., Inci, K., Tan, S., & Can Alvir, O. (2021). *Bryonia multiflora* Extract Induces Autophagy via Regulating Long Non-coding RNAs in Breast Cancer Cells. *Nutrition and cancer*, 73(9), 1792–1803. <https://doi.org/10.1080/01635581.2021.1922717>

ÖZET

SKUAMÖZ HÜCRELİ AKCİĞER KANSERİNDE 3 α -ASETOKSİ-25-HİDROKSİ-OLEAN-12-EN-28-OİK ASİTİN ANTİKANSER ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Seçil TAN

Doktora Tezi, Kanser Moleküler Biyolojisi Anabilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr. Üyesi Aydın DEMİRAY

Aralık 2024, 90 Sayfa

Skuamöz hücreli akciğer kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanserinin histolojik alt tipidir ve yüksek mutasyon frekansı ile tedavi seçeneklerinin sınırlı olması sebebiyle en çok ölüme sebebiyet veren kanser tiplerinden biridir. Bu nedenle daha efektif, aynı zamanda sağlıklı hücreler için daha az sitotoksik antineoplastik ajanlar ortaya koymak amacıyla yapılan çalışmalar önem arz etmektedir. 3 α -Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit molekülü bir oleanolik asit türevidir. Bazı oleanolik asit türevleri, güncel olarak çalışılan ve faz çalışmaları yapılan aday ilaçlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada, kanser hücrelerinde etkileri bilinmeyen ve literatürde sınırlı bilgisi bulunan 3 α -Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asitin, antikanser etki gösterebileceğini ortaya koymayı amaçladık. Çalışmamızda, 3 α -Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asitin sitotoksik, apoptotik, migrasyona ve ankoraj bağımsız koloni oluşturmaya etkileri, skuamöz hücreli akciğer kanseri hücre hatları SK-MES-1 ve H520 ile sağlıklı bir akciğer bronşiyal epitel hücre hattı BEAS-2B üzerinde hücre kültürü deneyleri kullanılarak araştırıldı. 3 α -Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit uygulamasının hücrelerde etki ettiği moleküler mekanizmalar, RNA sekansı ve biyoinformatik analizlerle, RT-PCR ve Western Blot yöntemleriyle araştırıldı.

3 α -Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit uygulamasının skuamöz hücreli akciğer kanseri hücre hatlarında, hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve ankoraj bağımsız koloni oluşumunu baskıladığını gösterdik. Bununla birlikte endoplazmik retikulum stresi yolağını aktifleştirerek apoptozu tetiklediğini ortaya koyduk. Bulgularımız, literatürde sınırlı bilgisi bulunan 3 α -Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asitle ilgili önemli katkılar sunmuştur. Sonuç olarak, molekülün skuamöz hücreli akciğer kanserine karşı geliştirilmeye açık, potansiyel bir antineoplastik ajan olabileceği ve moleküler etkilerinin gelecekte yapılacak çalışmalarla daha ayrıntılı olarak incelenmesi gerektiği ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Skuamöz Hücreli Akciğer Kanseri; 3 α -Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit; Antikanser

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2022SABE016)

ABSTRACT**INVESTIGATION OF ANTI-CANCER EFFECT OF 3 α -ACETOXY-25-HYDROXY-OLEAN-12-EN-28-OIC ACID IN SQUAMOUS CELL LUNG CANCER**

TAN, Seil

PhD Thesis in Cancer Molecular Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Aydın DEMIRAY (PhD)

December 2024, 90 Pages

Squamous cell lung carcinoma is a histological subtype of non-small cell lung cancer and is one of the leading causes of cancer-related mortality due to its high mutation frequency and limited treatment options. Therefore, studies aiming to develop more effective antineoplastic agents with reduced cytotoxicity for healthy cells are of great importance. 3 α -Acetoxy-25-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid is a derivative of oleanolic acid. Some derivatives of oleanolic acid are currently under investigation and have been included in clinical trials as potential drug candidates. In this study, we aimed to demonstrate that 3 α -Acetoxy-25-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid, which has unknown effects on cancer cells and limited information in the literature, may have anticancer effects. In our study, the cytotoxic, apoptotic, migratory, and anchorage-independent colony-forming effects of 3 α -Acetoxy-25-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid were investigated using cell culture experiments on squamous cell lung cancer cell lines; SK-MES-1, H520 and a healthy lung bronchial epithelial cell line BEAS-2B. The molecular mechanisms of 3 α -Acetoxy-25-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid treatment in cells were investigated by RNA sequence and bioinformatic analyses, RT-PCR and Western Blot methods. Our findings demonstrated that 3 α -Acetoxy-25-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid suppressed cell proliferation, migration, and anchorage-independent colony formation in squamous cell lung cancer cell lines. Additionally, it activated the endoplasmic reticulum stress pathway, thereby inducing apoptosis. Our findings provided important contributions to the limited knowledge of 3 α -Acetoxy-25-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid in the literature. In conclusion, the molecule may be a potential antineoplastic agent open to development against squamous cell lung cancer and its molecular effects should be investigated in more detail in future studies.

Keywords: Squamous Cell Lung Cancer; 3 α -Acetoxy-25-hydroxy-olean-12-en-28-oic acid; Anticancer

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through Project number 2022SABE016.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca ve tez çalışmam sırasında, tecrübe ve bilgilerini paylaşarak her konuda desteğini esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Aydın Demiray'a,

Bilimsel katkılarının yanında, tez çalışmam ve doktora sürecim boyunca yapmış olduğum tüm deneylerde, laboratuvar imkanlarını ve bilimsel altyapısını cömertçe paylaşan hocam, Prof. Dr. Hakan Akça'ya,

Doktora eğitimime katkıda bulunan Tıbbi Genetik ve Kansere Moleküler Biyolojisi anabilim dalları hocalarına,

Tez izleme komitesinde zaman ayırıp, bilgi ve tecrübelerini paylaşarak doktora tezime katkıda bulunan hocam, Doç. Dr. Çağrı Öner'e,

Her zaman yanımda olan, beni her koşulda destekleyen ve sonsuz sevgiyle büyüten canım aileme, hep yanımda olduğu, beni cesaretlendirdiği ve her konuda destek verdiği için canım eşime ve hayatımı aydınlattığı için canım oğluma, teşekkür ederim.

100/2000 YÖK Doktora Burs Programı kapsamında doktora sürecimi destekleyen Yükseköğretim Kurulu'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER	x
TABLolar	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaçlar	2
2. KURAMSAL BİLGİ VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Akciğer Kanseri	3
2.1.1. Epidemiyoloji.....	3
2.1.2. Etiyoloji.....	4
2.1.2.1. Sigara tüketimi	4
2.1.2.2. Mesleki maruziyetler ve çevresel faktörler	5
2.1.2.3. Diyet.....	6
2.1.2.4. Kronik akciğer hastalıkları ve enfeksiyon	7
2.1.2.5. Genetik faktörler	9
2.1.3. Histolojik Sınıflandırma.....	10
2.1.4. Evreleme	13
2.2. Skuamöz Hücreli Akciğer Kanseri.....	17
2.2.1. Skuamöz Hücreli Akciğer Kanserinin Genomik Yapısı	18
2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi	20
2.4. 3a-Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit	21
2.5. Hipotez	23
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	24
3.1. 3a-Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asitin Sitolojik Etkisinin Çevrimiçi Prediktif Veri Tabanlarında Analiz Edilmesi.....	24
3.2. 3a-asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asitin Hazırlanması.....	25
3.3. Hücre Kültürü.....	25
3.4. Sitotoksosite ve Hücre Canlılığı Deneyleri.....	27
3.5. Apoptoz Deneyi	28
3.6. Yara İyileşme (wound healing) Deneyi	28
3.7. Soft Agar Koloni Oluşturma Deneyi.....	29
3.8. Total RNA İzolasyonu	30

3.9. mRNA Dizileme (Sekans) Analizlerinin Yapılması.....	31
3.10. mRNA Sekans Sonuçlarının Yorumlanması.....	33
3.11. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizleri	33
3.11.1. RT-PCR Primer Dizilerinin Tasarlanması	33
3.11.2. cDNA Sentez Reaksiyonu.....	34
3.11.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	35
3.12. Western Blot Analizleri	35
3.12.1. Protein İzolasyonu ve Saflaştırılması.....	35
3.12.2. Protein Miktarlarının Belirlenmesi	36
3.12.3. SDS-PAGE için jelin dökülmesi, örneklerin yürütülmesi ve transferi	36
3.12.4. İmmunoblotlama	39
3.13. İstatistiksel Analiz.....	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. MBH-1'in Sitolojik Etkisinin Çevrimiçi Prediktif Veri Tabanlarında Analiz Edilmesi	41
4.2. MBH-1 Dozunun Belirlenmesi	42
4.3. MBH-1'in Apoptotik Etkisinin Annexin V-FITC/ PI Floresan İşaretleme ile Değerlendirilmesi.....	45
4.4. MBH-1'in Hücre Migrasyonuna Etkisinin Yara İyileşme Durumlarına Göre Değerlendirilmesi.....	47
4.5. MBH-1'in Soft Agarda Koloni Oluşumuna Etkisinin Değerlendirilmesi.....	50
4.6. mRNA-sekans Analizi ile MBH-1 Uygulamasına Bağlı Olarak Değişen Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi	51
4.7. mRNA-sekans Analizi ile MBH-1 Uygulamasına Bağlı Olarak H520 ve SK-MES-1 Hücre Hatlarında Değişen Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi	55
4.8. RNA Sekans Analizi Sonucunda Saptanan Genlerin Ekspresyon Değişimlerinin RT-PCR ile Validasyonu	60
4.9. ER Stresi Yolağı PERK/EIF2a/ATF4/CHOP İlişkili Apoptozun Western Blot ile Protein Düzeyinde Validasyonu.....	62
5. TARTIŞMA	64
6. SONUÇ.....	76
7. KAYNAKLAR	78
8. ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EKLER	
Ek-1.	
Ek-2.	
Ek-3.	

ŞEKİLLER

Sayfa

Şekil 2.1. 3a-asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asitin moleküler yapısı.....	22
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının mikroskopik görüntüsü.	25
Şekil 3.2. Kütüphane hazırlığı iş akışı. Illumina, Inc. (2021).....	31
Şekil 3.3. Biyoinformatik analiz iş akışı. Illumina, Inc. (2024).....	32
Şekil 4.1. MBH-1'in PASS veritabanında yapılan biyolojik aktivite tahmini.....	41
Şekil 4.2. H520, SK-MES-1, BEAS-2B hücre hatlarının IC50 hesaplama sonuçları. ...	42
Şekil 4.3. BEAS-2B hücre hattı 24. sa doz/yanıt grafiği.	43
Şekil 4.4. H520 hücre hattı 24 saat doz/yanıt grafiği.....	43
Şekil 4.5. SK-MES-1 hücre hattı 24 sa doz/yanıt grafiği.	44
Şekil 4.6. Tüm hücrelerin 48. sa doz/yanıt grafiği.	44
Şekil 4.7. Tüm hücrelerin 72. sa doz/yanıt grafiği.....	45
Şekil 4.8. BEAS-2B hücrelerinin 24. saatte apoptotik durumlarını gösteren floresan mikroskopi görüntüleri.....	46
Şekil 4.9. H520 hücrelerinin 24. saatte apoptotik durumlarını gösteren floresan mikroskopi görüntüleri.....	46
Şekil 4.10. SK-MES-1 hücrelerinin 24. saatte apoptotik durumlarını gösteren floresan mikroskopi görüntüleri.....	46
Şekil 4.11. BEAS-2B, H520, SK-MES-1, hücrelerinin kontrol ve MBH-1 uygulanan gruplarında apoptotik ve geç apoptotik/nekrotik hücre sayılarının karşılaştırması.	47
Şekil 4.12. H520, SK-MES-1 ve BEAS-2B hücrelerinin kontrol ve MBH-1 uygulanan gruplarında yara iyileşme durumları.	48
Şekil 4.13. BEAS-2B hücre hattında, yara izi oluşturulan alan yüzdesinin zamana bağlı değişimi.	49
Şekil 4.14. H520 hücre hattında, yara izi oluşturulan alan yüzdesinin zamana bağlı değişimi.	49
Şekil 4.15. SK-MES-1 hücre hattında, yara izi oluşturulan alan yüzdesinin zamana bağlı değişimi.	49
Şekil 4.16. BEAS-2B, H520, SK-MES-1 hücrelerinin kontrol ve MBH-1 uygulanan gruplarında görüntülenen koloni oluşumları.....	51
Şekil 4.17. En yüksek ekspresyon profiline sahip 50 genin, örnek gruplarındaki ekspresyon dağılımı.	53
Şekil 4.18. En anlamlı değişkenlik gösteren 5 genin normalize edilmiş okuma dağılımları.	54
Şekil 4.19. H520 VE SK-MES-1 hücre hatlarında ekspresyonu değişen genlerin STRING veritabanında ilişkilendirilmesi.	57
Şekil 4.20. G:Profil veritabanında yapılan gen ontoloji ve yolak analizlerinin grafiksel gösterimi.....	58
Şekil 4.21. G:Profil veritabanında yapılan REACTOME yolak analizi sonuçları.	58
Şekil 4.22. PERK/EIF2a/ATF4/CHOP yolağı, katlanmamış protein cevabı (UPR).	59
Şekil 4.23. BEAS-2B hücre hattında MBH-1 uygulamasına bağlı olarak ekspresyonu değişen genler.....	61
Şekil 4.24. H520 hücre hattında MBH-1 uygulamasına bağlı olarak ekspresyonu değişen genler.....	61
Şekil 4.25. SK-MES-1 hücre hattında MBH-1 uygulamasına bağlı olarak ekspresyonu değişen genler.....	62

Şekil 4.26. H520, SK-MES-1, BEAS-2B hücre hatlarının kontrol ve MBH-1 gruplarının Western Blot membran görüntüleri ve bant yoğunlukları.....	63
Şekil 4.27. Western Blot deney sonuçları. GAPDH ile normalize edilen MBH-1 örneklerinin bant yoğunluklarının, kendi kontrollerine göre kat değişim değerleriyle karşılaştırılması.	63
Şekil. 4.28. 3 α -asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asitin H520 ve SK-MES-1 hücrelerinde etkilediği mekanizmaların şematik gösterimi.	73

TABLOLAR

	Sayfa
Tablo 2.1. Akciğer Tümörlerinin sınıflandırması; epitelyal tümörler, ICD-O (International Classification of Diseases for Oncology) kodu ile birlikte.....	12
Tablo 2.2. Akciğer Tümörlerinin sınıflandırması (devam); epitelyal olmayan tümörler, ICD-O kodu ile birlikte.	13
Tablo 2.3. Akciğer kanserinin evrenmesinde kullanılan TNM kriterleri.	14
Tablo 2.3. Devam Akciğer kanserinin evrenmesinde kullanılan TNM kriterleri.....	15
Tablo 2.3. Devam Akciğer kanserinin evrenmesinde kullanılan TNM kriterleri.....	15
Tablo 2.4. Akciğer kanserinin evrenmesinde kullanılan TNM kriterlerinin önerilen 9. versiyonu.	16
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının özellikleri ve karakter bilgileri.	26
Tablo 3.2. RT-PCR için tasarlanan primer dizileri.....	34
Tablo 3.3. cDNA Sentez Reaksiyonu Formülasyonu.....	34
Tablo 3.4. RT-PCR Formülasyonu.....	35
Tablo 3.5. Western blot jel hazırlama formülasyonları.	38
Tablo 4.1. Çalışılan örneklere ait grup bilgileri, okuma sayıları ve hizalama değerleri.	52
Tablo 4.2. Karşılaştırma grupları ve anlamlı farklılık gösteren genlerin sayıları.....	54
Tablo 4.3. FDR ile düzeltilmiş P değerine göre en anlamlı değişkenlik gösteren 10 gen.	55
Tablo 4.4. SK-MES-1 ve H520 hücrelerinde MBH-1 ve kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmada ekspresyonu değişen genler ve istatistiksel anlamlılık düzeyleri.	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

AKT	AKT Serine/Threonine Kinase
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase
AT2	Alveolar Tip 2
ATF3	Activating Transcription Factor 3
ATF4	Activating Transcription Factor 4
ATF6	Activating Transcription Factor 6
BAX	BCL2 Associated X
BCL2	B-Cell CLL/Lymphoma 2
BIP	Binding Immunoglobulin Protein
BRCA2	Breast Cancer 2
BSA	Bovine Serum Albumin
BSC	Bazal Stem Cell
CCDN1	Cyclin D1
CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A
CHAC1	ChaC Glutathione Specific Gamma-Glutamylcyclotransferase 1
CHEC2	Checkpoint Kinase 2
CHOP	C/EBP homolog protein
CREB5	CAMP Responsive Element Binding Protein 5
CYP1A1	Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1
DEG	Differentially Expressed Genes
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DR5	Death Receptor 5
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EIF1	Eukaryotic Translation Initiation Factor 1
EIF2 α	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha
ER	Endoplazmik Retikulum
ERAD	Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation
ERCC1	ERCC Excision Repair 1
ERN1	Endoplasmic Reticulum to Nucleus Signaling 1
FBS	Fetal Sığır Serumu
FDR	False Discovery Rate
FGFR1	Fibroblast Growth Factor Receptor 1
GADD34	Growth Arrest and DNA Damage Gene 34
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GDF15	Growth Differentiation Factor 15
GO	Gen Ontoloji
GSTT1	Glutathione S-Transferase Theta 1
GWAS	Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları

HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HPV	İnsan Papilloma Virüsü
HR	Tehlike Oranı
HSPA5	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5
IARC	Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı
IASLC	International Association for the Study of Lung Cancer
ICD-O	International Classification of Diseases for Oncology
IRE1 α	Inositol-Required Enzyme 1
KDM6A	Lysine Demethylase 6A
KDR	Kinase Insert Domain Receptor (VEGFR2)
KEAP1	Kelch-Like ECH-Associated Protein 1
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KIT	KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase
KMT2D	Lysine Methyltransferase 2D
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Virus
MBH-1	3 α -Acetoxy-25-hydroxy-olean-12-en-28-oik asit
NFE2L2	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2
NHEJ	Homolog Olmayan Uç Birleştirme
NOXA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1
NSD1	Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1
OA	Oleanolik asit
Pa	Probability of Activity
PASS	Prediction of Activity Spectra for Substances
PDGFRA	Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha
PERK	PKR Like ER Kinase
PI	Propidyum İyodür
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
Pi	Probability of Inactivity
PM	Partikül Madde
PS	Fosfatidil Serin
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PUMA	p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
RB1	Retinoblastoma 1
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SHAK	Skuamöz Hücreli Akciğer Kanseri
SOX2	SRY-Box Transcription Factor 2
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TNM	Tümör-Nod-Metastaz
TP53	Tumor Protein 53
TP63	Tumor Protein P63
TRIB3	Tribbles Pseudokinase 3

UPR	Unfolded Protein Response
WHSC1L1	Wolf-Hirschhorn Syndrome Candidate 1-Like 1
XRCC1	X-ray Repair Cross-Complementing 1

1. GİRİŞ

Akciğer kanseri, dünya çapında kanser ölümlerinin en önde gelen nedenidir. Akciğer kanseri küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) olmak üzere iki gruba ayrılır (Travis vd., 2013). Erken teşhis ve standart tedavideki ilerlemelere rağmen, küçük hücreli dışı akciğer kanseri sıklıkla ileri evrede teşhis edilir ve kötü prognoza sahiptir. KHDAK üç ana histolojik alt tipe ayrılabilir: skuamöz hücreli akciğer karsinomu (SHAK), adenokarsinom ve büyük hücreli akciğer karsinomu. Sigara içmek her türlü akciğer kanserine neden olabilir ancak en çok, küçük hücreli akciğer kanseri ve skuamöz hücreli karsinom ile bağlantılıdır; hiç sigara içmemiş hastalarda en sık görülen tip adenokarsinomdur (Leiter vd., 2023). Adenokarsinomlarda kanserin prognozunu ve optimal tedaviyi tanımlamak için moleküler tekniklerin ve biyobelirteçlerin geliştirilmesiyle, kişiye özel tedavi seçeneklerine ulaşılabilmesi diğer alt tiplere göre nispeten daha kolaylaşmıştır (Shen vd., 2024).

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK), tüm akciğer kanserlerinin çoğunu (%80) oluşturur ve bunların %20-30'u skuamöz alt tiptir (Barta ve ark., 2019). Akciğer skuamöz hücreli karsinomlarının (SHAK) adenokarsinomlara göre görülme sıklığı, sigarayı bırakma programlarının çabaları nedeniyle 1990'lardan bu yana birçok sanayileşmiş ülkede azalmıştır (Zou vd., 2022). Kanser tedavilerinde büyük ilerlemeler olmasına rağmen, SHAK'lere özgü tedaviler eksiktir ve ileri evre hastaların çok az tedavi seçeneği vardır.

3a-Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit (MBH-1 olarak kodlanmıştır) molekülü bir oleanolik asit (OA) türevidir. *Liquidambar orientalis var integriloba* yapraklarından, reçinesinden ve meyvesinden izole edilen bileşiklerin yapı aydınlatma çalışmaları sırasında ortaya koyulmuştur. Oleanolik asit (3 β - hidroksioleanolik asit-12-en-28-oik asit), birçok bitkide bulunan bir pentasiklik triterpenoiddir. OA ve türevlerinin kanser önleyici, karaciğer koruyucu, inflamasyon önleyici, antioksidan, kalp

fonksiyonlarını geliştirici, anti-viral, anti-bakteriyel ve diyabet önleyici gibi bir dizi biyolojik etki gösterdiği keşfedilmiştir (Pollier ve Goossens, 2012). MBH-1 molekülü, oleanolik asit molekülünden farklı olarak C3 pozisyonunda asetoksi grubuyla, A halkasında, C25 pozisyonunda hidroksi grubuna sahiptir. Çeşitli çalışmalarla, C3 ve C28 pozisyonlarında modifikasyonlara sahip OA sentetik analoglarının ve çift bağ katılımı ile C halkasının modülasyonunun kanser hücrelerinin proliferasyonunu daha iyi inhibe ettiği ortaya koyulmuştur (Patil, 2022). Doğal ve yarı sentetik triterpenoidlerin geliştirilmesi için yeni bir çerçeve olarak OA, antikanser ilaçlarının keşfinde büyük önem taşımaktadır. CDDO (2-siyano-3,12-diooksooleana-1, 9 (11)-dien-28-oik asit) gibi bu türevlerin bazıları klinik deneylerde doğrulanırken, SZC014, SZC015 ve SZC017 (OA türevleri) gibi daha önce çalışılan diğer türevler, kanser tedavisi için aday ilaçlardır (Borella vd., 2019). Bu alanda yapılan çalışmalar bir OA türevi olan MBH-1'in anti-kanser etkili bir molekül olma potansiyelini göstermektedir. Online veri tabanlarında molekül yapısını incelediğimiz 3a-Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit ile ilgili yeterli çalışma bulunamamıştır. 'PASS online' (way2drug) veritabanında ise moleküler yapı benzerliği kurarak yaptığımız taramada MBH-1 molekülünün NF-kB ile ilişkili, antineoplastik, Kaspaz-3 uyarıcı, lipid metabolizmasıyla ilişkili olabileceği sonucunu elde ettik, Yaptığımız ön çalışmalar, sitotoksisite ve yara iyileşme deneyleri sonucunda ve literatürdeki bu bilgiler ışığında, MBH-1 molekülünün skuamöz hücreli akciğer kanseri hücre hatları, SK-MES-1 ve H520 üzerinde, kanserle ilişkili yolaklar kapsamında etkili olabileceğini öngörmekteyiz.

1.1. Amaçlar

Bu tez projesinin amacı, MBH-1 molekülünün skuamöz hücreli akciğer kanseri hücre hatları, SK-MES-1 ve H520 üzerinde anti-kanser özelliklerinin araştırılması ve bu molekülün skuamöz hücreli akciğer kanseri üzerinde meydana getirdiği moleküler değişimlerin saptanmasıdır.

2. KURAMSAL BİLGİ VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri en sık teşhis edilen kanser türlerinden biridir ve her yıl tahmini 1,6 milyon vaka ölümle sonuçlanmaktadır. Dünya çapında kanserle ilişkili ölümlerin önde gelen nedenlerinden biri akciğer kanseridir (Herbst vd., 2018). Klinik semptomların ve etkili tarama programlarının olmaması nedeniyle, çoğu akciğer kanseri ileri evrede teşhis edilir. Ancak akciğer kanserinin doğru evrelemesi hayati önem taşır çünkü tedavi seçenekleri ile hastalığın prognozu buna bağlıdır ve Tümör-Nod-Metastaz (TNM) sınıflandırma sistemi, evrelemenin temelini oluşturur (Gridelli vd., 2015).

Akciğer kanseri iki gruba ayrılmaktadır: küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK). KHDAK, vakaların yaklaşık %85'ini oluşturarak en yaygın tür olarak öne çıkmaktadır (Siegel vd., 2020). Tanı koyulduğunda hastaların büyük çoğunluğunda hastalık ileri evrede olup, bu durum tedavi seçeneklerini sınırlamakta ve sağkalımı olumsuz etkilemektedir. Son yıllarda moleküler hedefli tedaviler ve immünoterapilerin gelişimi, akciğer kanseri tedavisinde umut verici ilerlemeler sağlamıştır. Bununla birlikte, erken teşhis ve önleme stratejileri hala hastalığın yönetiminde kritik rol oynamaktadır.

2.1.1. Epidemiyoloji

Akciğer kanseri genel olarak küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan histolojiler olarak gruplandırılır; KHDAK tüm vakaların %85'inden fazlasını oluşturur. KHDAK'nin en yaygın histolojik alt tipi %40 oranla adenokarsinomdur, bunu %25 oranla skuamöz hücreli karsinom takip eder (Barta vd., 2019). Akciğer kanseri, tanı alan yaklaşık 2,5

milyon yeni vaka ve 1,8 milyondan fazla ölümlle, 2022 yılında kanser morbidite ve mortalitesinin en önde gelen nedenlerinden biridir ve dünya çapında teşhis edilen kanserlerin yaklaşık sekizde birinden (%12,4) ve kanser ölümlerinin beşte birinden (%18,7) sorumludur (Bray vd., 2024).

2022 Global kanser istatistiklerine göre (GLOBOCAN) hastalık, hem insidans hem de mortalite açısından erkeklerde birinci, kadınlarda ikinci sırada yer almaktadır ve erkek-kadın akciğer kanseri insidansı ve mortalite oranları yaklaşık ikidir. Ancak bunlar bölgeye göre büyük ölçüde değişmektedir; Kuzey Amerika ve Kuzey Avrupa'da bu oran neredeyse bir olurken, Kuzey Afrika ve Doğu Avrupa'da dört ila beş katına kadar çıkmaktadır. Erkeklerde en yüksek insidans oranları Doğu Asya bölgesinde gözlenmekte olup, bunu Mikronezya/Polinezya ve Doğu Avrupa takip etmektedir ve dünya çapında erkekler arasında en yüksek ulusal oranın Türkiye'de görüldüğü tahmin edilmektedir. Kadınlar arasında akciğer kanseri, 23 ülkede kanser ölümünün önde gelen nedenlerindedir. Dünya bölgelerine göre, Kuzey Amerika, Doğu Asya ve Kuzey Avrupa'da yüksek insidans oranları görülürken, en yüksek ulusal oranın Macaristan'da olduğu tahmin edilmektedir (Bray vd., 2024).

Akciğer kanseri insidansı ve mortalitesi uluslararası alanda büyük farklılıklar göstermektedir. Dünya genelinde akciğer kanseri insidansındaki küresel farklılıklar, büyük ölçüde, cinsiyete ve ekonomik kalkınma eğilimlerine göre değişen, tütün içme alışkanlıklarındaki farklılıkları yansıtır. Kişi başına düşen gayri safi milli gelir, yaşam beklentisi ve eğitim seviyelerini birleştiren bir puan olan insani kalkınma endeksi tarafından tanımlandığı gibi daha yüksek ekonomik kalkınma seviyelerine sahip ülkelerde akciğer kanserinin hem insidansı hem de ölüm oranları üç ila dört kat daha yüksektir (Leiter vd., 2023).

2.1.2. Etiyoloji

2.1.2.1. Sigara tüketimi

Sigara içmek, akciğer kanseri için belgelenmiş bir risk faktörüdür. Sigarada, Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından insan kanserojenleri olarak

değerlendirilen 70'ten fazla kanserojen bulunur. Ana akım sigara dumanı polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, N-nitrozaminler ve benzen, vinil klorür, arsenik ve krom gibi diğer organik ve inorganik bileşikler de dahil olmak üzere birçok potansiyel kanserojen madde içerir (Smith vd., 2001). Polisiklik aromatik hidrokarbonlar ve N-nitrozaminlerin kanserojen hale gelmeleri için metabolik aktivasyona ihtiyaçları vardır (Li ve Hecht, 2022). Bu bileşiklerin metabolik detoksifikasyonu meydana geldiğinde aktivasyon ile detoksifikasyon arasındaki denge, muhtemelen bireysel kanser riskini etkilemektedir. Radon ve bozunma ürünleri, bizmut ve polonyum gibi radyoaktif maddeler de tütün dumanında bulunur. Tütünün işlenmesi ve içilmesi sırasında nikotinin nitrozasyonu ile oluşan tütüne özgü N-nitrozaminlerden, 4-(metilnitrozamino)-1(3-piridil)-1-bütanonun, akciğer kanserinin en önemli indükleyicisi olabileceği ortaya koyulmuştur (Bade & Dela Cruz, 2020).

Akciğer kanseri riski genellikle sigara içiminin süresi ve yoğunluğu arttıkça artar ve mevcut sigara içicilerinde, sigarayı bırakmış olanlara göre daha fazla risk vardır (Zou vd., 2022). Daha önceki çalışmalar kadınlarda sigara içmekle ilişkili akciğer kanseri riskinin erkeklerden daha yüksek olduğunu öne sürmüştü olsa da (Zang vd., 1996), son kanıtlar erkekler ve kadınlar arasında da benzer bir risk olduğunu desteklemektedir (Freedman vd., 2008). Sigara içme ile akciğer kanseri arasındaki ilişki, histolojik alt tiplere göre değişmekte olup, KHAK ve SHAK ile daha güçlü, ve adenokarsinom ile daha zayıf bir ilişki göstermektedir (Zou vd., 2022). Mevcut çalışmalar, sigara dumanına maruz kalma ve pasif içiciliğin akciğer kanseri ile doğrudan ilişkili olduğunu ve çocukluk çağında sigara dumanına maruz kalmanın ilerleyen yaşlarda akciğer kanseri riski ile ilişkili olabileceğini göstermiştir (IARC, 2012).

2.1.2.2. Mesleki maruziyetler ve çevresel faktörler

Madencilik, inşaat, metal işçiliği ve şoförlük gibi bir dizi endüstri ve meslek, akciğer kanseri riskinin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Asbest, dizel dumanı, arsenik, berilyum, kadmiyum, krom, nikel ve silika gibi yerleşik mesleki akciğer kanserojenleri, büyük bölgesel farklılıklarla akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (Malhotra ve Boffetta, 2020). IARC tarafından mesleki olarak radon ve bozunma ürünlerine maruz kalma ile akciğer kanseri riski arasında güçlü bir ilişki olduğu

raporlanmış ve radon kansinojen olarak tanımlanmıştır, sigara içmeyenlerde akciğer kanserinin önde gelen nedenlerindedir (IARC, 1988).

İklim değişikliği ve şaşırtıcı sanayileşme hızı nedeniyle hava kirliliği ciddi bir küresel sorun haline gelmiştir. Dış hava kirliliği ve dış hava kirliliğindeki partikül madde (PM), 2013 yılında IARC tarafından grup 1 insan kanserojenleri olarak sınıflandırılmıştır. Epidemiyolojik çalışmalar, hava kirliliğinin, özellikle PM maruziyetinin, sigara içiminden bağımsız olarak artan akciğer kanseri riski ve ölüm oranıyla ilişkili olduğunu ileri sürmektedir (Bade & Dela Cruz, 2020). Kentsel-kırsal karşılaştırmalar yapan erken çalışmalarda akciğer kanseri ölümlerinde %10 ila %40'luk bir artışla ilişkili olan bir "kentsel faktör" karşımıza çıkmaktadır.

Hava kirliliği bileşenlerinin tek başına kanserojen etkisini tam olarak belirlemek zordur. Hava kirliliğinde bulunan dizel egzozu; benzen, formaldehit ve 1,3-bütadien gibi gaz halindeki bileşenler içerir ve bilinen kanserojen etkileri vardır. Avrupa kohort çalışmalarının meta analizi, akciğer kanseri riski ile PM 10 (HR (tehlike oranı), her 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 'te 1,22) ve PM 2,5 (HR, her 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 'te 1,18) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulmuştur (Raaschou-Nielsen vd., 2013). İkametgahın 50 m yakınında günde 4000 araçlık bir trafik artışı, 1,09'luk bir akciğer kanseri HR'si ile anlamlı bir şekilde ilişkilendirilirken, belirli PM bileşenleri (PM_{2,5} Cu, PM₁₀ S, PM₁₀ Ni, PM₁₀ Zn, PM₁₀ K) ve akciğer kanseri ile anlamlı ilişkiler bulunmuştur (Raaschou-Nielsen vd., 2013; Raaschou-Nielsen vd., 2016)

2.1.2.3. Diyet

Diyet ile akciğer kanseri riski arasındaki ilişkiyi araştıran epidemiyolojik çalışmalar karışık sonuçlar bildirmiştir. Bu çalışmalarda kullanılan gıda sıklığı anketlerinin çeşitliliği karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır. Meta-analizler, meyve ve sebzelerin soya ürünleri ve balık tüketiminin akciğer kanseri riskini orta derecede azalttığını, kırmızı ve işlenmiş et tüketiminin de orta derecede arttığını ileri sürmektedir (Zou vd., 2022). Meyve ve sebzelerin faydalarına işaret eden geniş epidemiyolojik literatür nedeniyle, çoğu sağlık otoritesi meyve ve sebzeleri içeren dengeli bir diyet alımını önermeye devam etmektedir. Ancak A vitamini, C vitamini, E vitamini, karotenoid, folat, selenyum ve multivitaminler gibi takviye edici besinlerle ilgili

çalışmalar, bunların akciğer kanserine karşı koruyucu etkisine dair kesin bir kanıt sunmamıştır (Cho vd., 2006). Bununla birlikte, bazı çalışmalar da beta-karoten takviyelerinin sigara içenler arasında akciğer kanseri riskini arttırdığını göstermiştir. β -karoten ve A vitamini kombinasyonunun akciğer kanseri geliştirme ihtimali yüksek olan kadın ve erkek katılımcılara takviye olarak verildiği çalışma “CARET”, katılımcılara kemopreventif faydası olmadığı ve hatta katılımcılarda artan yüksek akciğer kanseri insidansı ve mortalitesi olduğu için erkenden sonlandırılmıştır (Omenn vd., 1996).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda sağlıklı doymamış yağ asitleri alımının, KHDAK hastalarında sağkalımı arttığı ve değişen bağırsak mikrobiyatasının immün kontrol noktası inhibitörlerine verilen yanıtı arttırabileceği savunulmuştur (Malo vd.2024).

Özetle, diyet alımı ile akciğer kanseri riski arasındaki ilişki kesin değildir. Gıda maddelerinin karmaşıklığı, pişirme yöntemlerinin çeşitliliği ve zaman içinde yeme kalıplarındaki değişiklikler, diyet maruziyetinin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır.

2.1.2.4. Kronik akciğer hastalıkları ve enfeksiyon

Kronik akciğer hastalıkları, özellikle erkeklerde, akciğer kanseri için artan riskle ilişkilendirilmiştir; kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) akciğer kanserine neden olabilir (Zou vd., 2022). Bir çalışmada, yeni tanı koyulmuş akciğer kanserinde KOAH prevalansının, KOAH hastası olmayan sigara içicilerine göre altı kat daha fazla olduğunun görülmesi, KOAH'ın kendisinin önemli bir bağımsız risk faktörü olduğunu düşündürmektedir. (Turner vd., 2007). Bununla birlikte, “alpha-1-antitripsin eksikliği” taşıyıcılarında, tütün dumanı ve KOAH gibi faktörler göz önünde bulundurulduğunda bile akciğer kanseri riski iki kat artmaktadır (Yang vd., 2008).

İnterstisyel fibrozisi olan hastalarda akciğer kanseri insidansı, sigara içme durumundan bağımsız olarak kontrol gruplarına kıyasla 8.25 kat daha fazladır (Hubbard vd., 2000). İdiopatik pulmoner fibrozis veya yaygın interstisyel fibrozisi olan bireylerde, özellikle yaşlı erkek sigara içicilerde ve yaygın interstisyel fibrozis ve amfizem sendromu olanlarda yalnızca fibrozis olanlara göre akciğer kanseri gelişme riski daha yüksektir (Antoniou vd., 2015). Asbestoz ve skleroderma ile ilişkili akciğer hastalığı gibi diğer fibrotik hastalıklar da artmış akciğer kanseri riski ile ilişkilidir. Pulmoner interstisyel

hastalığın akciğer kanserine yatkınlık oluşturma mekanizmaları tam olarak net olmasa da, kronik inflamasyon, epitel hiperplazisi, kanserojenlerin yetersiz klirensi ve enfeksiyonlarla ilişkili olabileceği öne sürülmüştür (Bade & Dela Cruz, 2020).

Bazı bakteriyel ve viral enfeksiyonların akciğer kanseriyle ilişkisi araştırılarak bu konuda yapılan çalışma sonuçları paylaşılmıştır. Bakteriyel enfeksiyon açısından bakıldığında, özellikle sigara içenlerde solunum yolu enfeksiyonlarına yol açan yaygın bir etken olan *Chlamydia (Chlamydoiphila) pneumonia*'nın akciğer kanserinde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Littman vd., 2005). Onkojenik bir patojen olarak bilinmemekle birlikte, klamidya enfeksiyonundan ve/veya *C pneumoniae* proteinlerinden kaynaklanan inflamasyonun, tümör oluşumu için seçici avantajlar sağlayan DNA hasarına ve hücresel hasara neden olarak, tümör gelişimine katkıda bulunabileceği öne sürülmüştür (Bade & Dela Cruz, 2020).

Tüberküloz hastaları üzerine yapılan çalışmalar, bu hastalarda akciğer kanseri riskinin artmış olduğunu göstermiştir. Bu bağlamda, tüberküloz ile ilişkili inflamasyon ve yara dokusunun akciğer kanseri patogenezinin katkı sağladığı düşünülmektedir (Hong vd., 2016).

Akciğer kanserinde etken faktör olarak viral enfeksiyon hala tartışmalıdır. İnsan papilloma virüsünün (HPV) akciğer kanserinde potansiyel bir rolü olduğu, bronşiyal skuamöz hücre lezyonlarında tespit edildiği için öne sürülmüştür (Syrjänen 1980). Asyalı kohortlarda, özellikle sigara içmeyenlerde, akciğer kanserinde yüksek oranda HPV DNA'sı bildirilmiştir; ancak Batı Avrupa'daki çalışmalar, HPV'nin akciğer kanserinde etiyolojik bir rolünü gösterememiştir.

Kanser Genom Atlası verilerinin biyoenformatik analizleri, normal dokularla karşılaştırıldığında akciğer kanseri örneklerinin %21'inde viral dizilerin tanımlanabildiğini bulmuştur. Bu verilere göre akciğer kanserinde sekiz virüsün viral dizileri bulunmuştur ve bunlar arasında HPV16, HPV18, HPV30, HPV33, insan herpes virüsü 4 (veya Epstein-Barr virüsü), insan herpes virüsü 5 (veya sitomegalovirüs CMV), insan herpes virüsü 6 ve hepatit B virüsü yer almaktadır (Cao vd., 2016). İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) ile enfekte hastalarda yapılan bir çalışmada ise sigara içme durumundan bağımsız olarak HIV, akciğer kanseri için 3.6'lık bir HR ile ilişkilendirilmiştir (Kirk vd., 2007).

2.1.2.5. Genetik faktörler

Genetik mutasyonlar, DNA onarım mekanizmalarının bozulması, onkogenlerin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, akciğer kanserinin gelişiminde etkili olabilecek başlıca genetik mekanizmalardan bazılarıdır.

Geçtiğimiz yıllarda akciğer kanseri ve belirli histolojik alt tipler için genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) yapılarak bir dizi genetik duyarlılık lokusu tanımlanmıştır. Avrupa popülasyonları arasında 19q13, 15q25, 15q21.1, 10q23.33, 8p21.1, 6q27, 6p21, 5p15, 5q14.2, 4p15.2, 3p26 ve 1p31.1 lokusları akciğer kanseri ile anlamlı şekilde ilişkilendirilmiştir (McKay vd., 2017). Buna karşın 22q12.1, 13q13.1, 12q13.33, 9p21.3, 6p21, 4p15.2 ve 2q32.1 SHAK ile ilişkilendirilmiştir (Brenner vd., 2015). Asyalı popülasyonlar arasında yapılan çalışmalarda akciğer kanseri için 20q13.2, 20q11.21, 17q24.3, 13q12.12, 12q12.2, 10p14, 6p21.33, 6p22.2, 5q32, 5q31.1, 5p15, 3q28 ve 1p36.32 (Dong vd., 2012; Shiraishi vd., 2012), SHAK için 12q23.1 (Dong vd., 2013) ilişkilendirilmiştir.

Akciğer kanserinin bazı önemli genetik belirleyicileri arasında Kirsten Rat Sarcoma Virus (KRAS), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) ve Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)'daki mutasyonlar da yer alır. KRAS mutasyonları sigara içenlerde daha yaygınken, EGFR mutasyonları kadınlarda, sigara içmeyenlerde ve Asyalı popülasyonlarda daha sık tespit edilir (Wang vd., 2021). Tümör baskılayıcı genler arasında Tumor Protein 53 (TP53) ve Retinoblastoma 1 (RB1)'deki mutasyonlar özellikle dikkat çekicidir. Bu mutasyonlar, tümör gelişimini kolaylaştıran kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açar (Gazdar vd., 2017).

Akciğer karsinomu için önemli risk faktörlerinden biri aile geçmişi'dir. Genetik yatkınlık, belirli genlerdeki polimorfizmlerle ilişkilendirilmiştir. ERCC Excision Repair 1 (ERCC1) ve X-ray Repair Cross-Complementing 1 (XRCC1) gibi DNA onarım genlerindeki ve Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1 (CYP1A1), Glutathione S-Transferase Theta 1 (GSTT1) gibi karsinojenlerin metabolizmasıyla ilgili genlerdeki polimorfizmlerin akciğer kanseri riskini arttırabileceği öne sürülmüştür (Hung vd., 2008). Bu genler, çevresel karsinojenler tarafından oluşturulan DNA hasarının onarımını bozabilir ve kansere duyarlılığı artırabilir. Daha az yaygın olsa da, germ hattı

mutasyonları da akciğer kanseri riskinde önemli oyunculardır. Örneğin, telomeraz aktivitesi Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) genindeki mutasyonlar yoluyla desteklenir, bu da hücreleri ölümsüz hale getirir ve akciğer kanseri gelişimi riskini artırır (McKay vd., 2008). Checkpoint Kinase 2 (CHEK2) ve Breast Cancer 2 (BRCA2) gibi DNA onarım genlerinde oluşan germ hattı mutasyonları akciğer kanserine karşı artan duyarlılığı daha da artırır.

Sigara içmek akciğer tümörü için en önemli çevresel risk olsa da, tüm sigara içenler bu hastalığa yakalanmaz. Bunun nedeni bireysel genetik çeşitlilikle açıklanmıştır. Belirli genetik polimorfizmler, karsinogenlerin metabolizmasını arttırarak veya sigara içenlerde DNA onarım yeteneğini azaltarak akciğer kanseri riskini arttırabilir. Örneğin, GSTT1 ve GSTM1 genlerindeki delesyonlar sigara dumanından gelen toksik maddelerin birikmesine yol açarak kansere duyarlılığı arttırabilmektedir (Hung vd., 2008). Onkogen mutasyonları, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu, DNA onarım genlerinin polimorfizmleri ve germ hattı mutasyonları bu hastalığa yatkınlık oluşturmanın genetik temelleridir. Çevresel faktörler (özellikle sigara içme) ile genetik duyarlılık arasındaki etkileşim, bireysel kanser risklerini belirlemek için çok önemlidir.

2.1.3. Histolojik Sınıflandırma

Günümüze kadar, akciğer kanseri tanısında altın standart yöntem, patoloji uzmanı tarafından, histolojik veya sitolojik örneklerin mikroskopik olarak değerlendirilmesi olmuştur. Gelişen moleküler tekniklerle birlikte, tanı ve tedavi aşamalarında moleküler testler kullanılarak daha spesifik sonuçlara ulaşılabilmektedir. Akciğer kanserinin tedavi ve prognozu, tümörün histolojik alt tipine göre önemli ölçüde değiştiği için akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması, hastalığın tanısı, tedavi stratejileri ve prognozunun belirlenmesinde kritik bir rol oynar. Akciğer kanseri histolojik olarak başlıca iki ana grupta sınıflandırılır: Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK). Bu iki ana grup, birbirinden farklı hücresel özelliklere ve klinik davranışa sahiptir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %85'ini oluşturur ve kendi içinde üç temel histolojik alt gruba ayrılır: adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom (Travis et al., 2015).

Adenokarsinom, en yaygın küçük hücreli dışı akciğer kanseri alt tipidir ve KHDAK vakalarının yaklaşık %40'ını oluşturur. Genellikle akciğerin periferik bölgelerinde gelişir ve sigara içmeyenlerde de görülebilir (Herbst et al., 2018). Adenokarsinom, glandüler yapılar oluşturur ve müsin salgılayan hücrelerden köken alır. (Herbst et al., 2018).

Skuamöz hücreli karsinom, KHDAK grubunun ikinci en yaygın alt tipidir ve genellikle ana bronşlarda gelişir. Bu kanser türü, sigara kullanımı ile doğrudan ilişkilidir (Travis et al., 2015). Histolojik olarak, skuamöz hücreli karsinom, keratinleşen hücreler ve hücrelerarası köprüler gibi skuamöz farklılaşma özellikleri gösterir (Herbst vd., 2018).

Büyük hücreli karsinom, KHDAK grubunun daha nadir görülen bir alt tipidir ve tüm akciğer kanserlerinin %10-15'ini oluşturur. Bu kanser türü, akciğerin herhangi bir bölgesinde gelişebilir ve hızlı büyüme eğilimi gösterir (Travis vd., 2015). Histolojik olarak, büyük hücreli karsinom, belirgin glandüler ya da skuamöz farklılaşma göstermeyen büyük, anaplastik hücrelerle karakterizedir. Tümör hücreleri genellikle büyük, poligonal şekilli, belirgin çekirdek ve bol sitoplazmaya sahiptir (Gazdar vd., 2017).

Yıllar içerisinde, moleküler tekniklerdeki gelişmelere bağlı olarak akciğer tümörlerinin sınıflandırılmasında önemli değişiklikler ve güncellemeler yapılmıştır. 2015 yılında yayımlanan DSÖ (Dünya Sağlık Örgütü) sınıflandırma kitabına yapılan güncellemeyle 2021 yılında oluşturulan akciğer tümörlerinin sınıflandırması kitabı, genetik ve moleküler hedefli tedavilerin anlaşılmasında kaydedilen ilerlemelere bağlı olarak birçok önemli değişiklik getirdi. Tablo 2.1. ve Tablo 2.2.'de ICD-O (International Classification of Diseases for Oncology) (Onkoloji İçin Uluslararası Hastalık Sınıflandırması) kodu ile birlikte yapılan güncel sınıflandırma yer almaktadır.

Tablo 2.1. Akciğer Tümörlerinin sınıflandırması; epitelyal tümörler, ICD-O (International Classification of Diseases for Oncology) kodu ile birlikte.

Epitelyal Tümörler	
1. Papillomalar	2. Adenomlar
Squamöz hücreli papillom, NOS – 8052/0	Sklerozan pnömokistom – 8832/0
Squamöz hücreli papillom, invert – 8053/0	Alveoler adenom – 8251/0
Glandüler papillom – 8260/0	Papiller adenom – 8260/0
Karışık squamöz hücreli ve glandüler papillom – 8560/0	Bronşiyolar adenom/siliyalı mükonodüler papiller tümör – 8140/0
	Müsinöz kistadenom – 8470/0
	Mukus bezi adenom – 8480/0
3. Prekürsör Glandüler Lezyonlar	4. Adenokarsinomlar
Atipik adenomatöz hiperplazi – 8250/0	Minimal İnvaziv Adenokarsinom
Adenokarsinoma in situ	Minimal invaziv adenokarsinom, nonmüsinöz – 8256/3
Adenokarsinoma in situ, nonmüsinöz – 8250/2	Minimal invaziv adenokarsinom, müsinöz – 8257/3
Adenokarsinoma in situ, müsinöz – 8253/2	İnvaziv Nonmüsinöz Adenokarsinom
	Lepidik adenokarsinom – 8250/3
5. Koloid adenokarsinom – 8480/3	Asiner adenokarsinom – 8551/3
6. Fetal adenokarsinom – 8333/3	Papiller adenokarsinom – 8260/3
7. Adenokarsinom, enterik tip – 8144/3	Mikropapiller adenokarsinom – 8265/3
8. Adenokarsinom, NOS – 8140/3	Solid adenokarsinom – 8230/3
9. Squamöz Prekürsör Lezyonlar	İnvaziv Müsinöz Adenokarsinom
Squamöz hücreli karsinom in situ – 8070/2	İnvaziv müsinöz adenokarsinom – 8253/3
Hafif squamöz displazi – 8077/0	Karışık invaziv müsinöz ve nonmüsinöz adenokarsinom – 8254/3
Orta squamöz displazi – 8077/2	
Şiddetli squamöz displazi – 8077/2	
10. Squamöz Hücreli Karsinomlar	11. Lenfoepitelyal karsinom – 8082/3
Squamöz hücreli karsinom, NOS – 8070/3	12. Büyük Hücreli Karsinomlar
Squamöz hücreli karsinom, keratinize – 8071/3	Büyük hücreli karsinom – 8012/3
Squamöz hücreli karsinom, nonkeratinize – 8072/3	13. Adenosquamöz Karsinomlar
Basaloid squamöz hücreli karsinom – 8083/3	Adenosquamöz karsinom – 8560/3
14. Sarkomatoid Karsinomlar	15. Pulmoner blastom – 8972/3
Pleomorfik karsinom – 8022/3	16. Karsinosarkom – 8980/3
Dev hücreli karsinom – 8031/3	17. Diğer Epitelyal Tümörler
İğsi hücreli karsinom – 8032/3	NUT karsinomu – 8023/3
	Torasik SMARCA4 eksikliği olan diferansiye olmamış tümör – 8044/3
18. Tükürük Bezi Tipi Tümörler	19. Akciğer Nöroendokrin Neoplazmaları
Pleomorfik adenom – 8940/0	Prekürsör Lezyon
Adenoid kistik karsinom – 8200/3	Yaygın idiyopatik nöroendokrin hücre hiperplazisi – 8040/0
Epitelyal-myoepitelyal karsinom – 8562/3	Nöroendokrin Tümörler
Mukoepidermoid karsinom – 8430/3	Karsinoid tümör, NOS/nöroendokrin tümör, NOS – 8240/3
Hyalinize olan berrak hücreli karsinom – 8310/3	Tipik karsinoid/nöroendokrin tümör, derece 1 – 8240/3
Myoepitelyoma – 8982/0	Atipik karsinoid/nöroendokrin tümör, derece 2 – 8249/3
Myoepitelyal karsinom – 8982/3	Nöroendokrin Karsinomlar
	Küçük hücreli karsinom – 8041/3
	Kombine küçük hücreli karsinom – 8045/3
	Büyük hücreli nöroendokrin karsinom – 8013/3
	Kombine büyük hücreli nöroendokrin karsinom

Tablo 2.2. Akciğer Tümörlerinin sınıflandırması (devam); epitelyal olmayan tümörler, ICD-O kodu ile birlikte.

Ektopik Dokuların Tümörleri	Akciğere Özgü Mezenkimal Tümörler
Melanom – 8720/3	Pulmoner hamartom – 8992/0
Meningiom – 9530/0	Kondroma – 9220/0
PEComatous Tümörler	Yaygın lenfanjiyomatozis – 9170/3
Lenfanjiomyomatozis – 9174/3	Plevropulmoner blastom – 8973/3
PEComa, benign – 8714/0	İntimal sarkom – 9137/3
PEComa, malign – 8714/3	Konjenital peribronşiyal miyofibroblastik tümör – 8827/1
Hematolenfoid Tümörler	EWSR1-CREB1 füzyonlu pulmoner miksomatoid sarkom – 8842/3
MALT lenfoması – 9699/3	
Diffüz büyük B hücreli lenfoma, NOS – 9680/3	
Lenfomatoid granülomatozis, NOS – 9766/1	
Lenfomatoid granülomatozis, derece 1 – 9766/1	
Lenfomatoid granülomatozis, derece 2 – 9766/1	
Lenfomatoid granülomatozis, derece 3 – 9766/3	
İtravasküler büyük B hücreli lenfoma – 9712/3	
Langerhans hücre histiyositozisi – 9751/1	
Erdheim-Chester hastalığı – 9749/3	

2.1.4. Evreleme

Akciğer kanserinde tanı koyulduktan sonra, hastalığın evrelendirilmesi en kritik adımlardan biridir. Evreleme, hastaların tedavi planını belirlemek için hayati bir rol oynar, çünkü kanserin hangi aşamada olduğu, hastalığın seyrini ve sağkalım oranlarını en çok etkileyen faktörlerden biridir. Güncel tedavi stratejileri, cerrahi müdahale, kemoterapi ve immünoterapi gibi seçenekler hastalığın evresine göre şekillenmektedir.

Akciğer kanserinde evreleme, Uluslararası Akciğer Kanseri Araştırmaları Derneği (IASLC), tarafından geliştirilen ve dünya çapında sürekli toplanan hasta verileriyle güncellenen TNM evreleme sistemine göre yapılmaktadır. Bu sistem, kanserin ciddiyetini, primer tümörün boyutu ve yayılımı (T), bölgesel lenf düğümlerine yayılım (N) ve uzak metastazların varlığı (M) temelinde sınıflandırmaya yardımcı olur. Güncel olarak kullanılan TNM evreleme sisteminin 8. versiyonu Tablo 2.3.'te verilmiştir. TNM evreleme sisteminin en son oluşturulan 9. versiyonu, 87.000'den fazla hastayı kapsayan kapsamlı araştırmaların ardından 2024 yılında uygulanmaya başlanacaktır (Asamura vd. 2023). Güncellenmesi önerilen maddeler, Tablo 2.3'de yer alan kriterlere eklenerek Tablo 2.4.'deki genişletilmiş 9. versiyonu geçerli olacaktır. Bu güncellemeler, evreleme sistemini küresel olarak daha hassas ve geçerli kılmayı amaçlamaktadır.

Tablo 2.3. Akciğer kanserinin evrenmesinde kullanılan TNM kriterleri (8th edition, IASLC, kaynağından düzenlenmiştir.)(WEB1, WEB2).

T-Primer tümör	
Tx	Primer tümör değerlendirilemiyor veya malign hücrelerin balgam ya da bronşiyal yıkama sıvısında gösterildiği ancak tümörün bronkoskopi veya görüntüleme yöntemleri ile saptanamadığı durumlar
T0	Primer tümör kanıtı yok
Tis	Karsinoma in situ (adenokarsinoma in situ ve skuamöz hücreli karsinoma in situ'yu kapsar)
T1	Ana bronş tutulumu olmadan akciğer veya visseral plevra ile çevrili, en geniş çapı ≤ 3 , bronkopik olarak lob bronşundan daha proksimalde invazyon bulgusu olmayan tümör (örn. Ana bronşta olmayan) ¹
T1mi	Minimal invaziv adenokarsinom ²
T1a	Tümörün en geniş çapı ≤ 1 cm ²
T1b	Tümörün en geniş çapı > 1 cm, ≤ 2 cm
T1c	Tümörün en geniş çapı > 2 cm, ≤ 3 cm
T2	Tümörün en geniş çapı > 3 cm, ≤ 5 cm; veya aşağıdaki özelliklerden en az birine sahip olan tümör ³
	* Karinayı invaze etmeden, karinaya uzaklığına bakılmaksızın ana bronşu tutan tümör
	* Visseral plevra invazyonu
	* Hiler bölgeye uzanan atelektazi veya obstrüktif pnömoni (atelektazi/pnömoni akciğerin bir bölümünü veya tümünü kapsayabilir)
T2a	Tümörün en geniş çapı > 3 cm, ≤ 4 cm
T2b	Tümörün en geniş çapı > 4 cm, ≤ 5 cm
T3	Tümörün en geniş çapı > 5 cm, ≤ 7 cm veya aşağıdaki yapılardan birine direkt invazyon;
	* Göğüs duvarı (superior sulkus tümörleri dahil), frenik sinir, parietal perikard
	* Primer tümörle aynı lobda nodül(ler)
T4	Tümörün en geniş çapı > 7 cm veya aşağıdaki yapılardan birine invazyon;
	* Diyafram, mediasten, kalp, büyük damarlar, trakea, rekürren laringeal sinir, özofagus, vertebra gövdesi, karina
	* Primer tümörle aynı akciğerde fakat farklı lobda nodül(ler)
1: Ana bronşun proksimaline uzanan, bronşiyal duvara sınırlı invazyon gösteren herhangi bir büyüklükteki nadir yüzeyel tümör yayımı da T1a olarak sınıflandırılır.	
2: Soliter adenokarsinom (3 cm'den daha büyük boyuttaolmayan), daha baskın olarak lepidik paternli ve herhangi bir odakta 5 mm'den daha büyük boyutta invazyona sahip olmayan	
3: Bu özellikleri ile T2 tümör; eğer ≤ 4 cm veya büyüklüğü belirlenemiyor ise T2a; eğer > 4 cm fakat ≤ 5 cm ise T2b olarak sınıflandırılır.	

Tablo 2.3. Devam Akciğer kanserinin evrenmesinde kullanılan TNM kriterleri (8th edition, IASLC, kaynağından düzenlenmiştir.)(WEB1, WEB2).

N-Bölgesel lenf bezleri	
Nx	Bölgesel lenf bezleri değerlendirilemiyor
N0	Bölgesel lenf bezi metastazı yok
N1	İpsilateral peribronşiyal ve/veya ipsilateral hiler lenf bezlerine ve/veya intrapulmoner lenf bezlerine metastaz veya direkt invazyon
N2	İpsilateral mediastinal ve/veya subkarinal lenf bezlerine metastaz
N3	Kontralateral mediastinal, kontralateral hiler, ipsilateral veya kontralateral skalen veya supraklavikuler lenf bezlerine metastaz

Tablo 2.3. Devam Akciğer kanserinin evrenmesinde kullanılan TNM kriterleri. (8th edition, IASLC, kaynağından düzenlenmiştir.)(WEB1, WEB2)

M-Uzak metastaz	
M0	Uzak metastaz yok
M1	Uzak metastaz var
M1a	Karşı akciğerde metastatik nodül(ler), plevral veya perikardiyal metastatik nodüller veya malign plevral veya perikardiyal efüzyon ⁴
M1b	Tek bir ekstratorasik organda, tek metastaz ⁵
M1c	Bir veya birden çok organda multipl ekstratorasik metastaz
<p>4: Akciğer kanseriyle birlikte olan çoğu plevral (perikardiyal) efüzyonlar tümöre bağlı gelişir. Bazı hastalarda multipl mikroskopik incelemelerde plevral (perikardiyal) sıvı tümör açısından negatif ve sıvı hemorajik ve eksudatif değildir. Bu bulgular varsa ve klinik değerlendirme efüzyonun tümörle ilgili olmadığı yönündeyse, efüzyon evreleme belirleyicisi olmaktan çıkarılmalıdır.</p>	
<p>5: Bu durum bölgesel olmayan tek bir uzak lenf bezi metastazını kapsar.</p>	

Tablo 2.4. Akciğer kanserinin evrenmesinde kullanılan TNM kriterlerinin önerilen 9. versiyonu (Asamura ve Nishimura, 2023).

N2						
T/M	Tanımlar	NO	N1	N2a	N2b	N3
T1	T1a: ≤ 1 cm	IA1	IIA	IIB	IIIA	IIIB
	T1b: >1 to ≤ 2 cm	IA2	IIA	IIB	IIIA	IIIB
	T1c: >2 to ≤ 3 cm	IA3	IIA	IIB	IIIA	IIIB
T2	T2a: Visseral plevra / santral invazyon	IB	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
	T2a: >3 to ≤ 4 cm	IB	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
	T2b: >4 to ≤ 5 cm	IIA	IIB	IIIA	IIIB	IIIB
T3	T3: >5 to ≤ 7 cm	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T3: İnvazyon	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
	T3: Aynı lobda tümör nodülü	IIIB	IIIA	IIIA	IIIB	IIIC
T4	T4: >7 cm	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
	T4: İnvazyon	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
	T4: Ipsilateral tümör nodülü	IIIA	IIIA	IIIB	IIIB	IIIC
M1	M1a: Plevral / perikardiyal yayılım	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1a: Kontralateral tümör nodülü	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1b: Tek ekstratorasik metastaz	IVA	IVA	IVA	IVA	IVA
	M1c1: Bir organ sisteminde multipl metastaz	IVB	IVB	IVB	IVB	IVB
	M1c2: Birden çok organ sisteminde multipl metastaz	IVB	IVB	IVB	IVB	IVB

2.2. Skuamöz Hücreli Akciğer Kanseri

Skuamöz hücreli akciğer kanseri (SHAK) aynı zamanda akciğerin skuamöz hücreli karsinomu olarak da bilinir ve KHDAK türlerinden biridir. KHDAK türleri arasında en yaygın olanı adenokarsinomdur, ardından skuamöz hücreli akciğer kanseri gelmektedir.

SHAK, hava yollarını kaplayan skuamöz hücrelerin dönüşümünden kaynaklanır. Skuamöz hücreler, insan vücudunun birçok organını kaplayan ince, düz hücrelerdir. Skuamöz hücreli akciğer tümörleri genellikle akciğerin merkezi kısmında, sol veya sağ bronş gibi primer hava yolunda oluşur ve hücresel dönüşümün birincil etkeni, 300'den fazla zararlı madde ve 40 potansiyel kanserojen içeren tütün dumanıdır (Drilon vd., 2012). Akciğerin skuamöz hücreli karsinomu için diğer risk faktörleri arasında yaş, aile öyküsü, pasif içicilik ve madenler, metal parçaları veya asbest gibi maddelere mesleki maruziyet yer alır.

Dönüştürülmüş skuamöz hücreler keratinizasyon ve hücreler arası köprülerle karakterize edilir ve genellikle yüksek mutasyon sıklığı gösterir (Sabbula vd., 2024). Tümör hücreleri genellikle bol miktarda yoğun sitoplazmaya, düzensiz hiperkromatik çekirdeklere ve küçük nükleollere sahip büyük hücrelerdir. Kötü diferansiye olmuş tümörlerde, bu özellikler yalnızca odak noktasında bulunabilir.

Klinik olarak, merkezi tümörlü hastalar atelektazi ve postobstrüktif pnömoniye sekonder öksürük, nefes darlığı ve ateşle gelebilir. Bununla birlikte, SHAK'ler lokal olarak agresif olma eğilimindedir ve uzak organlara metastaz, akciğer adenokarsinomlarına göre daha az sıklıkta görülmektedir (Drilon vd., 2012).

SHAK tanısı, incelenen biyopsi örneklerinin en az %10'unu keratinizasyon veya hücreler arası köprüler gibi dönüşüm özellikleri gösterdiğinde, histolojik inceleme ile doğrulanır. İmmünohistokimya (IHC) paneli ve mukin boyası, KHDAK alt tiplerini belirlemeye yardımcı olabilmektedir. Ayrıca SHAK örneklerinde p63 ve p40 proteinleri gibi skuamöz biyomarkerlerin güçlü şekilde ifadesi görülmektedir (Dietel vd., 2016).

2015 yılında Dünya Sağlık Örgütü, histolojik incelemeye dayanarak SHAK'nin sınıflandırmasını gözden geçirerek üç varyantını tanımlamıştır : Keratinize, keratinize olmayan, bazaloid bileşenin dokunun %50'sinden fazla olduğu ve skuamöz farklılaşma alanlarının minimal olduğu durumlarda; bazaloid (Travis vd., 2015). 2021 yılında

güncellenen sınıflandırmayla birlikte bazaloid karsinom, akciğerin skuamöz hücreli karsinomunun bir alt tipi olarak kalmıştır, ancak keratinize ve keratinize olmayan alt tiplerle birlikte aynı bölümde yer almaktadır. Lenfoepitelyal-benzeri karsinom, dördüncü baskıda "diğer ve sınıflandırılmamış karsinomlar" başlığı altında yer alırken, şimdi lenfoepitelyal karsinom olarak adlandırılmakta ve skuamöz hücreli karsinomun bir türü olarak sınıflandırılmaktadır (Nicholson vd., 2022).

2.2.1. Skuamöz Hücreli Akciğer Kanserinin Genomik Yapısı

Moleküler düzeyde SHAK'ler, yüksek genetik mutasyon oranı ve kromozomal instabilite ile karakterizedir (Lau vd., 2022). Bununla birlikte, belirli alt gruplarda zenginleşen mutasyonlar da mevcuttur. SHAK'lerde yaygın kromozomal anomali patternlerini;

- I. Skuamöz hücre farklılaşma yollarının ekspresyonu (NOTCH, SOX2, TP63),
- II. Hücre döngüsü kontrolünün kaybı (TP53, RB1, CDKN2A, MYC),
- III. RAS ve PI3K yolları aracılığıyla onkojenik sinyalin artışı,
- IV. Epigenetik düzenleyicilerdeki anormallikler (KMT2D, NSD1, KDM6A)

olarak gruplandırabiliriz (Dotto ve Rustgi, 2016; Drilon vd., 2012; Sánchez-Danés ve Blanpain, 2018, Lau vd., 2022).

Neredeyse tüm SHAK vakalarında TP53'ün somatik mutasyonu görülmektedir (Niu vd., 2022). Kromozom 3q26 ve 3q28 arasındaki amplifikasyon, SHAK için belirleyici bir özelliktir, bu bölgede SOX2 ve TP63 gibi anahtar skuamöz hücre farklılaşma belirteçleri bulunur (Heist vd., 2012). Bu amplifikasyon, kanser hücrelerinin hayatta kalma ve çoğalma için aşırı ifade edilen genlere bağımlı hale geldiği onkogen bağımlılığı ile ilişkilidir (Niu vd., 2022). Ayrıca, diğer önemli amplifikasyon bölgeleri arasında 8p11 (FGFR1, WHSC1L1), 7p11 (EGFR), 11q13 (CCDN1) ve 4q12 (KDR, KIT, PDGFRA) yer almaktadır (Kim vd., 2014, (Niu vd., 2022). EGFR mutasyonları SHAK vakalarının %7'sinde bulunmasına rağmen, ekzon 19 delesyonları veya Leu858Arg substitüsyonu gibi aktive edici mutasyonlar yerine bu mutasyona uğramış genler, CDKN2A/RB1, NFE2L2/KEAP1/CUL3, PI3K/AKT ve SOX2/TP63/NOTCH1 yollarında meydana gelen değişikliklere yol açar (Heist vd., 2012; Kim vd., 2014).

Son yıllarda yapılan moleküler genetik çalışmalarla birlikte karsinomların genetik yapısı ve köken aldığı transforme olmuş hücrelerin genetik yapısı, tanıdan tedaviye kadar uzanan yelpazede önem kazanmıştır. Bu bağlamda SHAK'nin köken aldığı hücreler üzerine çeşitli araştırmalar yapılmıştır. SHAK'lerin köken hücrelerinin, bazal benzeri kök hücreler (BSC'ler), alveolar tip 2 (AT2) hücreleri ve kulüp (eskiden Clara olarak adlandırılan) hücreleri olabileceğini ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (Lau vd., 2022).

BSC'ler, kendini yenileme ve terminal olarak farklılaşmış hücreler üretme yetenekleri ile karakterize edilmektedir (Rock vd., 2009). Sigara içenlerin akciğer dokularından izole edilen insan BSC'lerinin, AT2 hücreleriyle karşılaştırıldığında, DNA hasar onarım genlerinin (DDR) ve telomer tamir genlerinin yukarı regülasyonu da dahil olmak üzere artmış DNA onarım kapasitesi özelliklerine sahip olduğu bulunmuştur (Weeden vd., 2017). Ayrıca, iyonlaştırıcı radyasyon veya bleomisin gibi DNA hasarı indükleyicilerine maruz kaldığında, BSC'lerin onarım için tercihen homolog olmayan uç birleştirmeyi (NHEJ) kullandığı bulunmuştur (Weeden vd., 2017). Buna karşın AT2 hücreleri, aynı stres faktörlerine maruz kaldıklarında, daha sık apoptoz geçirir. Bu nedenle, sigara içiminden kaynaklanan hasarın BSC'lerde hataya eğilimli NHEJ aracılığıyla onarılmasının, yüksek mutasyon yüküne ve SHAK'lerde kötü huylu skuamöz dönüşüme yol açmasının muhtemel olduğu öngörülmüştür (Lau vd., 2022).

İnsan SHAK'lerinde tanımlanan en geçerli moleküler değişiklik, artan SOX2 ekspresyonudur. Ancak SOX2 aşırı ekspresyonu, tek başına maligniteyi indüklemeye yetersizdir (Lu ve ark., 2010). LKB1 kaybı olan farelerde, lentivirüs tarafından indüklenen SOX2 aşırı ekspresyonu (Lenti-Sox2/LKB1^{ff} modeli) SHAK'lerin gelişimine yol açmıştır (Mukhopadhyay vd., 2014). Bu çalışmadaki tümörler, insan SHAK'leriyle benzer bir şekilde K5, K14 ve P63 belirteçlerini ifade etmiştir ki bu da onları bazal hücrelerle ilişkilendirmektedir. Ferone ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada, PTEN ve CDKN2A/B'nin biallelik inaktivasyonu olan fare bazal hücrelerinde, SOX2'nin seçici aşırı ekspresyonu farelerin %73'ünde SHAK oluşumuna yol açmıştır (Ferone vd., 2016). Geri kalanlar da bronşlarda ve bronşiyollerde skuamöz farklılaşma ile atipik hiperplazi göstermiştir. İlginç bir şekilde, aynı deneysel yöntemle, inaktif PTEN ve CDKN2A/B ile birlikte SOX2 aşırı ekspresyonu sonucunda kulüp hücrelerinde ve alveolar tip 2 (AT2) hücrelerinde de SHAK oluşumu gözlemlenmiştir. Bu tümörlerin ayrıca bazal hücre benzeri bir protein ekspresyon profiline (SOX2, P63 ve K5) sahip olduğu açıklanmıştır (Ferone vd., 2016). Çalışmadaki tümörlerin konumu da periferik

olma eğiliminde olduğu için periferik olarak yerleşmiş SHAK'lerin AT2 ve kulüp hücrelerinden köken almış olabileceği öne sürülmüştür.

Sonuç olarak, SHAK'nin genomik yapısındaki karmaşıklık ve hücresel kökeni, tümör gelişimi ve ilerlemesi açısından önemli ipuçları sunmaktadır. SHAK'lerde sıklıkla gözlemlenen kromozomal anomaliler ve mutasyonlar, skuamöz hücre farklılaşmasını, hücre döngüsü kontrolünü, onkojenik sinyalleşmeyi ve epigenetik düzenleyicileri içeren bir dizi biyolojik süreci etkileyerek kanserin patogenezi şekillendirir. Bu hücresel plastisitenin ve genetik değişikliklerin anlaşılması, yalnızca hastalığın patolojik seyrini anlamamıza yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda hedefe yönelik tedavi stratejilerinin geliştirilmesi ve direnç mekanizmalarının anlaşılması açısından da büyük önem taşır.

2.3. Endoplazmik Retikulum Stresi

Endoplazmik retikulum (ER), salgılanan ve transmembran proteinlerin sentezlendiği, katlandığı ve değiştirildiği merkezi bir organeldir. Bu süreç mükemmel bir şekilde düzenlenmesine rağmen, birden fazla dış faktör ve hücresel olaylar bu organelin protein katlama kapasitesini bozabilir ve yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesiyle karakterize bir ER stresi durumunu tetikleyebilir (Chen & Cubillos-Ruiz, 2021).

Memeli hücrelerinde, üç ER transmembran proteini ER stresinin sensörleri olarak işlev görür, Activated Transcription Factor 6 (ATF6), Inositol-Required Enzyme 1 (IRE1 α) ve PKR Like ER Kinase (PERK) (Hetz vd., 2020). Proteostaz koşulları altında, Binding Immunoglobulin Protein (BIP/GRP78/HSPA5) bu sensörlere bağlanır ve onları inaktif bir durumda tutar (Walter & Ron, 2011). ER stresi sırasında, BIP yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinler için daha yüksek afiniteli bağlanma gösterir ve bu nedenle sensörlerden ayrılır. Bu olay, stres sensörlerinin aktivasyonunu ve sonrasında katlanmamış protein tepkisinin (UPR ya da ER stres tepkisi olarak da bilinir) indüklenmesini sağlar. Bu süreç, transkripsiyonel yeniden programlama ve mRNA bozunumu, translasyonun azaltılması, yanlış katlanmış proteinlerin ER ile ilişkili protein yıkımı (ERAD) sistemi yoluyla uzaklaştırılması, yanlış katlanmış proteinlerin ve hücresel

materyallerin otofaji indüksiyonu yoluyla geri dönüştürülmesi gibi çoklu mekanizmalar yoluyla ER homeostazını sağlamaya yönelik adaptif bir mekanizmadır (Chen & Cubillos-Ruiz, 2021). UPR esas olarak üç rol oynar: ER stresini azaltmak ve ER homeostazisini yeniden kurmak (uyarlanabilir yanıt), ER homeostazisi yeniden sağlandığında UPR'yi bloke etmek (geri bildirim kontrolü), devamlı ve yüksek ER stresi durumunda apoptozun düzenlenmesi (Bonsignore vd., 2023).

Hafif ER stresi, Activating Transcription Factor 4'e (ATF4) bağlı hayatta kalma (pro-survival) genlerinin ekspresyonuna ve PERK'in geçici ve sınırlı aktivasyonuna neden olur. Şiddetli ER stresi sırasında, sürekli PERK sinyallemesi Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha (EIF2 α)'nın fosforilasyonunu indükler ve bu da ATF4'ün translasyonunu artırır (Han vd., 2013). ATF4, promotör bölgesine bağlandığı ve C/EBP homolog protein (CHOP/DDIT3) mRNA ekspresyonunu ve dolayısıyla protein seviyelerini arttırdığı bilinen bir transkripsiyon faktörüdür (Bhat vd., 2017). CHOP, ER stres kaynaklı hücre ölümünde önemli bir rol oynar çünkü bu faktör üç apikal ER stresi sensörü reseptörünün hepsinin ortak hedef genidir.

Şiddetli ER stres koşulları altında, ATF4 ve CHOP birlikte etkileşir ve Growth Arrest and DNA Damage Gene 34 (GADD34,) ve ER oxidoreductase 1 alpha (ERO 1 α) gibi protein sentezinde yer alan genlerin indüksiyonu yoluyla hücre ölümünü başlatır (Chen & Cubillos-Ruiz, 2021).

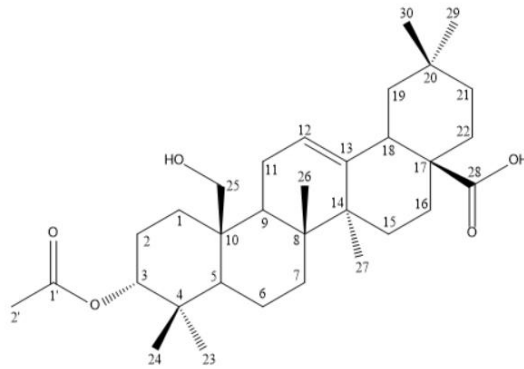
Sonuç olarak, ER stresi, hücrelerin proteostazı sürdürme kapasitesini bozan çeşitli faktörler sonucunda tetiklenebilen karmaşık bir hücresel yanıt mekanizmasıdır. Bu çift yönlü yanıt, ER stresinin ciddiyetine bağlı olarak hücre kaderini belirlemekte ve dolayısıyla hem sağlıklı hücrelerde hem de özellikle kanser gibi patolojik durumlarda önemli bir rol oynamaktadır.

2.4. 3a-Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit

3a-Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit molekülü, 118Z417 nolu TÜBİTAK projesinde, *Liquidambar orientalis* var. *integriloba* yapraklarından, meyve ve reçinesinden izole edilen bileşiklerin yapı aydınlatma çalışmaları sırasında, Muğla Sıtkı

Koçman Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. M. Emin Duru ve çalışma ekibi tarafından atanmıştır ve çalışmamızda MBH-1 olarak kodlanmıştır (Şekil 2.1.).

Liquidambar orientalis var. *integriloba*, Anadolu sığla ağacının (*Liquidambar orientalis*) bir alt türü olup, özellikle Muğla ve Denizli olmak üzere Türkiye'nin güneybatı bölgelerine özgü, relik endemik bir ağaç türüdür (Duru vd., 2002). *Hamamelidaceae* (*Altingiaceae*) familyası altında sınıflandırılmıştır. Tür, genellikle nehirlerin yakınındaki bataklık alanlarda bulunan Akdeniz iklimlerinde gelişir. Geleneksel olarak anti-inflamatuar amaçlar ve parfümeride kullanılan tıbbi reçinesi, sığla yağı nedeniyle değerlidir (Arslan & Şahin, 2021). Anadolu sığla ağacı, Tersiyer döneminden kalma bir kalıntı olarak kabul edilir ve bu da onu bitki evrimini ve antik ekosistemleri anlamak için önemli bir tür haline getirir (Öztürk vd., 2008). *Liquidambar* türleri, balzamik sıvıntılılarıyla bilinmektedir. Türkiye'de sığla ağacı veya günlük ağaç olarak bilinen *L. orientalis* Mill., Türkiye'nin güneybatı kıyı bölgelerinde (Köyceğiz, Fethiye, Marmaris ve Milas) yetişmektedir (Duru vd., 2002). Dört *Liquidambar* türü bildirilmiş olup bunlardan biri Türkiye florası ve Doğu Ege Adaları'nda bulunmaktadır. Türkiye'de yetişen bu türün *L. orientalis* var. *orientalis* ve *L. orientalis* var. *integriloba* olarak bilinen iki çeşidi bildirilmiştir (Arslan & Şahin, 2021). *Liquidambar* türlerinden elde edilen yağ üzerine yapılan ilk çalışmalar 16. yüzyılda başlamıştır ve günümüze kadar detaylanarak devam etmiştir.



Şekil 2.1. 3a-asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asitin moleküler yapısı.

MBH-1, *Liquidambar* türlerinden izole edilen bir oleanolik asit türevidir. Dat ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptığı *L. formosana* meyvelerinden lantanolik asit, oleanolik asit, MBH-1 ve liquidambarik asit isimleriyle dört oleanan triterpenoid izole ettikleri çalışma MBH-1 ile ilgili literatürde karşımıza çıkan ilk çalışmadır. Bu çalışmada,

araştırılan bileşiklerden, MBH-1'in (IC50: 4.63 μ M) ve lantanolik asitin (IC50: 12.62 μ M) NFAT transkripsiyon faktörüne karşı güçlü inhibisyon aktivitesi gösterdiği rapor edilmiştir.

2008 yılında Sun vd. tarafından yapılan bir çalışmada (Sun vd., 2008) *Liquidambar styraciflua*'dan izole edilen moleküllerden biri 25-asetoksi-3a-hidroksiolean-12-en-28-oik asit olarak atanmıştır. Sun vd., tarafından yapılan bu yayının tartışmasında, yapının yanlış atandığı ve 3a-asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit olarak revize edilmesi gerektiği, 2004-2006 yıllarında yapılan iki yayında (Fukuda vd., 2006; Sakai vd., 2004), 25-asetoksi-3a-hidroksiolean-12-en-28-oik asit olarak atanan yapıların da düzeltilmesi gerektiği çünkü Fukuda vd. tarafından adlandırılan yapının kimyasal olarak 3a-asetoksi ve 25-hidroksi yapısına daha uygun olduğu öne sürülmüştür.

Yapı ve adlandırma çalışmalarının yanısıra, MBH-1'in kanser hücrelerine etkisi ve etkilediği moleküler mekanizmalarla ilgili de literatürde bilgi açığı mevcuttur. Bahsedilen çalışmalarda daha çok kimyasal yapıya ilişkin bilgiler yer alırken, MBH-1'in *in vitro/ in vivo* etkileri deney sonuçlarıyla etkin bir şekilde literatüre sunulmamıştır.

2.5. Hipotez

3a-Acetoxy-25-hydroxy-olean-12-en-28-oik asit, skuamöz hücreli akciğer kanseri hücre hatları, SK-MES-1 ve H520 için anti-kanser özellik gösterebilir ve bu hücreler üzerinde, tümörleşmede etkili olan moleküler yollarda değişimlere sebep olabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. 3a-Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asitin Sitolojik Etkisinin Çevrimiçi Prediktif Veri Tabanlarında Analiz Edilmesi

MBH-1 molekülünün hücreler üzerindeki olası etkileri ve etkilediği moleküler mekanizmalarla ilgili ön bilgi edinebilmek amacıyla PASS veritabanından yararlanıldı.

“Way2Drug PASS Online (Prediction of Activity Spectra for Substances)”, biyoinformatik alanında kullanılan bir çevrimiçi platformdur. Bu araç, kimyasal bileşiklerin biyolojik aktivitesini tahmin etmeye yardımcı olur. Bileşiklerin farmakolojik potansiyelini belirlemek için yapay zeka ve istatistiksel yöntemler kullanır. Platform, kimyasal yapı verilerini kullanarak bir bileşiğin farmakolojik etkisini ve biyolojik hedeflerini tahmin edebilir. Bu sayede PASS Online bir bileşiğin farklı biyolojik aktivitelerini (örneğin, anti-kanser, anti-inflamatuar, anti-mikrobiyal) tahmin edebilir ve kimyasal yapıları temel alarak, potansiyel farmakolojik etkiler hakkında bilgi sağlayabilir.

Kullanıcılar kimyasal yapılarını MARVIN, SMILES, SDF gibi formatlarda yükleyebilir ve sonuçları kolayca görebilir. Tahminler, hem Pa (probability of activity, aktivite olasılığı) hem de Pi (probability of inactivity, inaktivite olasılığı) değerleriyle gösterilir. Bu değerler, belirli bir biyolojik aktivitenin gerçekleşme olasılığını ifade eder.

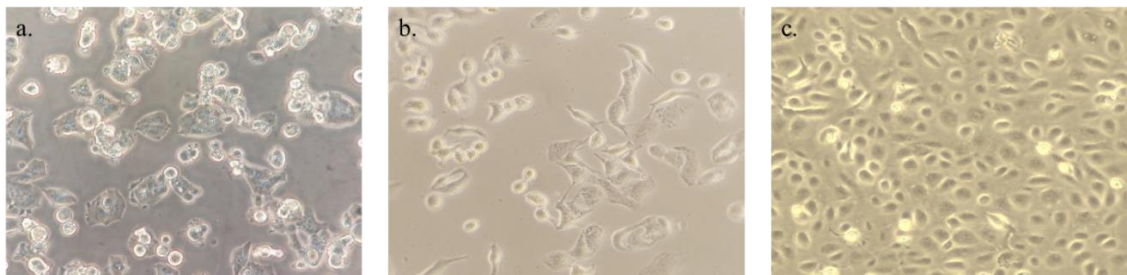
MBH-1 molekülünün kimyasal yapısı veritabanına çizildi ve biyolojik aktivitelerinin tahminleri Pa, Pi değerleriyle ortaya koyuldu.

3.2. 3a-asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asitin Hazırlanması

3a-Asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mehmet Emin Duru tarafından temin edildi. Beyaz renkli, kuru toz halindeki 1 mg MBH-1 (mA: 514,74), 100 µl DMSO (Lot No: Q7202090, Biobasic) içerisinde çözüldü. Üzerine 900 µl besiyeri eklenerek 1 mg/ml (~2 milimolar) olarak ana stok oluşturuldu. Hürelere doz uygulaması sırasında MBH-1, küçük dozlarda pipetaj hatalarını elimine etmek için tüm deneylerde ana stoktan besiyeri ile 1:10 dilüsyon yapılarak kullanıldı.

3.3. Hücre Kültürü

Çalışmada kullanılan skuamöz hücreli akciğer kanseri (SHAK) hücre hattı H520 (HTB-182™, NCI-H520, LOT: 70031133, ATCC) ticari olarak temin edildi (Şekil 3.1a.). SHAK hücre hattı SK-MES-1 (HTB-58™, ATCC) stoklarımızdan kullanıldı (Şekil 3.1b.). SHAK hücre hatlarıyla kontrol olarak karşılaştırmak üzere, normal akciğer bronşiyal epitel hücre hattı olan BEAS-2B (CRL-3588™, ATCC) Tıbbi Biyoloji AD. öğretim üyesi Prof. Dr. Yavuz Dodurga tarafından temin edilerek bizimle paylaşıldı (Şekil 3.1c.). Hücre hatlarının özellikleri ve karakter bilgileri Tablo 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının mikroskopik görüntüsü (20X büyütme), a. H520 hücre hattı, b. SK-MES-1 hücre hattı, c. BEAS-2B hücre hattı.

Hücrelerin kültürizasyonu, % 10 fetal bovine serum (FBS, Kat No: FBS-HI-22B, Capricorn) ve % 0,5'lik penisilin/streptomisin (Lot No: 2441870, Gibco) eklenen, H520

için, RPMI 1640 (Lot No: CP22-5491 Capricorn); SK-MES-1, BEAS-2B için DMEM (Lot No: CP22-6412, Capricorn) besiyerinde, 37°C’de, %5 CO₂ ve %95 nemli hava içeren şartlarda gerçekleştirildi. Hücreler çoğaltıldı, pasajlandı ve dondurularak hücre stokları saklandı. Hücre tripsinizasyonu %0.05 Trypsin, 0.03 EDTA (Lot No: CP22-5251, Capricorn) ile yapıldı. Bu aşamada hücrelerin yıkama işlemi steril 1x fosfat tamponlu tuzlu su (Phosphate Buffered Saline, PBS) ile yapıldı.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan hücre hatlarının özellikleri ve karakter bilgileri.

Özellikler	H520 (NCI520-ATCC® HTB-182™)	SK-MES-1 (ATCC® HTB-58™)	BEAS-2B (ATCC® CRL-3588™)
Organizma	İnsan (<i>Homo sapiens</i>)	İnsan (<i>Homo sapiens</i>)	İnsan (<i>Homo sapiens</i>)
Doku	Akciğer	Akciğer	Akciğer / bronş
Hücre Tipi	Epitel	Epitel	Epitel
Morfoloji	Epitelyal	Epitelyal	Epitelyal
Kültür Özelliği	Adherent	Adherent	Adherent
Hastalık	Skvamöz Hücreli Akciğer Kanseri	Skvamöz Hücreli Akciğer Kanseri	Normal
Yaş-cinsiyet-Etnik köken	Erkek, yaş belirtilmemiş, Avrupalı	Erkek, 65 yaş ,Avrupalı	Erkek, yaş ve etnik köken belirtilmemiş

Hücrelerin sayımı Tripan mavisi dışlama yöntemi ile yapıldı. Bu yöntemde, canlı hücreler boya almazken, ölü hücreler Tripan mavisini geçirir ve mavi renkte görünür, bu sayede canlı ve ölü hücreler ayırt edilebilir. Hücre sayımı yapmak için, tripsinize edilen ve 100 xg’de 5 dakika santrifüj edilerek üst sıvı fazı atılan hücre pelleti 1 ml besiyeri ile homojenize edildi. 50 µl Tripan mavisi ile 50 µl hücre süspansiyonu 1:1 oranında, pipetaj yapılarak karıştırıldı. Bu karışımdan 10 µl alınarak, lamelle kapatılan Neubauer lamına yüklendi. 10x büyütmede, mikroskopta sayımı yapıldı. 1 ml hücre süspansiyonundaki

canlı hücre sayısı, “Hücre Konsantrasyonu (hücre/ml) = (Hücre sayısı x 10^4 x Seyreltme faktörü)” formülüyle hesaplandı.

Hücre kültürü deneylerinde kullanılmak üzere sayımı yapılan hücrelerin, istenen sayıda ve eşit miktarlarda ekimlerinin yapılması için “gereken hücre süspansiyonu = kuyucuk sayısı x (ekilmek istenen hücre sayısı / sayılan total hücre sayısı)” formülüyle hesaplamaları yapıldı. Her bir kuyucuğa eşit miktarda besiyeri ve hücre dağıtıldı.

Hücre dondurma işlemi ise hücrelerin PBS ile yıkanmasının ve tripsinizasyonunun ardından 100 xg’de 5 dakika santrifüjlenerek üstteki besiyerinin atılması ve %5 DMSO içeren besiyeri ile hücrelerin homojenize edilerek steril kriyojenik tüplere 1 ml miktarında paylaşılması ve -80 °C’de saklanması şeklinde gerçekleştirilmiştir.

3.4. Sitotoksosite ve Hücre Canlılığı Deneyleri

MBH-1 molekülünün etkin dozunu belirlemek için, hücreler sayılarak 96 kuyucuklu plakalara (plate), her birinde 2×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. MBH-1 ana stoğu besiyeri ile 1:10 seyreltildi. Her bir kuyucukta 100 µl besiyeri ve ilaç karışımı olacak şekilde, MBH-1’den 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50 µl alınarak 0, 24, 48, 72 saat olarak hücre hatlarına uygulandı. Besiyeri ve ilaç karışımındaki DMSO konsantrasyonu %0.5’den küçük olarak ayarlanarak DMSO’toksitesini elimine edildi. Kontrol için aynı miktarlarda sadece DMSO içeren kuyucuklar da eklendi. CVDK-8 (Cell Viability Detection Kit-8, NutriCulture) kullanılarak hücre canlılığı Promega Glomax-Multi Microplate Reader cihazında ölçüldü. Kitin protokolüne göre 10 µl kit reaktifi eklenerek, 96 kuyucuklu plaka 2 dakika orbital olarak karıştırıldı ve 10 dakika inkübasyondan sonra Promega Glomax-Multi Microplate Reader cihazında 450 nm dalga boyunda absorbansı ölçüldü. Sonuç değerleri GraphPad Prism 8 programında normalize edilip işlenerek IC50 (%50 inhibitör konsantrasyonu) değerleri ve grafikleri saptandı. SK-MES-1, H520 skuamöz hücreli akciğer kanseri hücre hatları için IC50 aralığında fakat kontrol hücre hattı BEAS-2B için letal olmayan optimum doz belirlendi ve sonrasında bu dozla deneylere devam edildi.

3.5. Apoptoz Deneyi

MBH-1'in H520, SK-MES-1 ve BEAS-2B hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisini araştırmak amacıyla Annexin V- FITCH/PI apoptoz kitiyle (Elabscience, kat no: E-CK-A211) alışıldı.

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu translokasyon, hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Annexin V, PS ile kalsiyuma bağımlı bir şekilde bağlanan annexin ailesinin bir üyesidir. FITC ile konjuge edilmiş formatta olan Annexin V-FITC, apoptotik hücre zarındaki fosfatidilserine özel olarak bağlanır ve akış sitometrisi veya floresan mikroskopi ile tespit edilebilir. Zar bütünlüğünün kaybı nedeniyle, PI (propidyum iyodür), geç apoptotik veya nekrotik hücelere girerek DNA'yı boyayabilir. Annexin V ve PI kullanılarak farklı apoptoz aşamalarındaki hücreler ayırt edilebilir.

Kitin protokolü doğrultusunda, tüm apoptotik ve nekrotik hücreleri tespit edebilmek amacıyla hücrelerin besiyeri bir falkon tüpte toplandı, ardından adherent hücreler tripsinize edilerek toplanan besiyerinin olduğu falkon tüpte birleştirildi ve 100 xg'de 5 dakika santrifüjlendi. Besiyeri ve tripsin karışımı aspire edildi ve iki kez nazikçe PBS ile yıkandı. 1×'e seyreltilmiş 500 µl Annexin V Binding Buffer alışma solüsyonu eklendi. 5 µL floresan etiketli Annexin V ve 5 µL PI nükleer boyama solüsyonu eklendi. Hafif pipetaj yapıldı ve karanlıkta oda sıcaklığında 15-20 dakika inkübe edildi. Ardından floresan mikroskopta hücreler, MBH-1 verilen ve verilmeyen hücreler olmak üzere görüntüleri alınarak incelendi.

3.6. Yara İyileşme (wound healing) Deneyi

MBH-1'in H520, SK-MES-1 ve BEAS-2B hücrelerinin migrasyonuna etkisi yara iyileşme deneyi ile incelendi. Hücreler sayılarak her bir kuyucukta 1×10^5 hücre olacak

şekilde 12 kuyucuklu plakalara ekildi ve gece boyunca 37 °C'de %5 CO₂ ile kültüre edildi. %80 konfluent olan nihai hücre tabakası, steril bir 10 µl pipet ucu ile orta hattından yavaş ve nazikçe çizildi, yüzen hücreler PBS ile uzaklaştırılarak 1 ml besiyeri eklendi. Daha sonra hücrelere (0,24,48,72. saatlerde) nihai konsantrasyonu 48µM (72. saat IC50 dozu) olacak şekilde MBH-1 uygulandı, hücre proliferasyonunun ve yara izinin görüntüleri 0, 24, 48, 72. saatlerde alındı. Hücrelerin MBH-1 uygulanan tedavi grubu ile MBH-1 uygulanmayan kontrol grubunun migrasyon durumları, yara izinin kapanma durumuna bakılarak değerlendirildi. Yara iyileşme analizleri, ImageJ programının yara iyileşme analizleri için geliştirilen eklentisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Suarez-Arnedo vd., 2020).

3.7. Soft Agar Koloni Oluşturma Deneyi

Soft agar koloni oluşturma deneyi için, Noble agar (Lot No: 2F77602, Bioshop) ile %1,2'lik agar solüsyonu hazırlanarak otoklavlandı. Hazırlanan agar, otoklavdan sonra 45°C su banyosuna alınarak soğutuldu. Alt tabaka için %1,2'lik agardan 1:2 olacak şekilde (%0,6) agar ve besiyeri karıştırıldı. 6-kuyucuklu plaka için her bir plakaya karışımdan 1 ml koyuldu ve oda sıcaklığında katılaşması için bırakıldı.

Hücreler sayıldı ve her bir kuyucuk için %1,2'lik agar, 5×10^4 hücre içeren besiyeri ile 1:4 oranında karıştırıldı ve bu karışımdan kuyucuklara 1 ml eklendi. 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre koyulmadan önce 30 dakika kabinde bekletildi. 3 hafta boyunca, iki günde bir, besiyeri eklendi ve deney gruplarına haftada bir kere 48µM MBH-1 eklenerek kültürizasyonu yapıldı. 21 gün sonra %0.1 toluidine blue boyası ile boyanarak koloni oluşumları mikroskopta incelenerek fotoğraflandı ve sayımları yapılarak grafiğe dönüştürüldü.

3.8. Total RNA İzolasyonu

Belirlenen IC50 dozu verilen H520, SK-MES-1 ve BEAS-2B hücrelerinden, 24 saat sonra total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonu PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™ Kat. No: 12183018A) kullanılarak kitin protokolüne uygun olarak yapıldı.

I. Besiyeri hücrelerden uzaklaştırıldı. Örneklere 2-merkaptoetanol ile uygun hacimde Lysis Buffer eklendi. Birkaç kez pipetaj yapıldı ve 12.000x'de 2 dakika santrifüjlendi.

II. RNaz içermeyen bir tüpe 1,5 hacim %100 etanol ve hücre lizatı eklenerek vortekslendi.

III. 700 µl'ye kadar örnek, içinde spin kolonu olan tüpe aktarıldı. Oda sıcaklığında 15 saniye 12.000xg'de santrifüjlendi. Kolondan geçen kısım döküldü ve aynı toplama tüpüne yeniden takıldı. Örnek bitene kadar bu basamak tekrarlandı.

IV. Spin kolonuna 700 µl Washing Buffer I eklendi. Oda sıcaklığında 15 saniye 12.000xg'de santrifüjlendi. Kolondan geçen sıvı ve toplama tüpü atıldı. Spin kolonu yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.

V. 500 µl Washing Buffer II eklendi. Oda sıcaklığında 15 saniye 12.000xg'de santrifüjlendi. Kolondan geçen kısım döküldü ve aynı toplama tüpüne yeniden takıldı. Son adım bir kez daha tekrarlandı.

VI. Spin kolonu ve toplama tüpüyle birlikte 12.000xg'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpü atıldı ve spin kolonu bir elüsyon tüpüne yerleştirildi.

VII. Spin kolonunun merkezine 30 µl nükleaz içermeyen su eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Oda sıcaklığında 2 dakika 12.000xg'de santrifüjlendi.

İzole edilen total RNA örneklerinin ölçümleri Nanodrop 2000 (Thermo Fisher, ABD) cihazında yapılarak 260/280 oranı 2.0 ve üzeri, konsantrasyonları 500ng/µl ile 800 ng/µl arasında olduğu belirlenerek mRNA sekans hizmet alımı için Gen Era Diagnostik firmasına gönderildi.

3.9. mRNA Dizileme (Sekans) Analizlerinin Yapılması

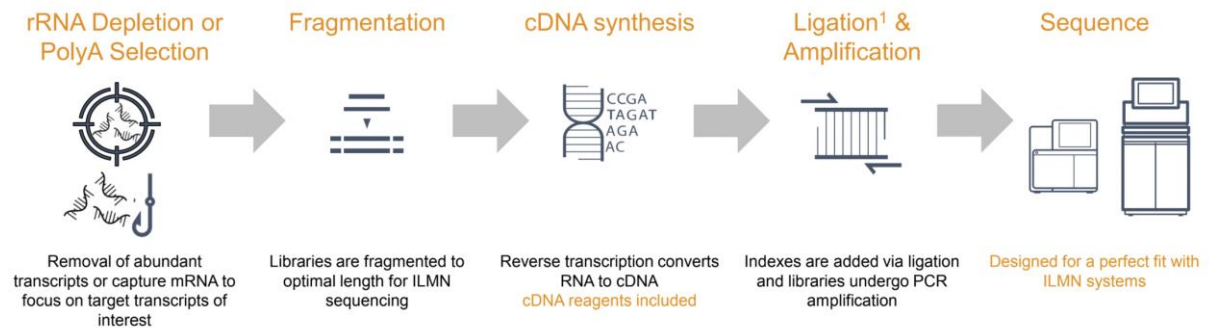
Proje kapsamında, H520, SK-MES-1, BEAS-2B hücre hatlarında, MBH-1 verilen ve verilmeyen olmak üzere seçilen 6 numunenin gen ekspresyon profilinin çıkarılması hedeflenmiştir. Bu amaçla yeni nesil dizileme yöntemi ile RNA dizileme işlemi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda, her bir numunedeki genlerin ekspresyon profilleri tespit edildi ve seçilen gruplar istatistiksel yöntemlerle karşılaştırılarak anlamlı değişkenlik gösteren gen, gen ontolojisi ve yolakları raporlandı.

Numune Kalite Kontrol

İzole edilmiş RNA materyaline ait kalite kontrol işlemlerinde florometrik ve kapiler elektroforez yöntemleri kullanılarak, miktar, saflık ve yapısal bütünlük tayini yapıldı. Ölçümlerde Qubit 3 florometresi (Thermo Fisher, ABD, #Q33216) ve 2100 Bioanalyzer (Agilent, ABD, #G2939BA) (veya alternatif olarak 4200 TapeStation) kullanıldı.

Kütüphane Hazırlığı

İzole edilmiş RNA materyalinin kütüphane hazırlığında, Illumina Stranded mRNA Prep kiti (Illumina, ABD, #20040534) kullanıldı. Kit, tüm RNA içindeki hedeflenen mRNA'ların poly-A kuyruklarından yakalanması, rastgele parçalanması ve ardından birincil ve ikincil cDNA zincirlerinin oluşturulması esasına dayanır. Kütüphane hazırlık sürecinde sırasıyla, yakalama, parçalama, mRNA pürifikasyonu, cDNA sentezi, index-barkod dizilerinin eklenmesi ve pürifikasyon işlemleri üretici firmanın kit yönergeleri takip edilerek gerçekleştirildi (Şekil 3.2.).



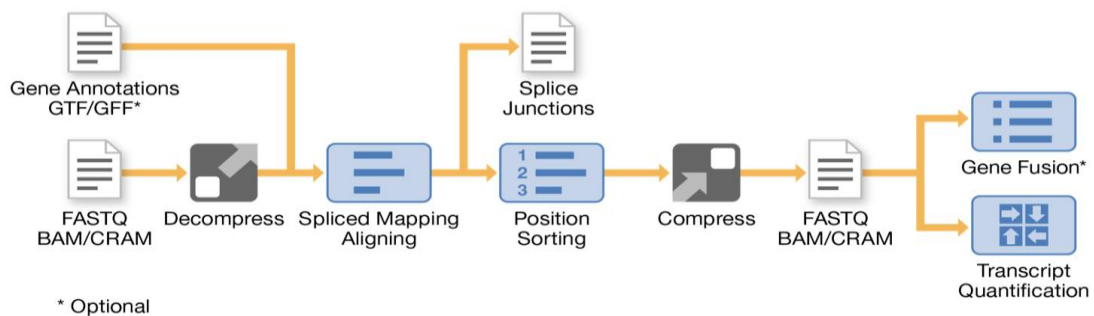
Şekil 3.2. Kütüphane hazırlığı iş akışı. Illumina, Inc. (2021). *Illumina Stranded mRNA Prep. Referans Kılavuzu* (sürüm 1000000124518-02). (WEB3).

Dizileme (Sekans)

Dizileme çalışmasında Illumina NovaSeq 6000 yeni nesil dizileme platformu kullanıldı. Bu basamakta örnek başı ortalama 30 milyon adet 150 bp uzunlukta çift yönlü (paired-end) okuma elde edilmesi planlandı. Kütüphane ölçümü, seyreltme ve yükleme işlemleri, üretici firmanın ilgili yönergeleri takip edilerek gerçekleştirildi.

Biyoinformatik Analiz

Dizileme işlemi sonrasında, elde edilen okuma verilerinin kalite kontrolü amacıyla FASTQC aracı kullanıldı. Kalite değerlerine göre kırpma işlemleri için Trimmomatic (v0.39) aracı kullanıldı. Kırpma sonrasında eldeki diziler, Illumina DRAGEN Bio-IT platformu ve RNA Pipeline iş akışı kullanılarak analiz edildi. Genel süreç ve basamaklar Şekil 3.3.'te gösterilmiştir. Bu analiz sürecinde, okumalar, seçilen genom kırılma bölgeleri dikkate alınarak (splice-aware) hizalama gerçekleştirildi. Bu uygulamada referans genom olarak ilgili organizmanın güncel referans genomu (Homo Sapiens GRCh38.p13) kullanıldı. Hizalama sonrası anotasyonunda gen, ekzon ve transkript bilgileri için GENCODE 40 veriseti kullanıldı. Bu işlem sonrasında her bir transkript üzerindeki okuma sayıları hesaplandı ve ardından toplam okuma sayısına göre normalize edildi. Gen başı okuma sayılarının normalizasyonunda, her numunenin ekspresyon dağılımlarının tüm deney boyunca benzer olmasını sağlamak için TMM algoritması kullanıldı. Normalizasyon sonrasında, gruplar arası ifadesi değişen genleri (Differentially Expressed Genes) belirlemek için edgeR R paketi kullanıldı. Gen ontoloji analizinde TopGO paketi ve Kolmogorov-Smirnov (KS) istatistiksel testi kullanıldı. Yolak analizlerinde clusterProfiler paketi kullanıldı. Grup içi ve gruplar arası istatistiksel karşılaştırma çalışmalarının düzenlenmesi, veri görselleştirme uygulamaları ve rapor oluşturulmasında R betikleri kullanıldı.



Şekil 3.3. Biyoinformatik analiz iş akışı. Illumina, Inc. (2024). *Illumina DRAGEN Bio-IT Platform v4.1 Kullanıcı Kılavuzu* (sürüm 4.1) (WEB4).

3.10. mRNA Sekans Sonuçlarının Yorumlanması

mRNA sekans sonuçlarının firma tarafından yapılan biyoinformatik analizleri sonucunda, H520 ve SK-MES-1 hücrelerinde MBH-1 verilen örneklerde, kontrol örneklerine göre ifadesi değişen genlerin birbiriyle ilişkili oldukları muhtemel yolları analiz edebilmek amacıyla STRING, Cytospace, g:Profiler veri analiz programlarından yararlanıldı. Bu analizler sonucunda H520 ve SK-MES-1 hücre hatlarında MBH-1'e bağlı olarak ifadesi istatistiksel olarak en fazla değişen genler ve etkiledikleri yolla ilgili bir hipotezde bulunuldu. Bu sonuçlara göre öngörülen gen ifadesi ve yolla değişimlerinin validasyonu için gerekli RT-PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) primerleri ve Western Blot antikoları seçildi.

3.11. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizleri

3.11.1. RT-PCR Primer Dizilerinin Tasarlanması

mRNA sekans sonuçlarının istatistiksel analizleri ve veritabanları kullanılarak yapılan tahminler sonucunda, ifadesi değişen genlerin ve yollağın validasyonunun yapılması ve kurulan hipotezin test edilebilmesi amacıyla PERK/EIF2a/ATF4/DDIT3 yollağı ve apoptoz ile ilişkilendirilen, 15 adet RT-PCR primeri "NCBI Primer blast", "UCSC genome browser" çevrimiçi araçları kullanılarak tasarlanmıştır. Kullanılan primer dizileri Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. RT-PCR için tasarlanan primer dizileri. F: forward, ileri; R: reverse, geri

DDIT3	F: GGTATGAGGACCTGCAAGAGGT	PUMA	F: GACCTCAACGCACAGTACGAG
	R: CTTGTGACCTCTGCTGGTTCTG		R:AGGAGTCCCATGATGAGATTGT
TRIB3	F: TGGTACCCAGCTCCTCTACG	NOXA	F:ACCAAGCCGGATTTGCGATT
	R: GACAAAGCGACACAGCTTGA		R:ACTTGCACTTGTTCCTCGTGG
ATF3	F: CGCTGGAATCAGTCACTGTCAG	BAX	F: AGAGGATGATTGCCGCCGT
	R: CTTGTTTCGGCACTTTGCAGCTG		R: CAACCACCCTGGTCTTGGATC
ATF4	F: TTCTCCAGCGACAAGGCTAAGG	BCL2	F: TTGGCCCCCGTTGCTT
	R: CTCCAACATCCAATCTGTCCCG		R:CGGTTATCGTACCCCGTTCTC
ERN1	F: CTCAGAGACAGCGCGAGTAG	CASP3	F: GCAGCAAACCTCAGGGAAAC
	R: ATCTCAGCCTAGCTGTCCA		R: TGTCGGCATACTGTTTCAGCA
EIF2A	F: TCACACACATACCTCAGAATGCC	CASP8	F:TCTGGAGCATCTGCTGTCTG
	R: AGCAAGCTGACATAAGCCCC		R:CCTGCCTGGTGTCTGAAGTT
PINK1	F: CCAAGCAACTAGCCCCTC	DR5	F: AGCACTCACTGGAATGACCTCC
	R: GGCAGCACATCAGGGTAGTC		R: GTGCCTTCTTCGCACTGACACA
PRKN	F: GTGTTTGTGTCAGGTTCAACTCCA	β-actin	CTCTTCCAGCCTTCCTTCT
	R: GAAAATCACACGCAACTGGTC		AGCACTGTGTTGGCGTACAG

3.11.2. cDNA Sentez Reaksiyonu

Hücrelerden izole edilen total RNA'nın cDNA'ya çevriminde “iScript™ cDNA Synthesis Kit” (Kat. No.: 1708891 Biorad) kullanıldı ve reaksiyon protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı Tablo 3.3.'de belirtilen miktarlarda hazırlandıktan sonra 25C°'de 5 dakika, 46 C°'de 20 dakika, 95 C°'de 1 dakika koşullarında reaksiyonu gerçekleştirildi. cDNA'ya çevrilen örnekler buz üzerine alındıktan sonra aliquatlanarak 1/5 oranında sulandırıldı ve -20 C°'de saklandı.

Tablo 3.3. cDNA Sentez Reaksiyonu Formülasyonu

5x iScript Reaction Mix	4 µl
iScript Reverse Transcriptase	1 µl
Nükleaz içermeyen su	Değişken
RNA (100 fg-1 µg total RNA)	1 µg
Toplam Hacim	20 µl

3.11.3. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

MBH-1 uygulanan ve uygulanmayan H520, SK-MES-1, BEAS-2B hücrelerinde belirlenen genlerin değişen ekspresyon seviyelerini göstermek amacıyla iTaq Universal SYBR® Green Supermix (2x) (Kat. No.: 1725121, Biorad) kiti kullanılarak, Tablo 3.4.'te belirtilen miktarlarda ve 3 tekrarlı olarak RT-PCR çalışmaları gerçekleştirildi. PCR şartları 95 °C'de 1 dakika 1 döngü, (95°C'de 5 saniye, 60°C'de 60 saniye) 40 döngü ve 65-95 °C arası 0.5 °C hassasiyette erime eğrisi (melting curve) olarak uygulandı. RT-PCR çalışmalarında Biorad CFX96 cihazı kullanıldı.

Tablo 3.4. RT-PCR Formülasyonu

Bileşen	Miktar	Final Konsantrasyon
iTaq Universal SYBR® Green Supermix (2x)	5 µl	1x
Forward ve reverse primerler	1 µl	500 nM (her bir primer)
cDNA	1 µl	100 ng
Nükleaz içermeyen su	2 µl	-
Total hacim	10 µl	-

RT-PCR çalışmalarında endojen kontrol olarak β -Actin kullanıldı. Sonuçların analizi için kat değişimleri (fold change) ve $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu kullanıldı (KJ Livak, 2001).

3.12. Western Blot Analizleri

3.12.1. Protein İzolasyonu ve Saflaştırılması

MBH-1 uygulanan ve uygulanmayan olmak üzere H520, SK-MES-1 ve BEAS-2B hücrelerini içeren %80-90 hücre yoğunluğunda olan T25 flasklar 2'şer kere PBS ile yıkandı. Flasklara proteaz ve fosfataz inhibitörü (Kat No: BMP1001, Abbkine) içeren

300-500 µl RIPA tamponu (Kat. No.: RIPA10x, Clearband) eklenerek 3 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından hücre kazıyıcı (cell scraper) ile hücreler toplanarak 30 dakika buzda bekletildikten sonra steril Eppendorf tüpe aktararak -80 °C’de saklandı. Western Blot deneyleri yapılmak üzere saklanan proteinler, protein saflaştırma işlemi yapılmak üzere çözdürüldükten sonra, 3 tekrarlı olarak; 1 dakika max hızda vortex- 10 dakika buz inkübasyonu serisi uygulandı. Ardından, 1000 µl pipetle 30 kez dikkatlice pipetaj-15 dakika buz inkübasyonu serisi, sırasıyla 200 µl ve 100 µl pipetlerle uygulandı. Son olarak +4 C°’de 10 dakika 16000 xg’de santrifüj edildi ve süpernatant temiz bir tüpe alınarak protein saflaştırıldı.

3.12.2. Protein Miktarlarının Belirlenmesi

Saflaştırılan protein örneklerinin miktarları Bradford protein miktar tayini yöntemi ile gerçekleştirildi. Sığır serum albümini (BSA, Lot No.: 0K67583, Bioshop) standartları için 2mg/ml stok olarak hazırlandı. Ardından bu stok solüsyon kullanılarak 25, 12.5, 5, 2.5 ve 1 µg/ml olacak şekilde standart dilüsyonları hazırlandı. Protein örnekleri, 1/1000 oranında olacak şekilde sulandırıldı. Hazırlanan örneklerin ve BSA solüsyonlarının her birinden 800 µl alındı ve her birine 200 µl Bradford reaktifi (Kat. No:500-0006, BioRad) eklendi. Hazırlanan örnekler ve standartlar üç tekrarlı olarak 96 kuyucuklu plakalara koyuldu ve 595 nm dalga boyunda, Thermo Scientific Multiscan Microplate Reader cihazı kullanılarak absorbans değerleri tespit edildi ve SkanIt Software v7.0.2.5 ile protein miktarları hesaplandı.

3.12.3. SDS-PAGE için jelin dökülmesi, örneklerin yürütülmesi ve transferi

SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) jelinin dökülmesi, proteinlerin yüklenmesi, yürütülmesi ve transferi sırasında kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlığı aşağıda verilmiştir. Separating (Ayrıştırma) ve Stacking (Yükleme) jellerinin hazırlanması için kullanılan kimyasalların oranları ve miktarları Tablo 3.5.’te verilmiştir.

1,5 M Tris Base (pH: 8.8): Tris (Kat. No: BP152-500, Fisher Bioreagents) kimyasalından 18.17 gr tartıldı ve yaklaşık 80 ml dH₂O ile çözüldü. pH: 8.8'e ayarlandı, dH₂O ile 100 ml'e tamamlandı ve 0.8 µm'lik filtreden geçirilerek +4 C°'de saklandı.

0,5 M Tris Base (pH: 6.8): Tris kimyasalından 6.04 gr tartıldı ve yaklaşık 80 ml dH₂O ile çözüldü pH: 6.8'e ayarlandı, dH₂O ile 100 ml'e tamamlandı ve 0.8 µm'lik filtreden geçirilerek +4 C°'de saklandı.

%10 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS): 10 gr SDS (Kat. No.:L3771-100G, Sigma) tartıldı, 100 ml dH₂O ile çözüldü ve 0.8 µm'lik filtreden geçirilerek oda sıcaklığında saklandı.

%10 Amonyum persülfat (APS): 0.1 gr APS (Kat. No: A3678-100G, Sigma) tartıldı ve 1 ml dH₂O ile çözüldü ve +4 C°'de 3 güne kadar saklandı.

4X Yükleme tamponu: 90 µl Laemli Buffer (Kat. No.: 1610747, BioRad), 10 µl β-merkaptöetanol (Kat. No.:805740, MerckMillipore)

Running (Yürütme) Tamponu (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0.1 SDS): 3.028 gr Tris Base, 14.26 gr Glisin (Kat. No: G-630-500, Goldbio) ve 1 gr SDS tartıldı ve dH₂O ile çözülerek 1000mL'ye tamamlandı.

Transfer Tamponu (25 mM Tris, 190 mM Glisin, %0.05 SDS): 3.028 gr Tris Base, 14.26 gr Glisin ve 0.5 gr SDS tartıldı ve dH₂O ile çözülerek 1000mL'ye tamamlandı. Ayrı bir mezüre 250 ml metanol koyuldu. Transfer işlemine kadar tampon ve methanol 4°C'de soğutuldu. Transfer işleminden hemen önce tampon ve metanol karıştırıldı.

Tablo 3.5. Western blot jel hazırlama formülasyonları.

	Separating (Ayrıştırma) Jeli %10 (2 jel için)	Separating (Ayrıştırma) Jeli %12	Stacking (Yükleme) Jeli %5
ddH₂O	9,23 ml	4,33 ml	3,05 ml
%30 Akrilamid/ bis-akrilamid	7,5 ml	4 ml	850 µl
1.5 M Tris pH: 8.8	5,63 ml	2,5 ml	—
0.5 M Tris pH: 6.8	—	—	1,25 ml
%10 SDS	225 µl	100 µl	50 µl
%10 APS	112,5 µl	50 µl	25 µl
TEMED	11,25 µl	5 µl	5 µl
Toplam	≈ 22,70 ml	≈ 10,90 ml	≈ 5,23 ml

Western blot çalışmalarının her aşaması Mini-PROTEAN (BioRad) sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Jel dökümü için sistemin kalın ve ince camları etanol ile silinerek temizlendi ve sistemin jel dökme aparatına 45°'lik açıyla yerleştirildi. Öncelikle ayrıştırma jeli Tablo 3.5.'te verilen formülasyona göre hazırlandı. En son tetrametil etilendiamin (TEMED) koyulduktan sonra seri ve nazik şekilde mümkün olduğunca köpürtmeden karıştırıldı ve kalın camın üst kısmından 1 cm kalacak şekilde döküldü. Vakit kaybetmeden üstüne 1 ml izopropanol döküldü. Ayrıştırma jeli tamamen polimerize olduğunda izopropanol kurutma kâğıdı yardımıyla alındı ve yüklem jeli Tablo 3.5'te verilen formülasyona göre hazırlanarak döküldü. Ardından 10 kuyucuklu 1,5 mm taraklar nazikçe yerleştirildi ve jelin polimerize olması için yaklaşık 40 dakika beklendi. Dökülen ayrıştırma jeli polimerize olurken örnekler yüklemek için hazırlandı. Daha önceden konsantrasyonları tayin edilen örneklerden 50 µg olacak şekilde alınarak, yüklenecek örnek hacminin 1/3'ü oranında 4x yüklem tamponu eklendi ve 95°C'de 5 dakika kaynatıldı. Tamamen polimerize olmuş olan SDS-PAGE jel, sistemin yürütme tankına alındı ve yürütme tamponu eklendi. Hazırlanan örnekler kuyulara yüklendi ve önce

90V'de, bantlar jelin yarısına ulaştığında 100V'de olmak üzere toplam 2 saat yürütüldü. Yürütme işlemi ile ayrışan protein örnekleri, SDS-PAGE jelden Polivinilidin Florür (PVDF, Kat. No: IPVH00010, Merck Millipore) membrana, daha önceden hazırlanan transfer tamponu içinde, +4 °C'te 90 mAmp'de 16 saat süresince ıslak transfer yöntemi ile transfer edildi.

3.12.4. İmmunoblotlama

PVDF membrana transfer olan protein örnekleri, immünoblotlama için ilgili primer antikorla işaretlendi. Bunun için, membran %5'lik yağsız süt tozu (Kat. No: SKI400.250, Bioshop) içeren 25 mM Tris pH:7.6, 34 mM NaCl (Kat. No: 7647-14-5, AFG Bioscience), %1 Tween 20 (Kat. No:1706531, BioRad) ile hazırlanan TBS-T çözeltisi içinde oda sıcaklığında 1 saat bloklandı. Daha sonra membran ilgili primer antikorlar ile 1-200-1:1000 oranlarında hazırlanan %5'lik süt tozu içeren TBS-T solüsyonu ile 4°C'de 1 gece boyunca çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon süresi biten membran oda ısısında TBS-T solüsyonu ile 10'ar dakika olacak şekilde 3 kez yıkandı. Yıkama işleminin ardından membran ilgili HRP (Horseradish Peroksidaz) bağlı sekonder antikor (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody Kat. No: 7074P2, Cell Signaling) ile 1:2000 oranında hazırlanan %5'lik süt tozu içeren TBS-T solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat boyunca çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon süresi biten membran, TBS-T solüsyonu ile 10'ar dakika olacak şekilde 3 kez yıkandı. Yıkama işlemleri sonunda membran, cihazın görüntüleme standına alınarak üzerine 2-3 ml Enhanced Chemiluminescence (ECL Kat. No: 1705061, Biorad) solüsyonu eklendi ve membran Odyssey® Fc Imaging System (LI-COR Biosciences) görüntüleme cihazı tarafından 10 dakika süresince fotoğraflandı. Elde edilen bantlar LiCOR Image Studio versiyon 5.5 programında yoğunlukları hesaplanarak değerlendirildi.

Kullanılan antikorlar: EIF2 α (Kat. No:E-AB-31295, Elabscience), pEIF2 α (Kat. No:28740-1-AP, ptglab), Casp-3 (Kat. No:1226, Santa Cruz), P53 (Kat. No:1311, Santa Cruz), Casp-12 (55238-1-AP, Ptglab), GAPDH, sekonder antikor (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody Kat. No: 7074P2, Cell Signaling).

3.13. İstatistiksel Analiz

Çalışma boyunca yapılan deney sonuçlarının istatistiksel analizinde Graphpad Prism 8.0 programı kullanıldı. Veriler parametrik test varsayımlarını sağladığında iki grubun karşılaştırılması Student T testi ile analiz edildi. Veriler parametrik test varsayımlarını sağlamadığında iki grubun karşılaştırılmasında nonparametrik Mann Whitney U testi kullanıldı. mRNA sekans verilerinin değerlendirilmesinde, Gen Ontoloji analizinde TopGO paketi ve Kolmogorov-Smirnov istatistiksel testi kullanıldı. Grup içi ve gruplar arası istatistiksel karşılaştırma çalışmalarının düzenlenmesi, veri görselleştirme uygulamaları ve rapor oluşturulmasında R betikleri kullanıldı. RT-PCR sonuçları için $2^{-\Delta\Delta Ct}$, Livak (2001) metodu kullanılarak, MBH-1 grubu örneklerinin, kontrol örneklerine göre kat değişim (fold change) değerleri hesaplandı. Verilerin istatistiksel anlamlılıkları Student T testi ile analiz edildi. Tüm istatistiksel analizlerde, $p < 0.05$ değerine sahip sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. MBH-1'in Sitolojik Etkisinin Çevrimiçi Prediktif Veri Tabanlarında Analiz Edilmesi

MBH-1 molekülünün kimyasal yapısı "PASS online" (way2drug) veritabanına çizildi ve biyolojik aktivitelerinin tahminleri Pa, Pi değerleriyle ortaya koyuldu. Yapılan taramada MBH-1 molekülünün, hepatoprotektan, insülin promotörü, antineoplastik, Kaspaz-3 uyarıcı, apoptoz uyarıcı, lipid metabolizması düzenleyici, transkripsiyon faktörü NK-kB uyarıcı gibi bir çok hücrenel süreçte rol alabileceği sonucu elde edildi.

The screenshot displays the PASS online web interface. At the top, there is a navigation menu with links for Home, Definitions, Products, Services, FAQ, and Contacts. Below the menu, there are buttons for 'Predict new compound', 'View all results', 'View history results', 'SMILES', 'MOL file', and 'Molview JS'. The main content area features a chemical structure viewer showing the structure of MBH-1, a complex polycyclic molecule with multiple methyl groups, hydroxyl groups, and a carboxylate group. Below the structure, there is a 'Predict' button and a table of predicted activities.

Pa	Pi	Activity
0,969	0,001	Hepatoprotectant
0,944	0,002	Insulin promoter
0,938	0,003	Caspase 3 stimulant
0,932	0,003	Lipid metabolism regulator
0,921	0,001	Transcription factor stimulant
0,921	0,001	Transcription factor NF kappa B stimulant
0,920	0,002	Chemopreventive
0,917	0,002	Membrane integrity antagonist
0,917	0,005	Antineoplastic
0,902	0,004	Apoptosis agonist

Şekil 4.1. MBH-1'in PASS veritabanında yapılan biyolojik aktivite tahmini.

4.2. MBH-1 Dozunun Belirlenmesi

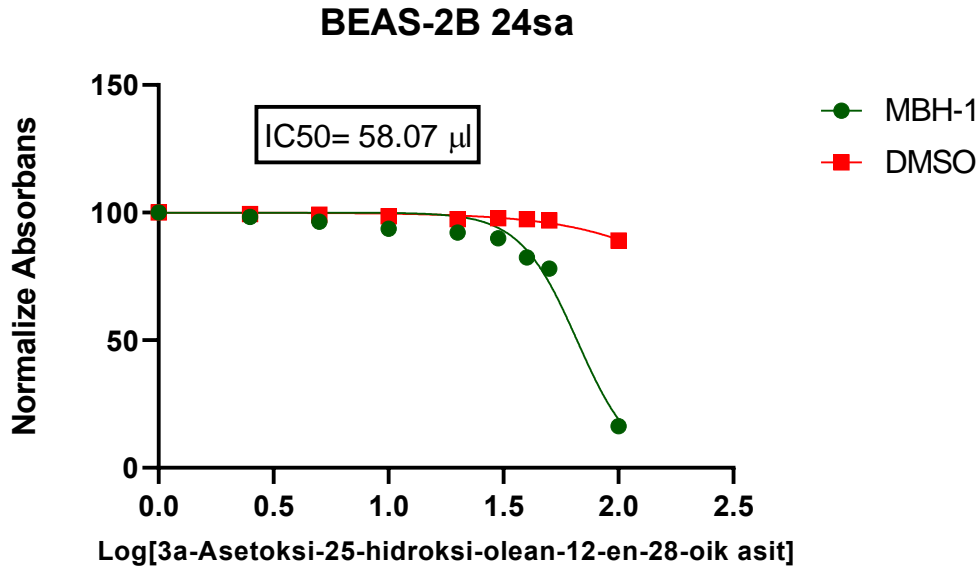
Çalışmada kullanılan H520, SK-MES-1 ve BEAS-2B hücrelerinde deney süresince kullanılacak olan optimum dozu bulmak için MBH-1, 2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 50 μ l dozlarında alınarak 0, 24, 48, 72 saat olarak hücre hatlarına uygulanmıştı. Çözücü olarak kullanılan DMSO'nun konsantrasyonu sitotoksik olmadığı aralıkta tutuldu (<%0.5), bu bağlamda kontrol olarak aynı dozlarda yalnızca DMSO eklenen kuyucuklarda hücre canlılıkları arasında herhangi bir fark görülmedi.

Cvdk-8 kiti kullanılarak, Promega Glomax-Multi Microplate Reader cihazında yapılan absorbans değerleri GraphPad Prism 8 programında işlenerek IC50 değerleri ve grafikleri saptandı. SK-MES-1, H520 skuamöz hücreli akciğer kanseri hücre hatları için IC50 aralığında fakat kontrol hücre hattı BEAS-2B için letal olmayan optimum doz 40 μ l yani 80 μ M olarak belirlendi (Şekil 4.2.).

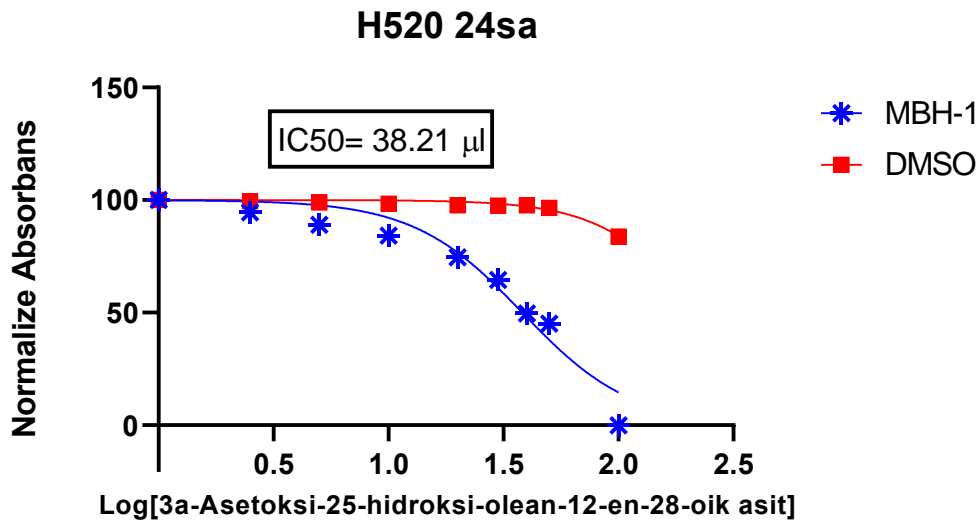
Table of results				
Nonlin fit Table of results		A	B	C
		H520	SK-MES-1	BEAS-2B
1	log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope			
2	Best-fit values			
3	LogIC50	1.582	1.612	1.764
4	HillSlope	-1.834	-2.172	-4.533
5	IC50	38.21	40.96	58.07
6	95% CI (profile likelihood)			
7	LogIC50	1.524 to 1.638	1.564 to 1.659	1.730 to 1.802
8	HillSlope	-2.513 to -1.352	-2.946 to -1.620	-6.813 to -3.331
9	IC50	33.43 to 43.41	36.68 to 45.65	53.69 to 63.43
10	Goodness of Fit			
11	Degrees of Freedom	16	16	16
12	R squared	0.9441	0.9528	0.9546
13	Sum of Squares	890.1	795.1	703.0
14	Sy.x	7.459	7.049	6.629
15				
16	Number of points			
17	# of X values	18	18	18
18	# Y values analyzed	18	18	18
19				

Şekil 4.2. H520, SK-MES-1, BEAS-2B hücre hatlarının IC50 hesaplama sonuçları.

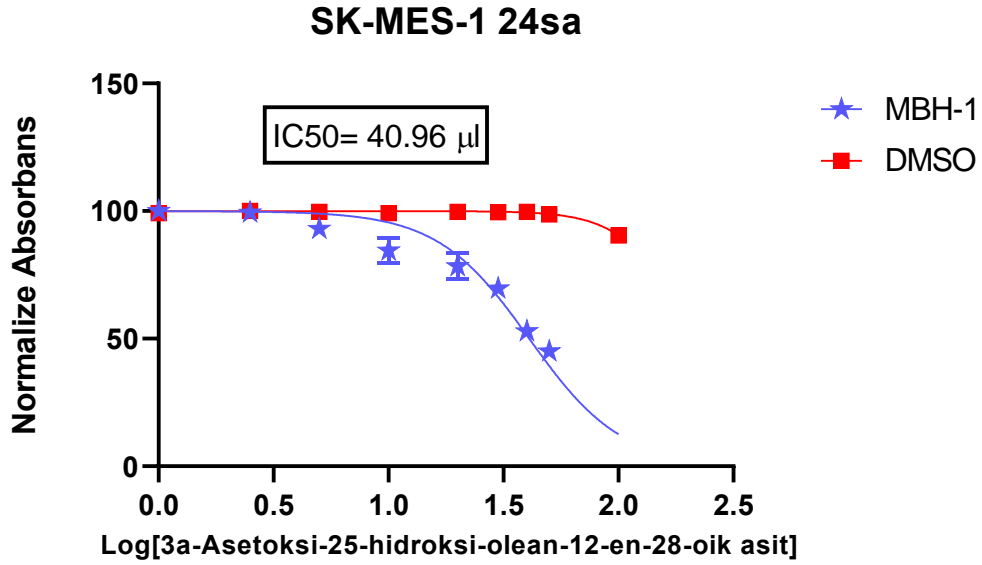
Her bir hücre hattı için doz/yanıt grafiği oluşturuldu (Şekil 4.3.- Şekil 4.5). Yapılan hesaplamalarla oluşturulan grafiklerde x-ekseni, Log[inhibitör dozu]; y-ekseni, normalize edilmiş absorbans değerleri ile temsil edilmektedir. Bununla birlikte, tüm hücre hatları için 48. saat (Şekil 4.6) ve 72. saat (Şekil 4.7.) doz/yanıt hesaplamaları da yapılarak grafikleri oluşturuldu.



Şekil 4.3. BEAS-2B hücre hattı 24. sa doz/yanıt grafiği.

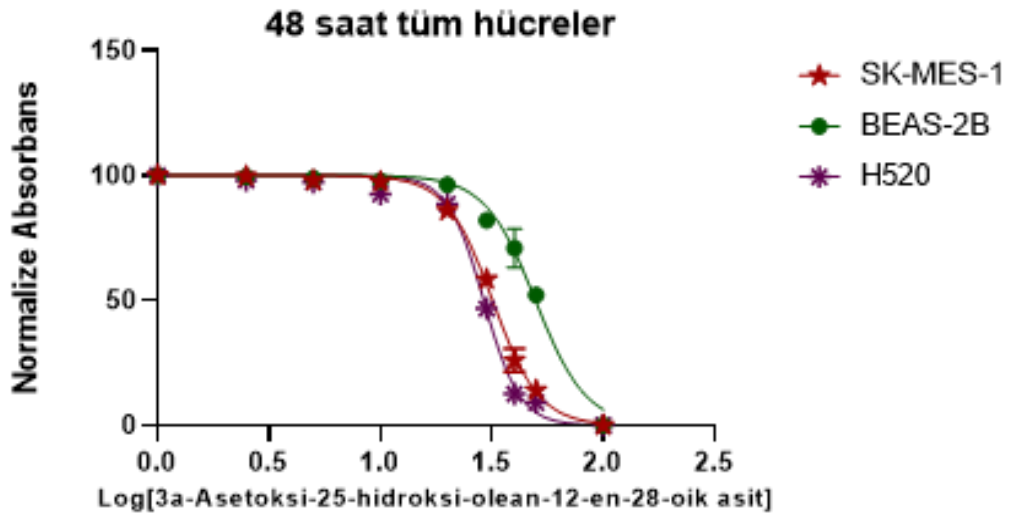


Şekil 4.4. H520 hücre hattı 24 saat doz/yanıt grafiği.

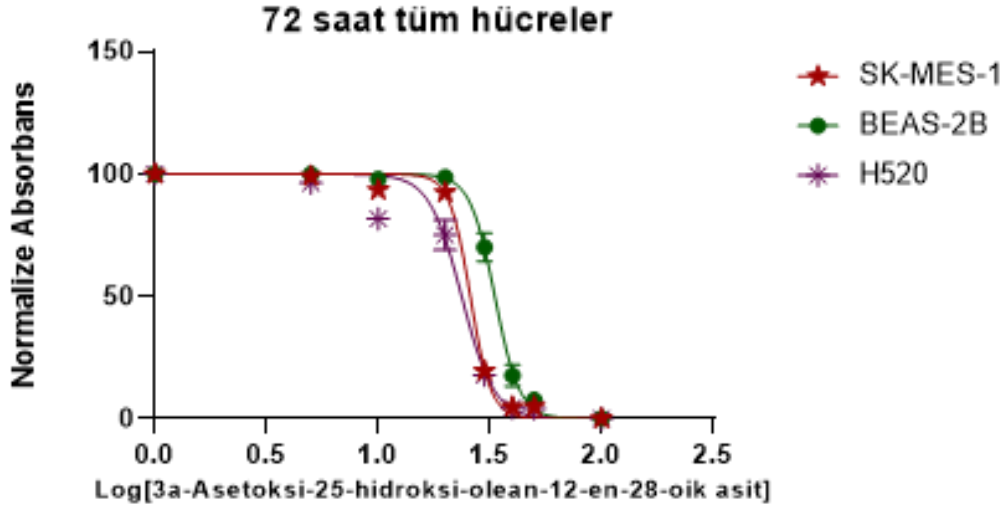


Şekil 4.5. SK-MES-1 hücre hattı 24 sa doz/yanıt grafiği.

MBH-1 molekülünün 24. saatte IC₅₀ dozu H520 hücre hattında 38,21µl (76,42 µM, 3,82 µg) SK-MES-1 hücre hattında 40,96 µl (81,92 µM, 4,10 µg), BEAS-2B hücre hattında ise 58,07 µl (116,14 µM, 5,81 µg) olarak hesaplandı.



Şekil 4.6. Tüm hücrelerin 48. sa doz/yanıt grafiği.



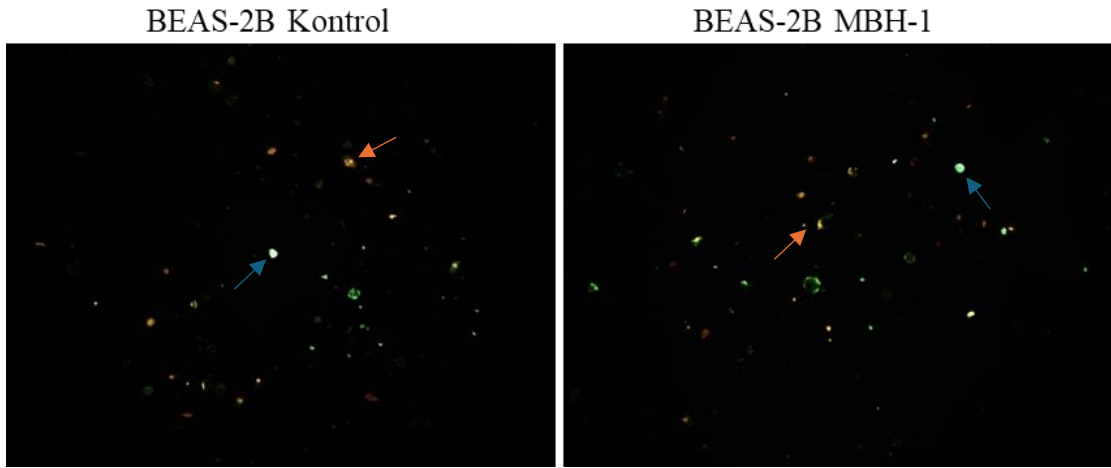
Şekil 4.7. Tüm hücrelerin 72. sa doz/yanıt grafiği.

H520 ve SK-MES-1, BEAS-2B hücre hatlarında MBH-1 molekülünün efektif doz/zaman aralığını bulmak amacıyla yapılan 48. saat IC₅₀ (H520: 58,22 µM, SK-MES-1: 63,8 µM, BEAS-2B: 99,36 µM) ve 72. saat IC₅₀ (H520: 47,38 µM, SK-MES-1: 51,8 µM, BEAS-2B: 66,68 µM) hesaplamaları sonucunda, sonraki deneylerde 24. saat dozlarının kullanılmasına karar verildi.

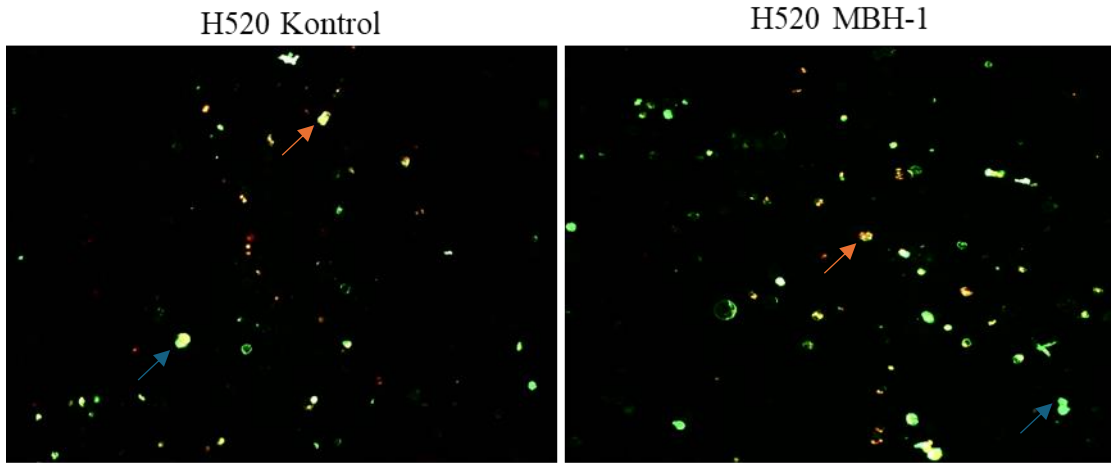
4.3. MBH-1'in Apoptotik Etkisinin Annexin V-FITC/ PI Floresan İşaretleme ile Değerlendirilmesi

MBH-1'in BEAS-2B, H520 ve SK-MES-1 hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisini araştırmak amacıyla Annexin V- FITC/PI apoptoz kitiyle erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücreler işaretlenerek floresan mikroskopta görüntülendi (Şekil 4.8.- 4.10.).

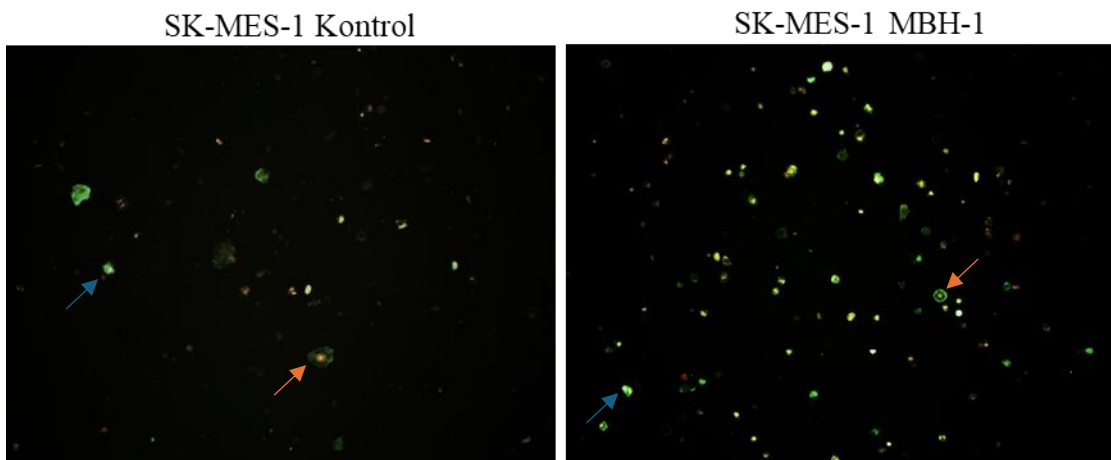
Annexin V-FITC (yeşil floresan) ve non-vital boya olan propidyum iyodür (kırmızı floresan) ile aynı zamanda yapılan boyama, canlı hücreler (FITC-PI-), erken apoptotik hücreler (FITC+PI-) ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin (FITC+PI+) boyanma durumlarına göre birbirinden ayırt edilmesine izin verir.



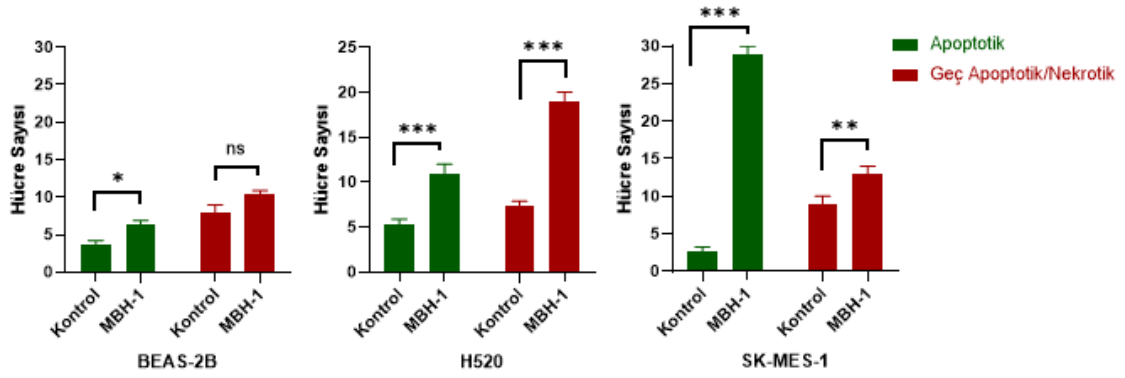
Şekil 4.8. BEAS-2B hücrelerinin 24. saatte apoptotik durumlarını gösteren floresan mikroskopi görüntüleri. Mavi ok: apoptotik hücre, turuncu ok: geç apoptotik hücre.



Şekil 4.9. H520 hücrelerinin 24. saatte apoptotik durumlarını gösteren floresan mikroskopi görüntüleri. Mavi ok: apoptotik hücre, turuncu ok: geç apoptotik hücre.



Şekil 4.10. SK-MES-1 hücrelerinin 24. saatte apoptotik durumlarını gösteren floresan mikroskopi görüntüleri. Mavi ok: apoptotik hücre, turuncu ok: geç apoptotik hücre.

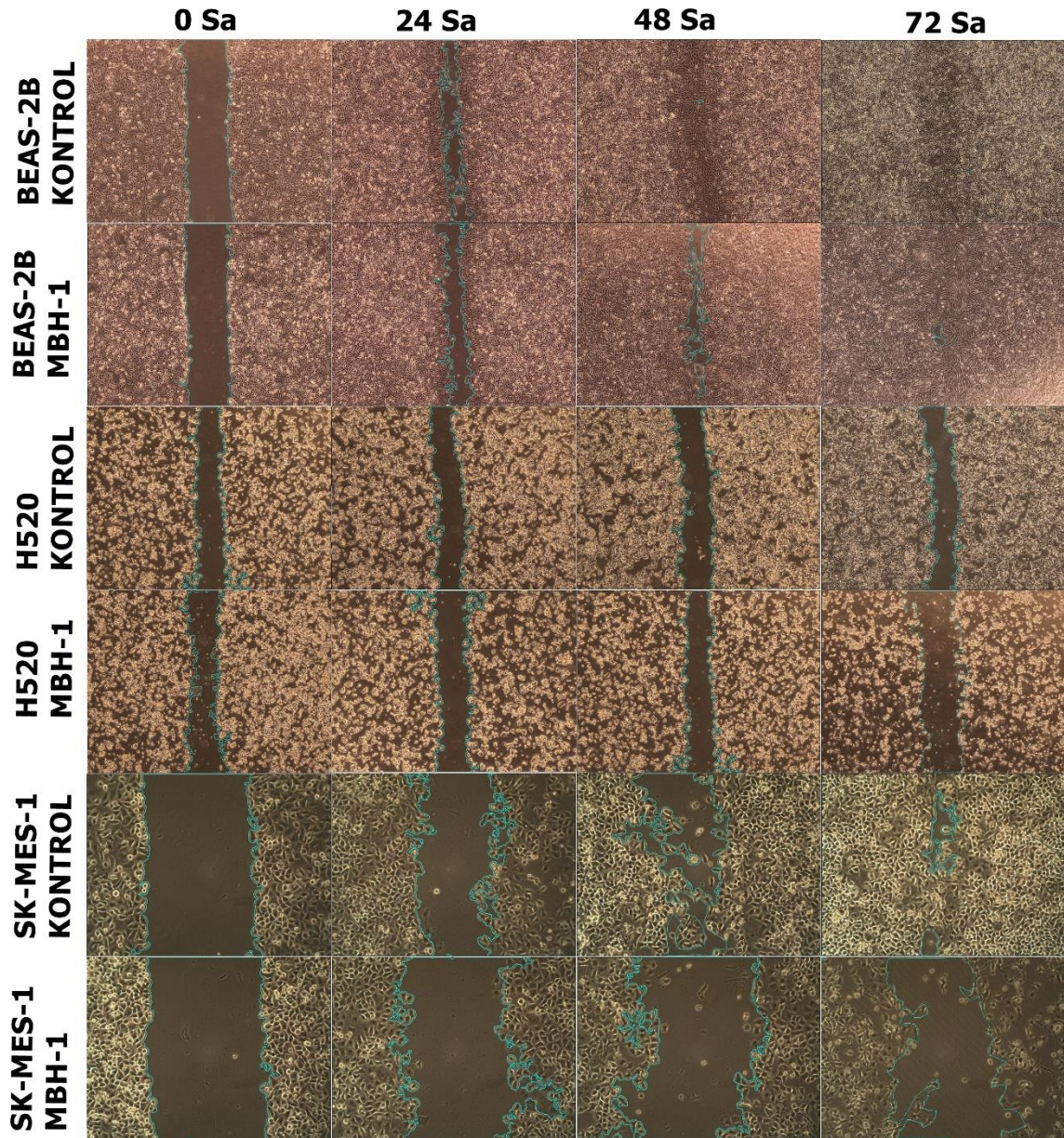


Şekil 4.11. BEAS-2B, H520, SK-MES-1, hücrelerinin kontrol ve MBH-1 uygulanan gruplarında apoptotik ve geç apoptotik/nekrotik hücre sayılarının karşılaştırması (ns: $p > 0,05$ anlamlı değil, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$).

Annexin V- FITCH/PI apoptoz kiti kullanılarak işaretlenen hücrelerin floresan mikroskopta görüntülenmesinin ve sayımının sonucunda MBH-1 uygulanan üç hücre hattında genel olarak apoptozun arttığı ($p < 0,01$), bununla birlikte H520 ve SK-MES-1 hücrelerinde bu artışın daha belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 4.11.). Geç apoptotik ve nekrotik hücre sayılarında MBH-1 uygulamasına bağlı olarak artış görülürken, bu artış H520 ($p < 0,001$) ve SK-MES-1 hücrelerinde anlamlıydı ($p < 0,01$).

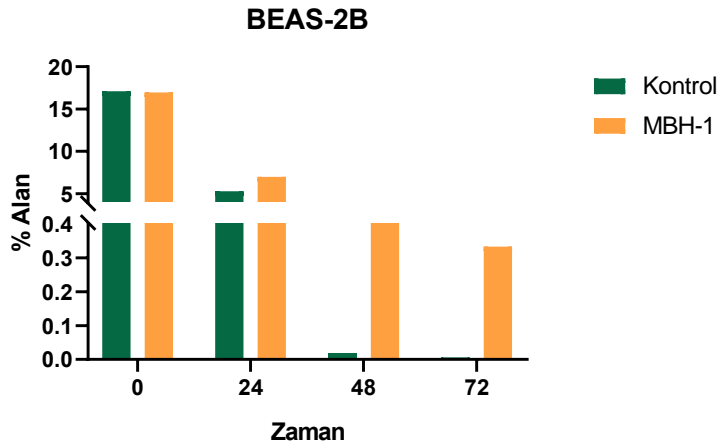
4.4. MBH-1'in Hücre Migrasyonuna Etkisinin Yara İyileşme Durumlarına Göre Değerlendirilmesi

MBH-1 uygulanan ve uygulanmayan hücrelerin migrasyon durumları, oluşturulan yara izinin kapanma durumuna bakılarak incelendi. MBH-1 uygulanan H520 hücrelerinde hücre proliferasyonunun engellendiği ve kontrol hücrelerinde MBH-1 uygulanan hücelere göre daha hızlı kapanma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.12.). SK-MES-1 hücrelerinde, MBH-1 uygulanan hücrelerde, kontrollerine göre migrasyon anlamlı olarak engellendi ve kontrol hücrelerinde tam kapanma görülürken MBH-1 uygulanan hücrelerde kapanma olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.12.). BEAS-2B normal akciğer bronşiyal epitel hücreleri ile MBH-1 uygulanmayan kontrolleri arasında fark gözlemlenmedi. İki hücre grubunda da yara izi tamamen kapandı. (Şekil 4.12.).

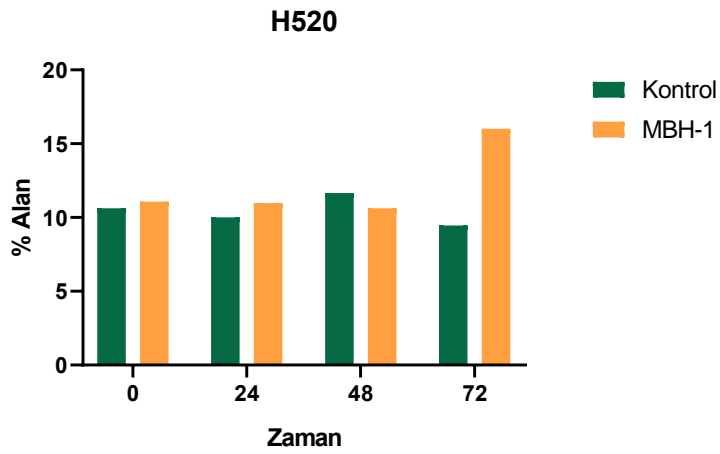


Şekil 4.12. H520, SK-MES-1 ve BEAS-2B hücrelerinin kontrol ve MBH-1 uygulanan gruplarında yara iyileşme durumları.

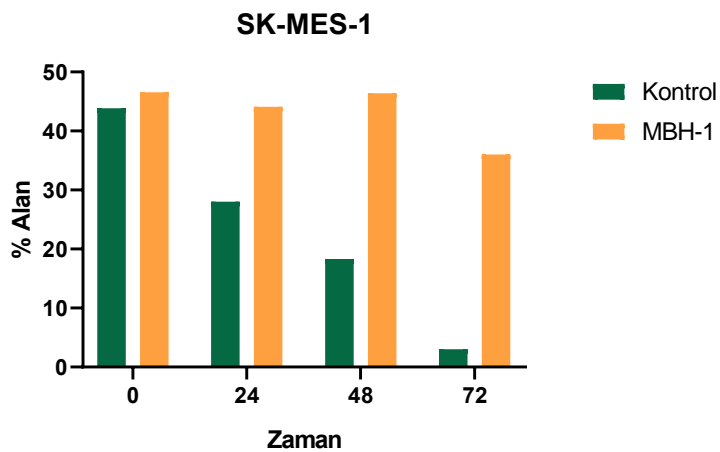
Yara iyileşme analizleri, ImageJ programının yara iyileşme analizleri için geliştirilen eklentisi kullanılarak gerçekleştirildi (Suarez-Arnedo vd., 2020). Oluşturulan yara izi alanının 0-72. saat zaman aralığındaki yüzdeleri, her bir hücre hattı için ayrı grafiklerde sunulmuştur (Şekil 4.13- 4.15.).



Şekil 4.13. BEAS-2B hücre hattında, yara izi oluşturulan alan yüzdesinin zamana bağlı değişimi.



Şekil 4.14. H520 hücre hattında, yara izi oluşturulan alan yüzdesinin zamana bağlı değişimi.

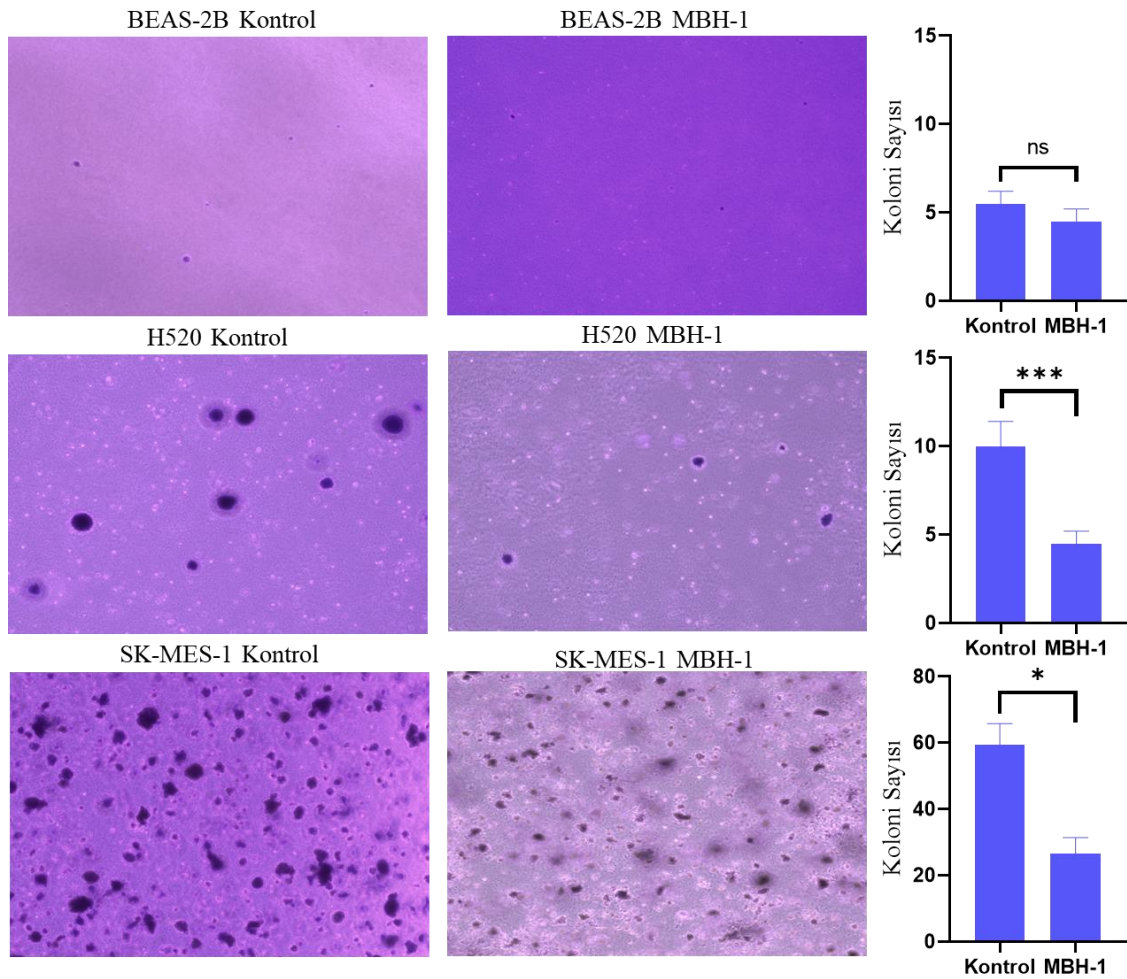


Şekil 4.15. SK-MES-1 hücre hattında, yara izi oluşturulan alan yüzdesinin zamana bağlı değişimi.

Programda hesaplanan yara izi genişliği değerleriyle (pixel) yapılan istatistiksel analiz sonucunda, BEAS-2B hücre hattında MBH-1 ve kontrol örnekleri arasında fark görülmedi ($p>0,5$). H520 hücre hattında da MBH-1 ve kontrol örnekleri arasında 0-72 saat aralığında değerlendirilen yara izi genişliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0,5$) Fakat 72.saat görüntüleri karşılaştırıldığında MBH-1 örneklerinde, kontrole göre hücre sayısında azalma ile birlikte, yara izi alanının yine kontrole göre neredeyse 2 katı kadar daha geniş (%16 ve %9) olduğu gözlemlendi. SK-MES-1 hücre hattında ise MBH-1 ve kontrol örneklerinin yara izi kapanma durumları istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde farklıydı ($p<0,01$).

4.5. MBH-1'in Soft Agarda Koloni Oluşumuna Etkisinin Değerlendirilmesi

Kanser hücrelerinin ankoraj-bağımsız büyüme yeteneğini değerlendirmek için kullanılan soft agar koloni oluşturma deneyi, kritik bir yöntemdir. Normal hücreler, büyümek için yüzeylere tutunmaya ihtiyaç duyarken, kanser hücreleri bağımsız olarak çoğalma yeteneğine sahiptir. Bu deneyle, MBH-1 uygulamasının hücrelerin tümörigenik potansiyelini ve malignite derecesini nasıl etkilediği incelendi. MBH-1 uygulanan hücrelerin genel olarak daha az ve daha küçük koloniler oluşturduğu gözlemlendi. Bu fark, H520 ve SK-MES-1 hücrelerinde sayıca daha belirgindi ve istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (sırasıyla, $p<0,01$; $p<0,001$). BEAS-2B hücrelerinde MBH-1 ve kontrol grupları sayıca daha yakın olmakla birlikte, koloni oluşumları çok daha küçüktü ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). H520 ve SK-MES-1 hücrelerinde MBH-1 uygulanan gruplarda, kontrole göre daha küçük ve sayıca daha az koloni gözlemlendi (Şekil 4.16.).



Şekil 4.16. BEAS-2B, H520, SK-MES-1 hücrelerinin kontrol ve MBH-1 uygulanan gruplarında görüntülenen koloni oluşumları. (ns: $p > 0,05$ anlamlı değil, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$).

4.6. mRNA-sekans Analizi ile MBH-1 Uygulamasına Bağlı Olarak Değişen Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

MBH-1 uygulanan ve uygulanmayan kontrol olmak üzere H520, SK-MES-1 ve BEAS-2B hücre hatlarından seçilen 6 örneğin gen ekspresyon profilinin çıkarılması hedeflenerek yeni nesil dizileme yöntemi ile RNA dizileme işlemi gerçekleştirildi. Analiz sonucunda, her bir örnekteki genlerin ekspresyon profilleri tespit edildi ve seçilen gruplar istatistiksel yöntemlerle karşılaştırılarak anlamlı değişkenlik gösteren gen, gen ontolojisi ve yolları raporlandı.

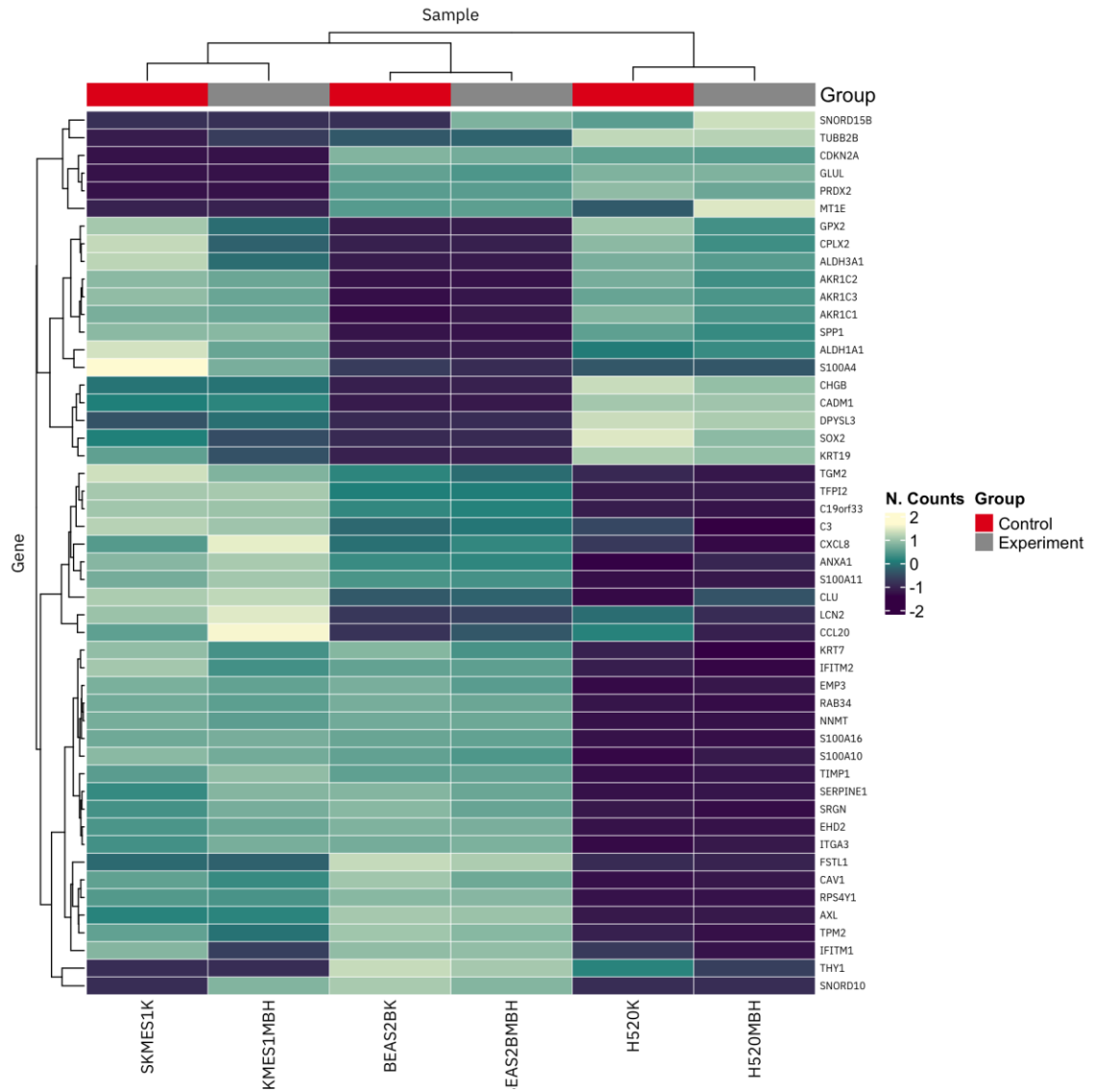
Tablo 4.1.'de ilgili örneklerin adları, deney grupları, dizileme sonucunda elde edilen okuma sayıları ve bu okumaların ne kadarının genoma hizalandığı yer almaktadır. Toplam okuma sütunu numuneden elde edilen toplam okuma sayısını; hizalanan okuma sütunu, genoma hizalanan okumaların sayısını; hizalama oranı sütunu, genoma hizalanan okumaların oranını; hizalanmayan okuma, genoma hizalanamayan okumaların sayısını; Q30 Kalite Oranı ise Q30 ve daha üstünde Phred kalite skoru alan okumaların oranını belirtmektedir.

Tablo 4.1. Çalışılan örneklere ait grup bilgileri, okuma sayıları ve hizalama değerleri

	Toplam	Hizalanan	Hizalanmayan	Q30 Kalite Oranı	Hizalanma Oranı
Kontrol					
BEAS-2B K	83.629.920	82.420.089	1.209.831	%93,92	%98,55
H520 K	91.746.730	91.288.851	457.879	%94,16	%99,50
SK-MES-1 K	79.598.608	79.320.726	277.882	%93,72	%99,65
Deney					
BEAS-2B MBH-1	102.955.836	101.865.297	1.090.539	%93,74	%99,65
H520 MBH-1	85.214.938	84.927.886	287.052	%93,33	%99,66
SK-MES-1 MBH-1	71.150.022	70.854.692	295.330	%93,99	%99,58

Genoma hizalama sonrasında, her bir transkriptom elemanına (gen veya ekzon) düşen okuma sayıları hesaplandı. Elde edilen veri seti, ekspresyon gösteren ve göstermeyen genlerin bir karışımını içerir. Ancak bu karışım içerisinde, bazı genler örneklerin büyük bir kısmında çok düşük oranda ekspresyona sahip olabilir veya hiç ekspresyon göstermeyebilir. İleri analizlerin güvenilirliğini sağlamak amacıyla, bu tür genler veri setinden çıkarıldı. Takip eden analizler, normalize edilmiş veriler üzerinden gerçekleştirildi.

Şekil 4.17.'deki ısı grafiği (heatmap), en yüksek ekspresyon profiline sahip ilk 50 genin, örnek gruplarındaki ekspresyonlarını göstermektedir. Isı grafiğinde yer alan örnek ve genler, profil benzerliklerine göre de her iki ekseninde kümelenmiş ve benzerlikler dendrogramlar ile görselleştirilmiştir.



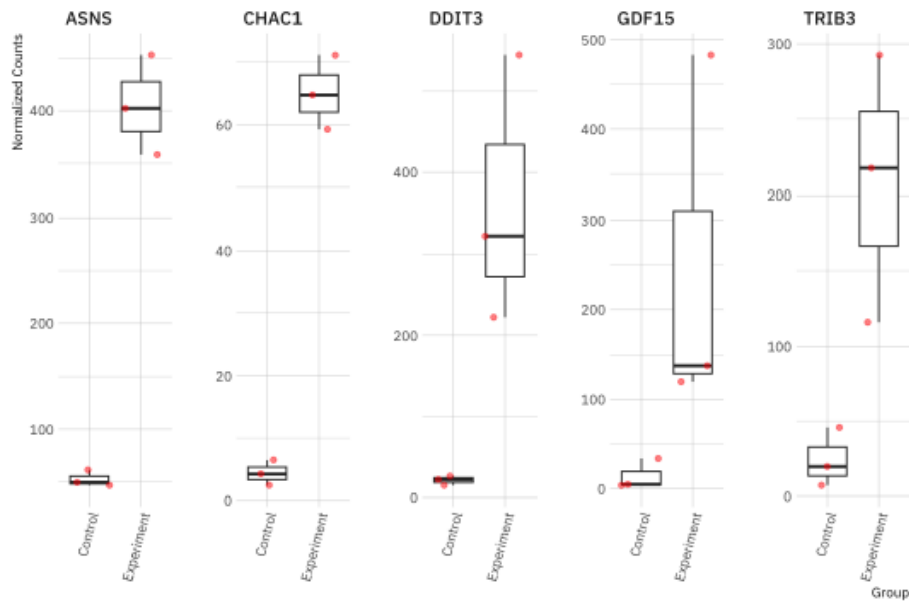
Şekil 4.17. En yüksek ekspresyon profiline sahip 50 genin, örnek gruplarındaki ekspresyon dağılımı. (N.counts, Normalize edilmiş okumalar)

Firma tarafından yapılan ilk analizde, H520, SK-MES-1 ve BEAS-2B hücrelerinin MBH-1 uygulanan örnekleri deney grubu, MBH-1 uygulanmayan örnekleri ise kontrol grubu olarak belirlendi. Diferansiyel ekspresyon (Differently Expressed Genes, DEG) analizi, normalize edilmiş okuma sayıları üzerinden, deney grupları arasındaki anlamlı ekspresyon değişikliklerini tespit etmek amacıyla kullanıldı. Tablo 4.2.'de, DEG analizi sonrasında her bir karşılaştırma grubunun detayları ve anlamlı ($FDR < 0.05$) farklılık gösteren genlerin sayıları yer almaktadır.

Tablo 4.2. Karşılaştırma grupları ve anlamlı farklılık gösteren genlerin sayıları.

Kontrol Grubu	Deney Grubu	Değişmeyen Genler	Ekspresyonu Artan Genler	Ekspresyonu Azalan Genler
BEAS2BK, H520K, SKMES1K	BEAS2BMBH1, H520MBH1, SKMES1MBH1	9182	5	1

Karşılaştırma içinde yapılan analize göre FDR (False Discovery Rate) 0,05'ten küçükse istatistiksel olarak anlamlı kabul edildiğinde, beş adet gende anlamlı ekspresyon artışı; bir adet gende anlamlı ekspresyon düşüşü tespit edildi. Şekil 4.18.'de en anlamlı FDR değerine sahip 5 genin normalize edilmiş okuma değerlerine göre dağılımları gösterilmektedir.

**Şekil 4.18.** En anlamlı değişkenlik gösteren 5 genin normalize edilmiş okuma dağılımları.

Tablo 4.3.'te ise H520, SK-MES-1 ve BEAS-2B hücrelerinin deney ve kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmada ekspresyonu değişen ilk 10 gen FDR değerlerine göre sıralanmıştır.

Tablo 4.3. FDR ile düzeltilmiş P değerine göre en anlamlı değişkenlik gösteren 10 gen

Gen ve Transkript	LogFC	logCPM	P Değeri	FDR
ASNS ENSG00000070669.17	2.81 ▲	7.88	7.25×10^{-6}	* 3.33×10^{-2}
GDF15 ENSG00000130513.7	4.18 ▲	7.15	4.61×10^{-6}	* 3.33×10^{-2}
DDIT3 ENSG00000175197.13	3.91 ▲	7.67	1.34×10^{-5}	* 3.99×10^{-2}
CHAC1 ENSG00000128965.13	3.74 ▲	5.22	1.74×10^{-5}	* 3.99×10^{-2}
TRIB3 ENSG00000101255.12	3.14 ▲	6.94	2.50×10^{-5}	* 4.59×10^{-2}
RN7SL2 ENSG00000274012.1	-1.76 ▼	8.96	3.03×10^{-5}	* 4.64×10^{-2}
SESN2 ENSG00000130766.5	3.00 ▲	4.91	4.76×10^{-5}	5.83×10^{-2}
TUBE1 ENSG00000074935.14	2.38 ▲	4.76	8.25×10^{-5}	5.83×10^{-2}
IGFBP3 ENSG00000146674.16	-2.50 ▼	8.42	5.85×10^{-5}	5.83×10^{-2}
KRT7 ENSG00000135480.17	-1.87 ▼	9.12	6.78×10^{-5}	5.83×10^{-2}

LogFC: Logaritmik kat değişim oranı (Logarithmic Fold Change)
logCPM: Log2 normalize edilmiş ortalama okuma değeri (Logarithmic Count Per Million)
FDR: Düzeltilmiş P değeri (False Discovery Rate)

4.7. mRNA-sekans Analizi ile MBH-1 Uygulamasına Bağlı Olarak H520 ve SK-MES-1 Hücre Hatlarında Değişen Gen Ekspresyonlarının Belirlenmesi

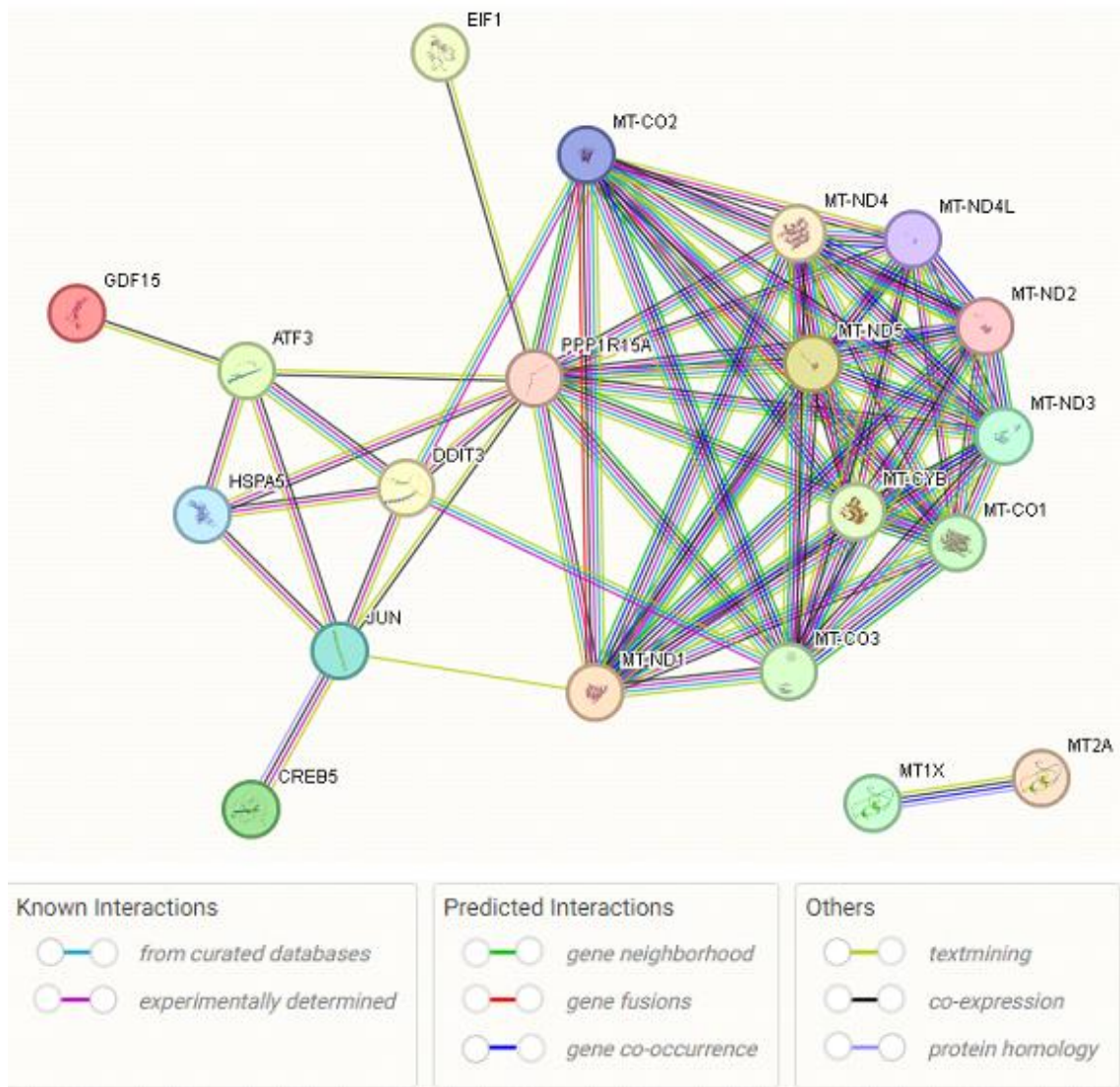
H520, SK-MES-1, BEAS-2B hücrelerinde yapılan analizlerin sonrasında karşılaştırmalı biyoinformatik analizler, yalnızca SHAK hücre hatlarında, MBH-1 grubu ve kontrol grubu arasında tekrar edildi. Böylece, karşılaştırmalı analizlerin H520 ve SK-MES-1 hücre hatları özelinde yapılması, BEAS-2B hücrelerinden farklı olan gen ekspresyon profillerinin, sonuçların anlamlılığına olan etkisini ortadan kaldırdı.

SHAK hücre hatları H520 ve SK-MES-1 arasında yapılan bu karşılaştırma sonucunda istatistiksel olarak anlamlı olan ($p < 0,01$, $FDR < 0,05$) genler listelendi. Bu analiz sonucunda MBH-1 uygulanan H520 ve SK-MES-1 hücrelerinde, kontrole göre 11 mitokondriyal genin ekspresyonunun azaldığı ve 10 genin ekspresyonunun arttığı tespit edildi (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. SK-MES-1 ve H520 hücrelerinde MBH-1 ve kontrol grubu arasında yapılan karşılaştırmada ekspresyonu değişen genler ve istatistiksel anlamlılık düzeyleri.

Transcript	LogFC	LogCPM	F Değeri	P Değeri	FDR	Gen
ENSG00000198840.2	-4,76636	11,07464848	230,1156795	9,25795E-06	0,029375	MT-ND3
ENSG00000198712.1	-4,25503	13,07585548	641,7186831	5,44834E-07	0,005186	MT-CO2
ENSG00000198786.2	-3,30916	9,368085161	100,7941803	8,67175E-05	0,043739	MT-ND5
ENSG00000198763.3	-3,30742	11,63958353	305,8288925	4,23676E-06	0,020165	MT-ND2
ENSG00000198727.2	-2,68821	10,14806335	116,3622167	5,90214E-05	0,04013	MT-CYB
ENSG00000198804.2	-2,49881	12,38586972	207,1223451	1,23504E-05	0,029391	MT-CO1
ENSG00000198888.2	-2,3248	11,1691021	109,1641112	7,00528E-05	0,041677	MT-ND1
ENSG00000198886.2	-2,10417	12,28564478	132,3405442	4,17347E-05	0,039727	MT-ND4
ENSG00000212907.2	-2,05558	12,44095414	145,8973541	3,20596E-05	0,038147	MT-ND4L
ENSG00000198938.2	-1,81694	12,97518862	132,6322292	4,14873E-05	0,039727	MT-CO3
ENSG00000173812.11	2,020239	11,05758135	106,1197084	7,55656E-05	0,042312	EIF1
ENSG00000044574.9	2,873678	10,03746789	111,1281198	6,67828E-05	0,041677	HSPA5
ENSG00000177606.8	3,882077	7,371461817	121,3947038	5,267E-05	0,04013	JUN
ENSG00000130513.7	4,112293	7,422454737	91,5946242	0,000111907	0,04842	GDF15
ENSG00000125148.7	4,252681	11,83908629	121,4378907	5,26196E-05	0,04013	MT2A
ENSG00000175197.13	4,401443	7,847337497	178,9122944	1,84186E-05	0,035065	DDIT3
ENSG00000087074.8	4,451763	7,526012974	149,2871899	3,01252E-05	0,038147	GADD34
ENSG00000162840.4	4,602519	5,310677915	95,04669881	0,000101416	0,048269	MT2P1
ENSG00000187193.9	5,116518	10,00388713	100,5400143	8,73041E-05	0,043739	MT1X
ENSG00000162772.17	5,802065	7,509849015	157,3998295	2,60966E-05	0,038147	ATF3
ENSG00000146592.17	6,079342	3,512358524	91,78196822	0,000111301	0,04842	CREB5

Anlamlı ekspresyon değişimi görülen bu genlerin birbirleriyle ilişkileri STRING veritabanında gösterildi (Şekil 4.19). STRING veritabanında çizilen bu etkileşim şeması, ekspresyonu değişen başlıca genlerin, veritabanlarınınca eşleştirilen ya da deneysel olarak ortaya koyulan bilinen etkileşimlerini veya tahmin edilen olası etkileşimlerini ortaya koyar.

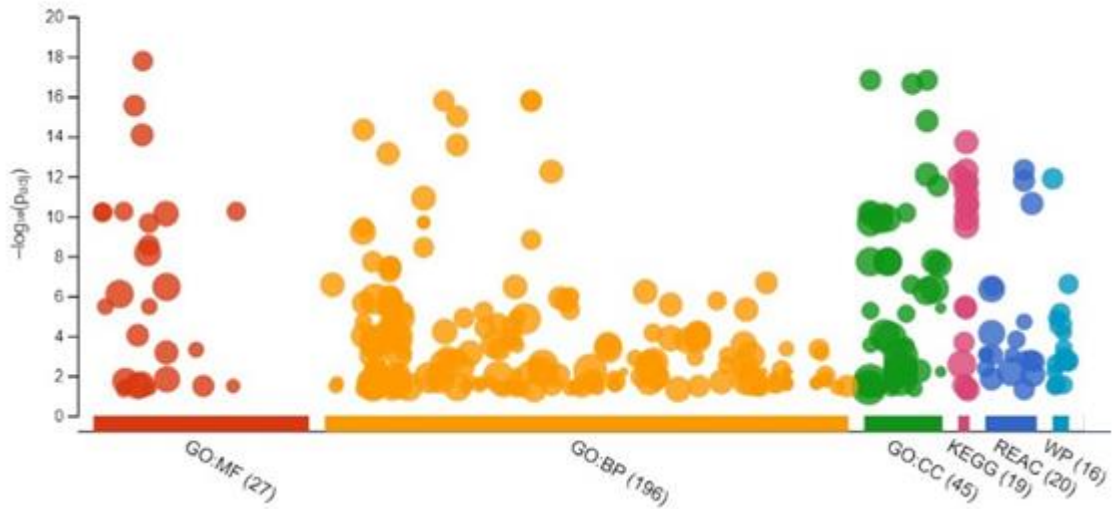


Şekil 4.19. H520 VE SK-MES-1 hücre hatlarında ekspresyonu değişen genlerin STRING veritabanında ilişkilendirilmesi.

H520 ve SK-MES-1 hücre hatlarında MBH-1 uygulamasıyla ekspresyonu değişen genleri ve hücresel süreçlere etkilerini kümülatif olarak değerlendirebilmek amacıyla G:Profiler çevrimiçi veri analiz programı kullanıldı. Bu veritabanında ekspresyonu değişen genlerin; Gen Ontoloji (moleküler fonksiyon, biyolojik süreç, hücresel bileşen) ve KEGG, REACTOME, Wikipath yolak analizleri yapıldı (Şekil 4.20.). Böylece gen setlerinin, belirli biyolojik süreçlerle veya yolaklarla hangi derecede ilişkili olduğu, genlerin belirli biyolojik yolaklar üzerindeki etkileri ve ilişkileri analiz edildi.

REACTOME yolak analizinde, tüm gen setlerinin ilişkili olduğu hücresel uyarana yanıt, strese hücresel yanıt süreçleri öne çıktı (Şekil 4.21.). Ekspresyonu azalan mitokondriyal genler elektron taşınımı ve hücresel enerjiyle ilgili genlerdi (Tablo 4.4.).

Ekspresyonu artan EIF1, HSPA5, JUN, GDF15, DDIT3, GADD34, ATF3 ve CREB5 genleri ise ER stresi ile ilgili genlerdi (Tablo 4.4). Analiz sonuçlarında çıkan PERK gen ekspresyonunun düzenlenmesi, ATF6 tarafından şaperonların aktive edilmesi, TP53 ile metabolik genlerin düzenlenmesi, ATF4'ün ER stresine yanıt olarak genleri aktive etmesi gibi sonuçlar ER stresi yollarına odaklanmamızı sağladı.

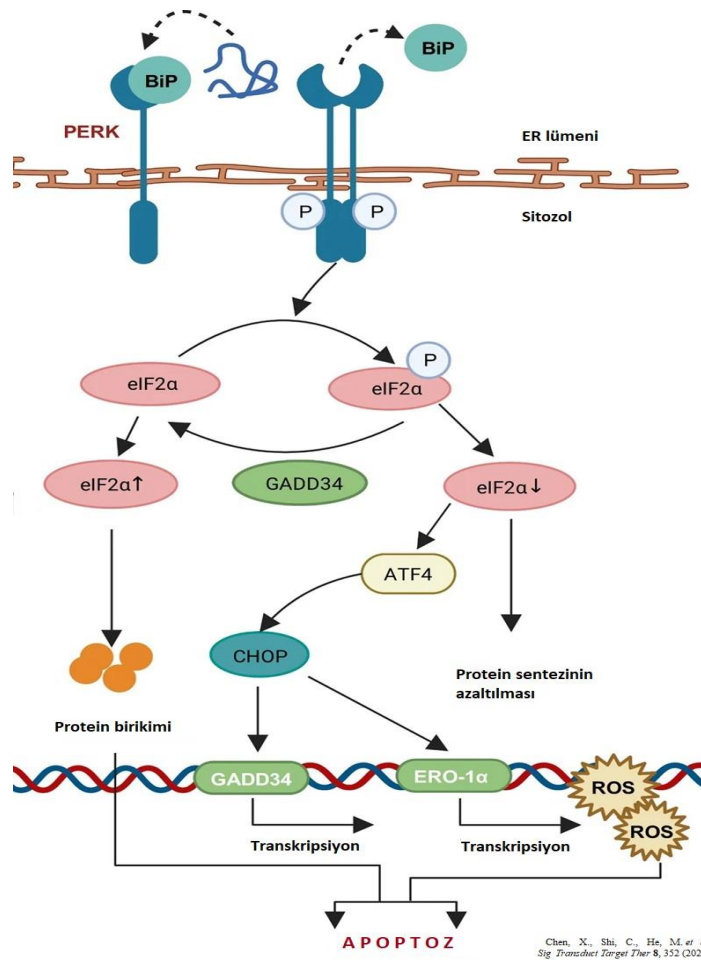


Şekil 4.20. G:Profiler veritabanında yapılan gen ontoloji ve yolak analizlerinin grafiksel gösterimi.

Term name	Term ID	Padj	$-\log_{10}(p\text{adj})$
Respiratory electron transport	REAC:R-HSA-611105	4.732×10^{-13}	13.31
Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic c...	REAC:R-HSA-163200	1.647×10^{-12}	12.04
The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport	REAC:R-HSA-1428517	2.300×10^{-11}	10.63
Complex I biogenesis	REAC:R-HSA-6799198	3.473×10^{-7}	6.46
Cellular responses to stimuli	REAC:R-HSA-8953897	4.439×10^{-7}	6.35
Response of EIF2AK1 (HRI) to heme deficiency	REAC:R-HSA-9648895	1.959×10^{-5}	4.71
Cellular responses to stress	REAC:R-HSA-2262752	7.495×10^{-5}	4.12
PERK regulates gene expression	REAC:R-HSA-381042	1.577×10^{-4}	3.80
ATF6 (ATF6-alpha) activates chaperone genes	REAC:R-HSA-381183	8.037×10^{-4}	3.09
ATF6 (ATF6-alpha) activates chaperones	REAC:R-HSA-381033	9.194×10^{-4}	3.03
Cytoprotection by HMOX1	REAC:R-HSA-9707564	9.194×10^{-4}	3.03
Metallothioneins bind metals	REAC:R-HSA-5661231	9.194×10^{-4}	3.03
Response to metal ions	REAC:R-HSA-5660526	1.400×10^{-3}	2.85
TP53 Regulates Metabolic Genes	REAC:R-HSA-5628897	1.652×10^{-3}	2.78
Unfolded Protein Response (UPR)	REAC:R-HSA-381119	1.953×10^{-3}	2.70
ATF4 activates genes in response to endoplasmic reticulum stress	REAC:R-HSA-380994	4.340×10^{-3}	2.36
Metabolism	REAC:R-HSA-1430728	6.090×10^{-3}	2.21
Transcriptional Regulation by TP53	REAC:R-HSA-3700989	8.625×10^{-3}	2.06
Cellular response to chemical stress	REAC:R-HSA-9711123	1.406×10^{-2}	1.85
Response of EIF2AK4 (GCN2) to amino acid deficiency	REAC:R-HSA-9633012	4.777×10^{-2}	1.32

Şekil 4.21. G:Profiler veritabanında yapılan REACTOME yolak analizi sonuçları.

Tüm bu analizler neticesinde, MBH-1 molekülünün Şekil 4.22.'de şematize edilen PERK/EIF2a/ATF4/CHOP ER stresi yolağına etki edebileceği öngörüldü. Bununla birlikte mRNA sekans analizlerinin FDR aralığı genişletildiğinde ($p < 0,01$) DR5 (Death Receptor 5, TRAIL-R2), PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) ve NOXA (Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1, PMAIP1) gibi apoptozla ilişkili genlerin ekspresyonlarının da arttığı ortaya koyuldu. Sekans sonuçları ile öngördüğümüz etkili yolağın desteklenmesi ve validasyonu amacıyla RT PCR çalışmaları yapıldı.



Şekil 4.22. PERK/EIF2a/ATF4/CHOP yolağı, katlanmamış protein cevabı (UPR). Kaynağından alınarak düzenlenmiştir. (Chen, X., Shi, C., He, M. et al. *Sig Transduct Target Ther* 8, 352, 2023).

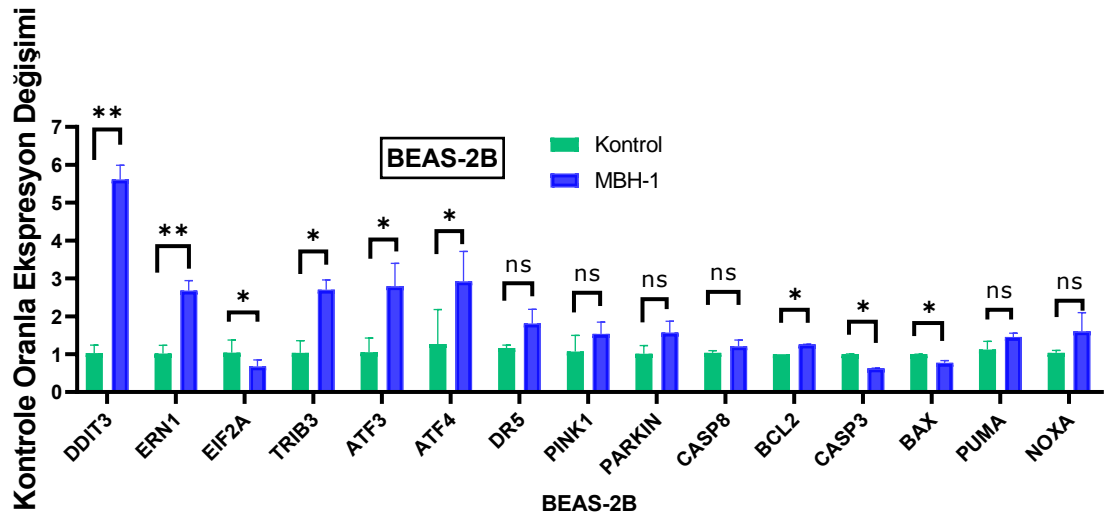
4.8. RNA Sekans Analizi Sonucunda Saptanan Genlerin Ekspresyon Değişimlerinin RT-PCR ile Validasyonu

Sekans sonuçlarının validasyonu amacıyla, sonuçlara göre belirlenen ER stresi ve apoptozla ilişkili genlerin tasarlanan primerleri ile H520, SK-MES-1, BEAS-2B hücrelerinin deney ve kontrol gruplarının reaksiyonları kuruldu. RT-PCR sonucunda çıkan ct değerlerinden, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüyle Livak metodu kullanılarak kat değişim değerleri hesaplandı. Kontrol örneklerine oranla MBH-1 uygulanan örneklerin gen ekspresyon seviyeleri kat değişim (fold change) değerleriyle yapılan Student's t-test sonucunda anlamlılık düzeyleriyle birlikte grafiklerde sunuldu (Şekil 4.23-4.25.) (ns: $p > 0,05$ anlamlı değil, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

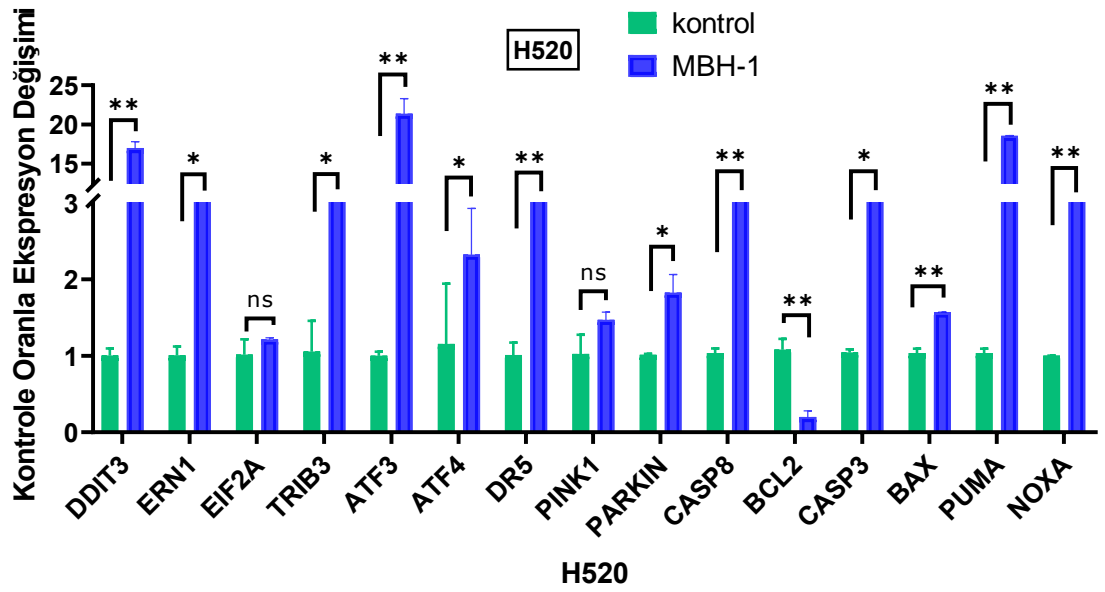
MBH-1'in üç hücre hattında da ER stresiyle ilişkili genlerin ekspresyonunu arttırarak hücrelerde ER stresini tetiklediği, bununla birlikte H520 ve SK-MES-1 kanser hücrelerinde apoptotik genlerin ekspresyonun arttığı görüldü. Burada ER stres genleri olan DDIT3/CHOP, Endoplasmic Reticulum to Nucleus Signaling 1 (ERN1, IRE1 α), Tribbles Pseudokinase 3 (TRIB3), ATF3, ATF4 gen ekspresyonlarının 3 hücre grubunda da arttığı fakat bu artışın H520 ve SK-MES-1 hücre hatlarında daha fazla olduğu ortaya koyuldu. DR5 artışı H520 ve SK-MES-1 hücre hatlarında anlamlıydı. Sekans sonuçlarındaki mitokondriyal gen ekspresyonu değişimi göz önünde bulundurularak hücrelerde mitofajiyle ilgili olan PTEN Induced Kinase 1 (Pink1) ve Parkin RBR E3 Ubiquitin Protein Ligase (PRKN) genlerinin ekspresyonları değerlendirildi. Ekspresyon artışı vardı fakat istatistiksel olarak yalnızca H520'de PRKN ekspresyonunun artışı anlamlıydı.

H520 ve SK-MES-1 hücre hatlarında, B-Cell CLL/Lymphoma 2 (BCL2) ekspresyonu azalırken, Caspase-8 (Casp-8), Caspase-3 (Casp-3), PUMA ve NOXA apoptotik genleri anlamlı ekspresyon artışı gösterdi. BAX gen ekspresyonu H520 hücre hattında anlamlı olarak arttı. BEAS-2B hücre hattında ise BCL2 artarken Casp-3 ve BCL2 Associated X (BAX) gen ekspresyonları azaldı.

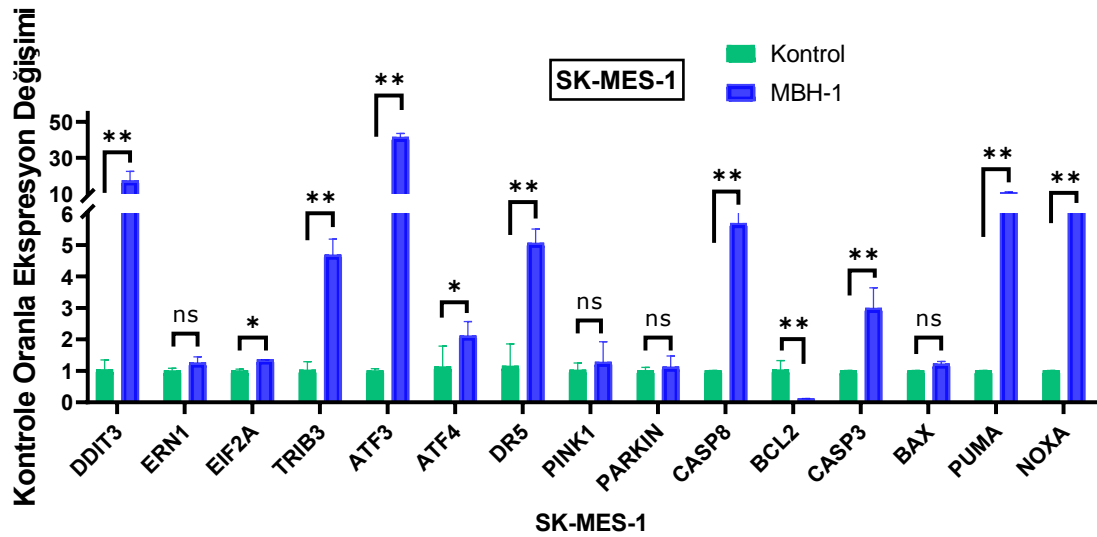
Sekans sonuçlarını destekleyen RT-PCR bulguları, ekspresyonu değişen genler doğrultusunda öngörülen yolağın ve nihai olarak apoptozun transkripsiyonel düzeyde doğrulanmasını sağladı.



Şekil 4.23. BEAS-2B hücre hattında MBH-1 uygulamasına bağlı olarak ekspresyonu değişen genler (ns: $p>0,05$ anlamlı değil, *: $p<0,05$, **: $p<0,01$).



Şekil 4.24. H520 hücre hattında MBH-1 uygulamasına bağlı olarak ekspresyonu değişen genler (ns: $p>0,05$ anlamlı değil, *: $p<0,05$, **: $p<0,01$).

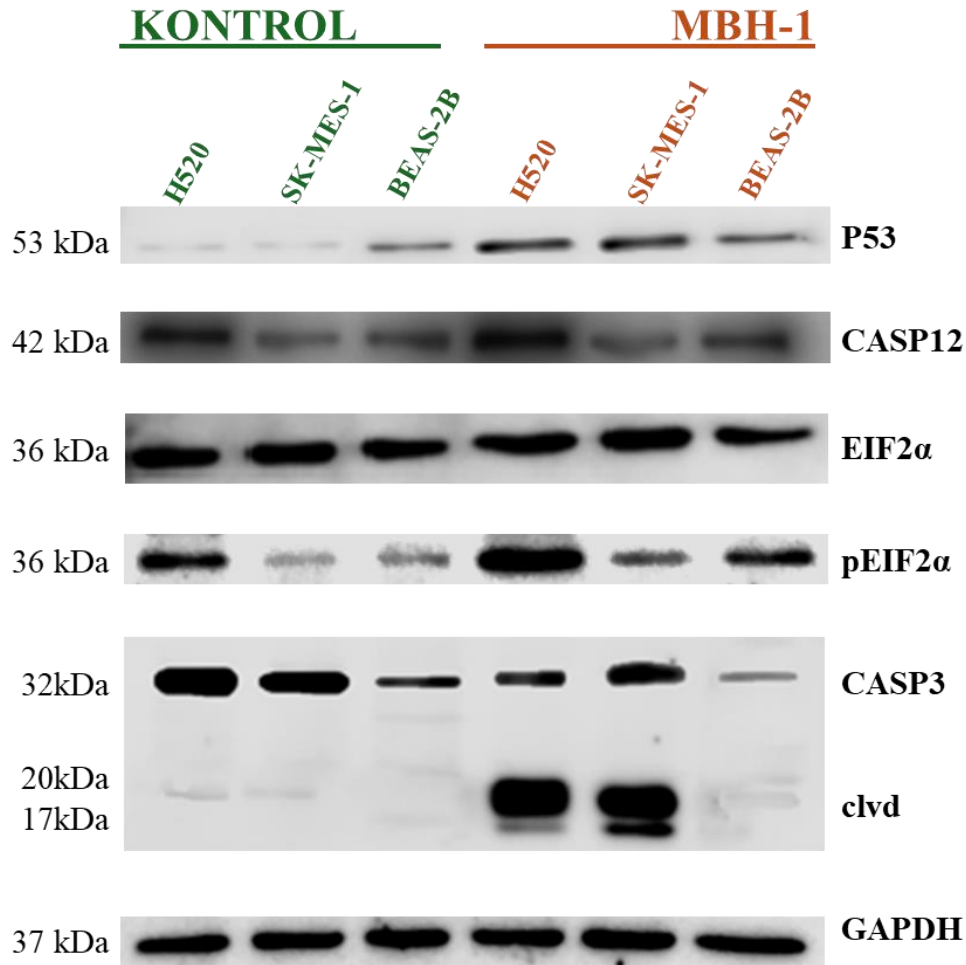


Şekil 4.25. SK-MES-1 hücre hattında MBH-1 uygulamasına bağlı olarak ekspresyonu değişen genler (ns: $p>0,05$ anlamlı değil, *: $p<0,05$, **: $p<0,01$).

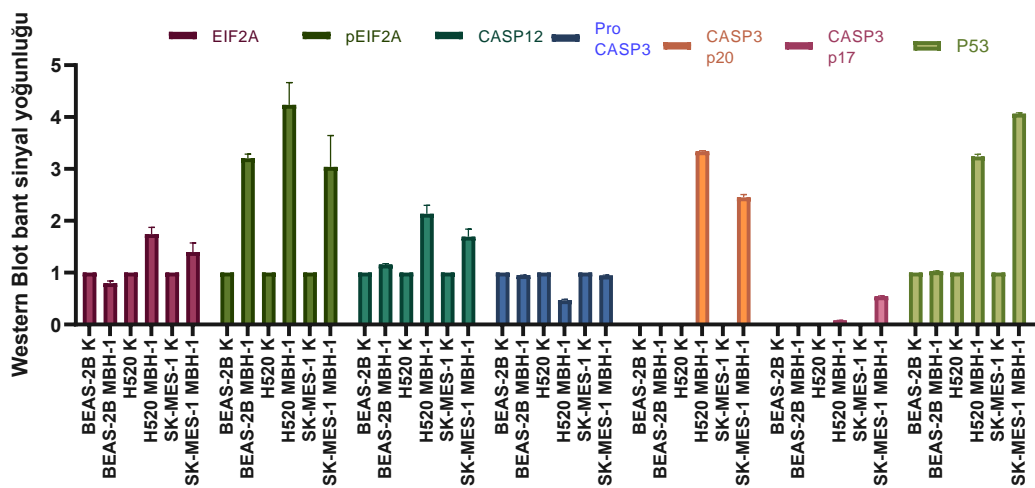
4.9. ER Stresi Yolağı PERK/EIF2a/ATF4/CHOP İlişkili Apoptozun Western Blot ile Protein Düzeyinde Validasyonu

Western Blot deneylerinin sonucunda elde edilen bantlar LiCOR Image Studio versiyon 5.5 programında bant yoğunlukları hesaplanarak, önce GAPDH ve ardından her bir hücre hattının kendi kontrolüyle normalize edilerek, kendi hücre hattı bazında değerlendirildi. Şekil 4.26'da elde edilen membran ve bant görüntüleri, yoğunluk değerleriyle birlikte sunuldu. Bu değerlerle yapılan Student's t testi analizi sonuçları grafikte sunuldu (Şekil 4.27.).

İlk olarak GAPDH bant yoğunluklarının eşit çıkmasıyla, ölçümleri yapılarak yüklenen proteinlerin eşit miktarda olduğu doğrulandı. EIF2 α protein ekspresyonları H520 ve SK-MES-1 hücre hatlarında MBH-1 örneklerinde düşük derecede arttı. Öngörülen yolağın sitozoldeki ilk basamağı olan EIF2 α fosforilasyonunun, MBH-1 uygulanan hücrelerde arttığı görüldü. Casp-3'ün MBH-1 uygulanan H520 ve SK-MES-1 hücre hatlarında kesilerek aktifleştiği, gözlemlenen "cleaved" bantlarıyla ortaya koyuldu. Casp-12, H520 ve SK-MES-1 hücrelerinde MBH-1 verilen gruplarda düşük derecede arttı. P53 protein ifadesinin de H520 ve SK-MES-1 hücre hatlarının deney gruplarında anlamlı bir şekilde arttığı görüldü.



Şekil 4.26. H520, SK-MES-1, BEAS-2B hücre hatlarının kontrol ve MBH-1 gruplarının Western Blot membran görüntüleri ve bant yoğunlukları.



Şekil 4.27. Western Blot deney sonuçları. GAPDH ile normalize edilen MBH-1 örneklerinin bant yoğunluklarının, kendi kontrollerine göre kat değişim değerleriyle karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Skvamöz hücreli akciğer kanseri (SHAK), küçük hücreli dışı akciğer kanserinin (KHDAK) önemli bir alt tipi olup tüm akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %25-30'unu oluşturur (Vellichirammal vd., 2022). SHAK epidemiyolojisi sigarayla yakından bağlantılıdır ve çalışmalar bu kanser tipinin görülme sıklığının sigara içenlerde içmeyenlere kıyasla belirgin şekilde daha yüksek olduğunu göstermektedir (Yang vd., 2022). Tütünün kanserojen bileşenleri, akciğer kanserinin gelişimini yönlendiren genetik mutasyonlara yol açar (Yang vd., 2022). Ek olarak, asbest ve diğer kirleticilere maruz kalma gibi çevresel faktörler SHAK'nin patogeneğinde rol oynamaktadır.

KHDAK'nin iki histolojik alt tipi olan, SHAK ve akciğer adenokarsinomu, sürücü genler, tedavi hedefleri ve klinik etkinlik açısından birçok farklılık sergiler. Genel olarak, adenokarsinom'da EGFR, MET ve BRAF gibi gen mutasyonları çoğunlukla kromozom 7'de meydana gelirken, SHAK'de PIK3CA, SOX2 ve TP63 gibi gen mutasyonları sıklıkla kromozom 3'te gözlenir (Shen vd., 2024). Adenokarsinomlar, özellikle EGFR, ALK, ROS, RET, MET ve HER2 gibi reseptör tirozin kinazları içeren proto-onkogen mutasyonlarının daha yüksek bir sıklıkla görülmesiyle öne çıkarken SHAK, TP53, KEAP1, PTEN ve CDKN2A gibi tümör baskılayıcı genlerin yaygın inaktivasyonunu gösterir ve çoklu sürücü mutasyon profili ile karakterize edilir (Shtivelman vd., 2014). Ayrıca, SHAK'deki EGFR mutasyonları genellikle klasik duyarlı mutasyonlar değildir; bu durum, EGFR-Tirozin Kinaz İnhibitörleri (EGFR-TKI) ile tedavi edilen hastalarda suboptimal yanıtlarla sonuçlanır (Lau vd., 2022). Geniş klinik uygulamalar, akciğer adenokarsinom hastalarının kemoterapi, hedefe yönelik tedavi ve immünoterapiden sonra adenoskuamöz dönüşüm yaşayabileceğini göstermiştir (Shao vd., 2020). Bu durum, adenoskuamöz dönüşümün klinikte potansiyel bir direnç mekanizmasının gelişimine yol açabileceğini düşündürmektedir.

SHAK'deki sürücü gen amplifikasyonlarının daha yüksek oranda olması, PIK3CA ve FGFR1 inhibitörlerinin yabancıl (wild) tip genlerle "çapraz reaktivite" göstermesine, bu durum ise klinik denemelerde önemli toksisite reaksiyonlarına yol açmaktadır (Shen vd., 2024). SHAK'de hedefe yönelik tedavi için biyomarker seçiciliğinin zayıf olması nedeniyle (Redman et al., 2020), SHAK için hedefe yönelik tedavilerde ılımlı faydalar ile yüksek toksisite arasında denge kurmak daha da zorlaşır. SHAK için tedavi seçenekleri akciğer adenokarsinomuna kıyasla daha azdır ve ileri evre SHAK hastaları genellikle daha kötü bir prognoza sahiptir. SHAK'nin karakteristik çoklu sürücü mutasyonlarını hedef alan çok hedefli inhibitörlerin geliştirilmesi, tedavisinde daha büyük atılımlara yol açabilir ya da tümör baskılayıcı genlerin özgüllüğü nedeniyle, SHAK'nin hedefe yönelik tedavi alanı epigenetik tedaviye daha fazla odaklanabilir (Shen vd., 2024)

Bu nedenle, SHAK tedavisinde doğal bileşiklerin araştırılması, daha etkili ve daha az toksik seçenekler sunabilmesi açısından önemlidir. SHAK, tedaviye yanıt veren seçeneklerin kısıtlı olması ve yüksek nüksetme oranları nedeniyle zorlu bir hastalık olarak bilinmektedir. Doğal bileşiklerin kemoterapiye direnç geliştiren hücrelerde apoptozu indüklemeye, hücre döngüsünü durdurma, büyüme ve proliferasyon inhibisyonu, gibi çoklu mekanizmalar aracılığıyla antikanser etkiler gösterebildiği günümüze kadar yapılan bir çok çalışmayla ortaya koyulmuştur.

Bu alanda yoğun araştırmaların yapıldığı bitkisel molekül aileleri arasında flavonoidler, terpenler/terpenoidler, alkaloidler, polifenoller, kumarinler, saponinler ve organosülfür bileşikleri öne çıkmaktadır. Bu bileşiklerden, flavonoidler ile polifenoller antioksidan ve antiinflamatuvar etkileriyle; terpenler ve alkaloidler ise doğrudan kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileriyle dikkat çeker (Patil, 2022; Roszkovski, 2023). Terpenler, yaygın doğal sekonder metabolitlerden oluşan büyük bir grup olup, birçok insan kanser hücresine karşı seçici sitotoksisite gösterir ve bu nedenle antikanser ajan olarak kullanım potansiyeline sahiptir (Patil, 2022). Günümüzde çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan taksol bir terpenoiddir. Terpenoidler, terpenlerden köken alan ve benzer yapıya sahip olan ancak kimyasal modifikasyonlardan geçmiş bileşiklerdir. Temel moleküler yapısında beş halkaya sahip olan pentasiklik triterpenoidlerden oleanolik asit, glisirizik asit, maslinik asit, betulinik asit, ursolik asit, hederagenin gibi çeşitli doğal moleküller klinik olarak değerlendirilmiştir (Wen vd., 2005)

Oleanolik asit (3 β -hidroksioleanolik asit-12-en-28-oik asit), birçok bitkide bulunan bir pentasiklik triterpenoiddir. OA ve türevlerinin, anti-kanser, hepatoprotektan,

anti-inflamatuar, antioksidan, kalp fonksiyonunu artırma, antiviral, anti-diyabet ve antibakteriyel gibi bir dizi biyolojik etki gösterdiği keşfedilmiştir (Pollier & Goossens, 2012) Daha ilginç olanı, kanser hücrelerinde, normal hücelere göre daha toksik olmasıdır (Dzubak vd., 2006).

Tez çalışmasında anti-kanser etkileri araştırılan 3 α -asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit (MBH-1) molekülü *Liquidambar orientalis var. integriloba* bitkisinden elde edilen bir OA türevidir. MBH-1 molekülü OA'dan farklı olarak, C3 pozisyonunda hidroksil yerine bir karbonil grubu ve A halkasında, C25 pozisyonunda metil grubu yerine hidroksil grubu bulundurur. Literatürde, C3 ve C28 pozisyonlarında modifikasyonlara sahip OA sentetik analoglarının ve çift bağ katılımı ile C halkasının modülasyonunun daha iyi kanser inhibisyonu gösterdiği ortaya koyulmuştur (Patil, 2022; Pattnaik vd., 2016).

Dat vd. tarafından yapılan bir çalışmada (2003) MBH-1'in NFAT (Nükleer Faktör Aktive T hücreleri) transkripsiyon faktörü üzerindeki inhibitör etkisi ortaya koyulmuştur. NFAT, bağışıklık yanıtlarının düzenlenmesinde kritik rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür ve aşırı aktivasyonu otoimmünite, transplant reddi ve inflamasyon gibi immünopatolojik reaksiyonlara neden olabilir. Bu çalışmada, NFAT transkripsiyon faktörünün inhibitörlerini keşfetmek amacıyla tıbbi bitkiler taranmış ve *Liquidambar formosana* meyvesinin (*Hamamelidaceae*) metanol (MeOH) ekstraktında güçlü bir inhibitör aktivite tespit edilmiştir. EtOAc fraksiyonuna odaklanarak, bu bitkiden aktiviteye dayalı fraksiyonlama ile dört oleanan triterpenoid (sıviambarik asit, oleanolik asit, 3 α -asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit ve lantanolik asit) izole edilmiştir. Bu bileşiklerden 3 α -asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit (MBH-1) en güçlü inhibitör aktiviteyi göstermiştir, bu da C-25 konumunda oksimetilen ve C-3 konumunda asetoksi grubunun inhibitör etkinliği arttırdığını göstermektedir. Çeşitli oleanolik asit türevleriyle, kanser hücreleri üzerindeki etkinliğini arttırmak üzere yapılan modifikasyonlar ve yapı farklılıklarının hücreler üzerindeki etkilerinin ortaya koyulması, ilaç geliştirme çalışmaları için çok kıymetlidir.

H520, SK-MES-1 ve BEAS-2B hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen hücre canlılığı ve sitotoksisite testlerine göre, MBH-1 uygulaması, literatürde bildirilen OA ve bazı türevlerinde olduğu gibi (Tang vd., 2022; Wu vd., 2009), skuamöz hücreli akciğer kanseri hücre hatları olan H520 ve SK-MES-1 üzerinde, normal bronşiyal epitel hücre hattı BEAS-2B'ye kıyasla daha yüksek sitotoksik etki göstermiştir. SK-MES-1 ve H520

hücre hatlarının ikisini de kapsayan IC50 aralığında 80 μ M olarak belirlenen dozda uygulandığında, kanser hücre hatları üzerinde letal bir etki yaratırken, kontrol hücre hattı olan BEAS-2B için letal bir etkiye yol açmamıştır.

OA ve bazı türevleri çeşitli kanser modellerinde tümör hücrelerinin invazyonunu, anjiyogenezini ve metastazını engellemiştir (Žibera vd., 2017). Örneğin, OA, osteosarkom (Hua vd., 2011) ve KHDAK'de (Lucio vd., 2011) in vivo olarak akciğer metastazı oranını azaltmış ve kolorektal kanserde anjiyogenezini engellemiştir (Li vd., 2016). Başka bir çalışmada, OA analoglarının insan meme kanseri hücrelerinde Brk/Paxillin/Rac1 yolağının hedeflenmesiyle migrasyon, proliferasyon ve invazyonu inhibe ettiği ortaya konulmuştur (Elsayed vd., 2015). Çalışmamızda da, bir OA türevi olan MBH-1'in, hücre migrasyonuna etkisini incelemek amacıyla MBH-1 uygulanan H520 hücrelerinde, hücre proliferasyonunun engellendiği ve kontrol hücrelerinde MBH-1 uygulanan hücrelere göre 72. saat örneklerinde yaklaşık 2 kat daha hızlı kapanma olduğu gözlemlendi. Fakat 0-72 saat arasında karşılaştırılan H520 örnekleri açısından istatistiksel olarak fark görülmedi. MBH-1 uygulanan SK-MES-1 hücrelerinde ise kontrollerine göre migrasyon anlamlı olarak engellendi ve kontrol hücrelerinde tam kapanma görülürken MBH-1 uygulanan hücrelerde kapanma olmadığı gözlemlendi. BEAS-2B normal akciğer bronşiyal epitel hücreleri ile MBH-1 uygulanmayan kontrolleri arasında fark gözlemlenmedi. Oluşturulan yara izi, iki hücre grubunda da tamamen kapandı. Bu bağlamda, MBH-1'in anti-kanser etkilerinin değerlendirildiği tez çalışmasında, SHAK hücre hatları SK-MES-1 ve H520'de migrasyonu engellediği ortaya konulmuştur.

Kanser araştırmalarında tümör hücrelerinin ankoraj-bağımsız büyüme yeteneğini değerlendirmek için yapılan soft agarda koloni oluşturma deneyi, kritik bir yöntemdir. Normal hücreler, büyümek için yüzeylere tutunmaya ihtiyaç duyarken, kanser hücreleri bağımsız olarak çoğalma yeteneğine sahiptir. SK-MES-1 ve H520'nin tümörigenik potansiyelleri üzerinde MBH-1'in etkisini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilen soft agarda koloni oluşturma deneyinde MBH-1 uygulamasının, genel olarak hem koloni sayısında hem de büyüklüğünde azalmaya yol açtığı görüldü. BEAS-2B hücrelerinde MBH-1 ve kontrol gruplarında oluşan koloniler, sayıca daha yakın olmakla birlikte, MBH-1 verilen hücrelerde koloni oluşumları daha küçüktü. Özellikle H520 ve SK-MES-1 hücrelerinde MBH-1'in, kontrol gruplarına kıyasla koloni sayısında ve boyutlarında düşüşe sebep olduğu gözlemlenmiştir. Tez çalışmasında elde edilen bu bulgular, MBH-

1'in kanser hücrelerinin ankoraj-bağımsız büyüme kapasitesini baskılayıcı bir etkiye sahip olabileceğini ve tümörigenik potansiyeli azaltabileceğini düşündürmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda benzer triterpenoid bileşiklerin çeşitli kanser hücrelerinin ankoraj-bağımsız koloni oluşumlarını baskılayarak büyüme ve tümör oluşumunu engelleyebileceği öne sürülmüştür (Lee vd., 2020, Hu vd., 2022).

MBH-1 uygulanan üç hücre hattında genel olarak apoptozun arttığı ($p < 0,01$), bununla birlikte H520 ve SK-MES-1 hücrelerinde bu artışın daha belirgin olduğu gözlemlendi. Bu da MBH-1'in bazı oleanolik asit türevleri gibi kanser hücreleri üzerinde seçici bir etkiye sahip olduğu savını güçlendirmektedir (Žibera ve ark., 2017; Tang ve ark., 2022). MBH-1 uygulamasından sonra Annexin V/FITC/PI işaretlemesi ile ortaya koyulan apoptotik hücre artışı (Şekil 4.8.- 4.10) RNA sekans analizleri ve RT-PCR sonuçlarında çıkan apoptotik gen ekspresyonlarının değişimi ile uyumludur.

Tez çalışmasında yapılan *in vitro* deneylerle MBH-1'in anti-kanser özellikleri; hücrelerde sitotoksitesi, migrasyona etkisi, ankoraj-bağımsız koloni oluşturmaya etkisi, apoptotik etkisi kapsamında araştırılıp ortaya koyulduktan sonra MBH-1'in hücreler üzerinde gösterdiği etkinin moleküler tekniklerle detaylandırılması ve gen ekspresyonu düzeyinde araştırılması için RNA sekans analizleri yapıldı. DEG, normalize edilmiş okuma sayıları üzerinden, deney grupları arasındaki anlamlı ekspresyon değişikliklerini tespit etmek amacıyla kullanıldı. H520, SK-MES-1 ve BEAS-2B hücrelerinin MBH-1 uygulanan örnekleri deney grubu, MBH-1 uygulanmayan örnekleri ise kontrol grubu olarak belirlenerek yapılan ilk analizde anlamlı ($FDR < 0.05$) farklılık gösteren genler sıralandı. Buna göre H520, SK-MES-1, BEAS-2B hücrelerinin MBH-1 grubunda, kontrol grubuna göre ASNS, GDF15, DDIT3(CHOP), CHAC1, TRIB3 genlerinin ekspresyonlarının arttığı görüldü. ASNS geni, asparajin sentezinden sorumlu enzimi kodlar ve hücrel stres yanıtında önemli bir role sahiptir. Amino asit eksikliği gibi stres durumlarında ASNS ekspresyonu artar. Endoplazmik retikulum stresi, katlanmamış protein yanıtının (UPR) PERK-eIF2 α -ATF4 kolu yoluyla ASNS transkripsiyonunu artırabilir (Balasubramanian vd., 2013). Bu mekanizmanın bir diğer bileşeni olan GDF15, inflamasyon ve doku hasarına yanıt olarak üretimi artan bir büyüme faktörüdür ve özellikle mitokondriyal stresle ilişkilendirilen hücre içi homeostazın korunmasında önemli bir rol oynar, hücrel duruma ve ortama bağlı olarak hem olumlu hem de olumsuz olarak kanser gelişimiyle ilişkilendirilmektedir (Fang vd., 2019). DDIT3 veya daha yaygın bilinen adıyla CHOP geni, endoplazmik retikulum (ER) stresiyle ilişkilidir ve pro-

apoptotik bir faktördür. Hücreler aşırı stres altındayken DDIT3 ekspresyonu artar ve apoptotik yolakla etkileşime girerek aktive edebilir. Bu gen, özellikle kanser hücrelerinde homeostazın sağlanamadığı yoğun stres durumlarında hücre ölümünün tetiklenmesinde önemli bir role sahiptir (Bhat vd., 2017). Benzer şekilde, oksidatif stresin arttığı durumlarda CHAC1 geni devreye girdiğinde, glutasyon metabolizmasını düzenleyerek hücrelerin oksidatif hasara karşı korunmasını sağlayabilir (Mungrue vd., 2009). TRIB3 de hücre içi stres sinyallerini düzenlemede önemli bir yere sahiptir. Özellikle oksidatif stres ve diğer stres faktörlerine adaptasyonda rol oynar. AKT sinyal yolları ile etkileşime girerek hücre proliferasyonu ve apoptoz mekanizmalarını dengeleyebilir. TRIB3, CHOP aracılı apoptoz yolağının aşağı akışında yer alır ve PUMA indüksiyonunun ardından AKT defosforilasyonu yoluyla apoptozu teşvik edebilir (Tsai vd., 2018). Değişen gen ekspresyonları değerlendirildiğinde MBH-1 molekülünün, çalışılan kanser hücre hatları ve sağlıklı kontrol hücre hattı üzerinde genel olarak hücresel stresi arttırdığı görülmektedir.

Yaptığımız *in vitro* deneylerde MBH-1'in kanser hücrelerinde daha etkili olduğu sonuçlarından yola çıkarak, karşılaştırmalı biyoinformatik analizler yalnızca SHAK hücre hatlarının MBH-1 grubu ve kontrol grubu arasında yeniden yapıldı. Böylece, H520 ve SK-MES-1 hücre hatlarıyla sınırlı tutulan bu karşılaştırmalar, BEAS-2B hücre hattında görülen farklı gen ekspresyon profillerinin, sonuçların anlamlılığı üzerindeki potansiyel etkisini ortadan kaldırdı. H520 ve SK-MES-1 hücre hatlarında yapılan bu analizlerde, MBH-1 uygulanan hücrelerle kontrol grubu arasında, ekspresyonu değişen istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,01$, $FDR < 0,05$) genler listelendi. Bu değerlendirme sonucunda, deney grubunda, kontrol grubuna kıyasla 11 mitokondriyal genin ekspresyonunda azalma, 10 genin ise ekspresyonunda artış tespit edildi (Tablo 4.4.). Yapılan gen ontoloji ve yolak analizlerinde, tüm gen setlerinin ilişkili olduğu hücresel uyarana yanıt, strese hücresel yanıt süreçleri öne çıktı (Şekil 4.14.). Ekspresyonu azalan mitokondriyal genler elektron taşınımı ve hücresel enerjiyle ilgili genlerdi (Şekil 4.17.). Ekspresyonu artan EIF1, HSPA5, JUN, GDF15, DDIT3, GADD34, ATF3 ve CREB5 genleri ise ER stresi ile ilgili genlerdi. Böylece biyoinformatik analiz sonuçlarında çıkan “PERK gen ekspresyonunun düzenlenmesi”, “ATF6 tarafından şaperonların aktive edilmesi”, “TP53 ile metabolik genlerin düzenlenmesi”, “ATF4'ün ER stresine yanıt olarak genleri aktive etmesi” gibi sonuçlar ER stresi yollarına odaklanmamızı sağladı.

Endoplazmik retikulum ökaryotik hücrelerde, proteinlerin sentezinde, olgunlaşmasında ve katlanmasında önemli rol oynayan bir organeldir. ER, birçok proteinin post-translasyonel değişikliklerini gerçekleştirir ve düzenler, böylece doğru protein işleyişinin devamlılığını sağlar. ER stresi, yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinlerin birikmesiyle ortaya çıkan hücrenel bir durumdur. Bu stres, oksidatif stres, besin eksikliği, kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi patolojik durumlar dahil olmak üzere çeşitli faktörler tarafından tetiklenebilir (Yao vd., 2017; Bhat vd., 2017; Sano ve Reed, 2013). ER stres tepkisi, hücrenel homeostaziye korumak için çok önemlidir ve aktive edildiğinde, katlanmamış protein tepkisi (UPR) olarak bilinen bir dizi sinyal yolağını başlatabilir (Bonsignore vd., 2023; Sano ve Reed, 2013; Hu vd., 2019).

UPR aktivasyonuna IRE1, PERK ve ATF6 olmak üzere üç ER proteini aracılık eder. MBH-1 uygulanan hücrelerde öncelikli olarak etkilenen yolağı bulmak için UPR aktivasyonuna neden olan ER stres yolakları değerlendirildi. Analizler neticesinde, MBH-1'in Şekil 4.18.'de şematize edilen PERK/EIF2a/ATF4/CHOP yolağına etki edebileceği öngörüldü. Bu bağlamda, PERK/EIF2a/ATF4/CHOP yolağıyla ilişkili RT-PCR primerleri DDIT3(CHOP), ERN1, TRB3, ATF4, ATF3 gen ekspresyonlarını araştırmak için seçildi. Bununla birlikte mRNA sekans analizlerinin FDR aralığı genişletildiğinde ($p < 0,01$) DR5, PUMA ve NOXA gibi apoptozla doğrudan ilişkili genlerin ekspresyonlarının da arttığı ortaya koyuldu. Bu nedenle yolağın devamında tetiklendiğini düşündüğümüz apoptozla ilişkili gen ekspresyonlarını araştırmak üzere; DR5, BAX, BCL-2, PUMA, NOXA, Casp-3, Casp-8 genleri RT-PCR primerleri seçildi. Sekans sonuçları ile öngördüğümüz etkili yolağın desteklenmesi ve validasyonu amacıyla yapılan RT PCR ve Western Blot çalışmaları, önceki bulgularımızı ve öngördüğümüz yolağı destekledi.

mRNA sekans analizi ve RT-PCR sonuçları, MBH-1'in H520 ve SK-MES-1 hücrelerinde ER stresi ve apoptoz yolaklarında önemli değişiklikler oluşturduğunu göstermiştir. ER stresi ile ilgili DDIT3 (CHOP), ERN1, TRIB3, ATF3 ve ATF4 gibi genlerin ekspresyonu üç hücre hattında da artmış ancak bu artış, özellikle H520 ve SK-MES-1 hücrelerinde daha belirgin olmuştur. UPR, kanser hücrelerinde hafif stres altında hücre yaşamını desteklerken, şiddetli ya da uzun süreli stres altında apoptozu tetikleyebilen çift yönlü bir rol oynar (Bhat ve ark., 2017; Chen ve Cubillos-Ruiz, 2021). PERK, eIF2 α 'yı fosforile eder; bu, protein sentezini azaltır ancak stres yanıtlarında ve apoptozda etkili genlerin ifadesini destekleyen bir transkripsiyon faktörü olan ATF4'ün

translasyonunu seçici olarak artırır (Han vd., 2013; Rozpedek vd., 2016). Bulgularımız, PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP sinyal yolağının kanser hücrelerinde ER stres altında apoptozu düzenlediğini gösteren önceki çalışmalarla uyumludur. Aynı zamanda, MBH-1 uygulanan hücrelerde EIF2 α 'nın fosforilasyonu, western blot analiziyle ortaya koyularak, öngörümüzü ve bulgularımızı doğrulamıştır.

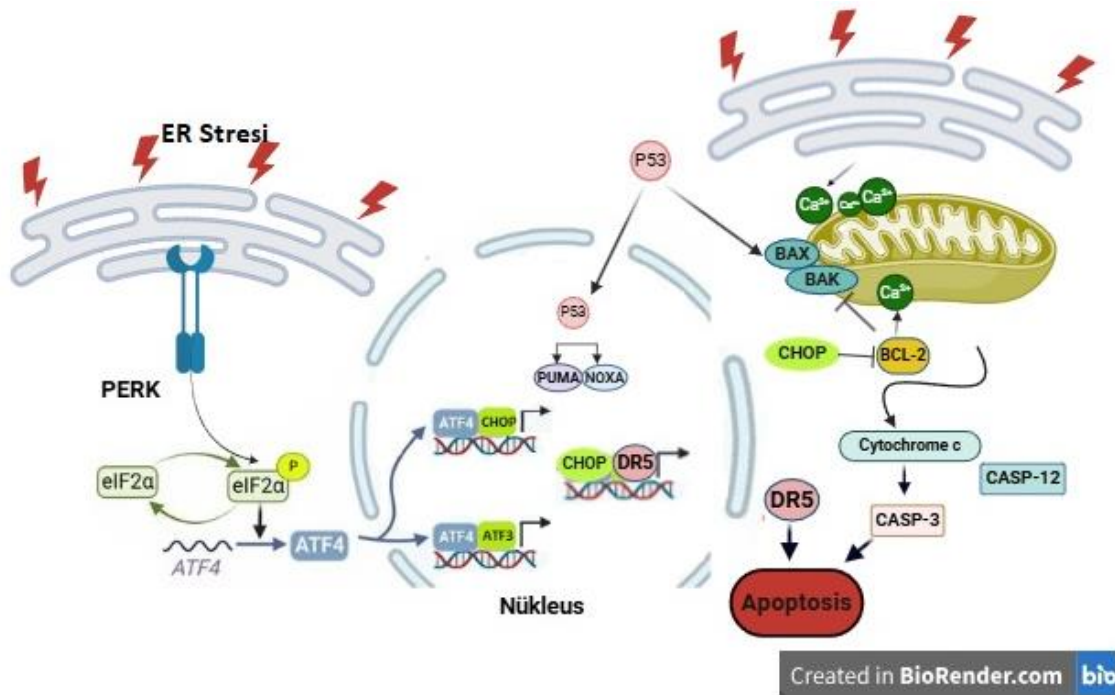
MBH-1 uygulanan SHAK hücre hatlarında PUMA, NOXA, BAX, DR5, Casp-8, Casp-3 gibi pro-apoptotik faktörlerin ekspresyonunda artış ve anti-apoptotik BCL-2'nin aşağı regülasyonu, MBH-1'in SHAK hücrelerinde apoptozu tetiklediğini düşündürmektedir. Aynı zamanda bu bulgular, ER stresine yanıt olarak, apoptozu düzenleyen genleri kontrol eden CHOP'un rolünü vurgulamaktadır. CHOP; BCL2, BCL-XL ve MCL-1 ifadelerini aşağı düzenleyebilir ve DR5, BIM, BAK ve BAX gibi çeşitli pro-apoptotik faktörlerin ekspresyonunu teşvik eder (Wang ve Kaufman, 2014). Western blot sonuçlarıyla ortaya koyulan SHAK hücrelerinde Casp-3'ün aktivasyonu, MBH-1'in intrinsik apoptotik yolak aracılığıyla programlanmış hücre ölümünü indüklediğini daha da desteklemektedir.

Literatürde ER stresi bağımlı apoptozla ilişkilendirilen Casp-12'yi de araştırdık. Aktifleşen Casp-12'nin, Casp-9 aktivasyonu yoluyla Casp-3'ü aktive eden ve böylece apoptoz indüksiyonunu güçlendiren bir döngü başlatabileceği öne sürülmüştür (Martinez vd., 2010). Casp-12, ER stresi kaynaklı UPR sırasında aktive olsa da, ER stresi kaynaklı apoptozdaki rolü hala tartışmalıdır. Casp-12 nakavt fareler üzerindeki ilk raporlar, ER stresi kaynaklı apoptozla karşı artan direnci göstermiştir (Nakagawa ve Yuan, 2000), ancak daha sonraki çalışmalar Casp-12'nin inflamatuvar yanıt sırasında daha belirgin bir role sahip olduğunu öne sürmüştür (Saleh vd., 2004, Chow vd., 2021). Bununla birlikte, ER stres kaynaklı apoptozla öncelikli olarak kalpainlerin aracılık ettiği (Sanges ve Marigo, 2006) ve artan kalsiyum seviyelerine bağlı olarak aktiflenen kalpainlerin sonrasında Casp-12'yi keserek aktive edebileceği ortaya konulmuştur.

ER stresinin doğrudan kaspaz aktivasyonuna, özellikle de başlangıçta Nakagawa ve Yuan (2000) tarafından tanımlanan Casp-12 aktivasyonuna bağlanma mekanizması hala biraz muğlaktır. Çünkü bazı çalışmalarda işlevsel bir Casp-12'nin insanlarda korunmadığı öne sürülmüştür (Fischer vd., 2002). Fakat sonrasında insan hücre hatlarında yapılan başka çalışmalarda ER stresinin indüklenmesinin ardından, apoptoz sırasında Casp-12'nin aktivasyonu bildirilmiştir (Szegezdi vd., 2003). Çalışmamızda, western blot sonuçlarına göre Casp-12, MBH-1 uygulanan SHAK hücre hatlarında az da olsa

ekspresyon artışı göstermiştir. ER stresine bağlı ekspresyon artışı olarak yorumlanabilir fakat tek başına apoptozu indüklediği söylenemez. Bununla birlikte literatürde yer aldığı gibi Casp-9 ve Casp-3'le sinerjik olarak etki gösteriyor olabilir. Bu konuda daha detaylı araştırmalara ihtiyaç vardır.

SHAK hücre hatlarında MBH-1 ile artan p53 protein ekspresyonları, apoptotik sürecin mitokondriyal ve p53-bağımlı yollara yöneldiğini düşündürmektedir. MBH-1 ile tedavi edilen hücrelerde p53 protein ekspresyonundaki artış, bu bileşiğin aynı zamanda hücrelerin stres ve DNA hasarına yanıt vermesinde kritik bir rol oynayan p53 yolağını da aktive edebileceğini göstermektedir. Tümör baskılayıcı bir protein olan p53, hücre döngüsü ilerlemesinin, kontrol noktası aktivasyonunun ve apoptozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. H520 ve SK-MES-1 hücre hatlarıyla da yapılan birkaç çalışma, p53 ekspresyon artışıyla mitokondriyal apoptoz yolağını ilişkilendirmiştir (Khanna vd., 2003, Hua vd., 2014, Jin vd., 2017). p53'ün Bax fonksiyonunun ve mitokondriyal bütünlüğün düzenlenmesi yoluyla apoptotik mekanizmayı aktive ettiği ve bunun da ROS artışı, proapoptotik proteinlerin salınımı ve kaspazların aktivasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Jin vd., 2017). Bax ekspresyonu arttıkça, mitokondriyal membrana taşınır ve membran geçirgenliği artar. Mitokondriyal membranın işlev bozukluğu, mitokondriyal transmembran potansiyelinin (MMP) dağılmasına yol açar (Kroemer G., 1997). Bu durum, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve apoptojenik proteinlerin mitokondriden sitozole salınmasına izin verir. Kaspazlar apoptoz sürecinde merkezi bir rol oynarlar (Hetz C., 2017). p53 tümör baskılayıcı proteininin strese ve apoptoza hücresele yanıtındaki rolü, özellikle akciğer kanseri bağlamında önemlidir (Niu vd., 2022, Heist vd., 2012). p53, ER stresinden kaynaklananlar da dahil olmak üzere çeşitli stres sinyallerine yanıt olarak apoptozu düzenleyen bir faktör olarak işlev görmektedir (Wang vd., 2021). MBH-1'in hem UPR hem de p53 yollarını çift yönlü olarak aktive etmesi, özellikle tedavi seçeneklerinin sınırlı kaldığı SHAK'de, antikanser etkinliği arttırmak için stratejik bir yaklaşım geliştirilmesine yardımcı olabilir.



Şekil. 4.28. 3 α -asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asitin H520 ve SK-MES-1 hücrelerinde etkilediği mekanizmaların şematik gösterimi. (Created in BioRender. TAN, S. (2024) <https://BioRender.com/o69b122>)

RNA sekans analizleri, RT-PCR ve western blot ile yapılan validasyon çalışmalarının sonuçları ve literatürdeki mevcut bilgiler ışığında, MBH-1 uygulanan SHAK hücrelerinde, Şekil 4.28.'de şematize edildiği gibi ER stresi sensörleriyle membranda aktive edilen PERK ile EIF2 α 'nın fosforilasyonunun gerçekleştiğini, böylece ekspresyonu artan ATF4'ün aktiflenerek nükleusa transloke olduğunu ve CHOP, ATF3 gibi hedef genlerinin ekspresyonunu arttırdığını düşünüyoruz. CHOP'un hedef genlerinden biri de BCL-2'dir. CHOP'un, BCL-2'yi baskıladığını, böylece intrinsik apoptoz yolağına bağlanarak BAX ekspresyonunun arttığını ve nihai olarak Casp-3'le apoptozun gerçekleştiğini düşünüyoruz.

Ekspresyonu artan p53; PUMA, NOXA ve BAX ekspresyonunu arttırarak mitokondriyal yolağına katkıda bulunmaktadır (Li vd., 2006). PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis), sadece Bcl-2 homoloji 3 ailesi proteinlerinin (Only-BH3 family protein) bir üyesidir ve p53'e bağlı veya bağımsız olarak genotoksik stres, onkogen ekspresyonu, toksinler, redoks değişiklikleri, büyüme faktörü eksikliği ve enfeksiyon gibi uyarılarla indüklenen apoptozun önemli bir düzenleyicisidir (Yu ve Zhang., 2008). Transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenen PUMA, mitokondriye ölüm sinyalleri ileterek Bax ve/veya Bak üzerinden dolaylı etki gösterir ve antiapoptotik Bcl-2 ailesi

üyelerini antagonize eder. PUMA'nın yokluğu veya inhibisyonu, apoptoz eksikliği nedeniyle kanser gelişimi ve terapötik direnç riskini artırır (Yu ve Zhang., 2008). H520 ve SK-MES-1 SHAK hücre hatlarında çok yüksek düzeyde artan PUMA ve NOXA ekspresyonları, MBH-1 ile tetiklenen ER stresi aracılı apoptoz sürecinde PUMA ve NOXA'nın da etkin bir rolü olduğunu düşündürmektedir. PUMA ve NOXA'nın ER stresi kaynaklı apoptotik yanıt sürecinde gerekli olup olmadığını tanımlamak için p53 protein ailesi (tp53, tp63, and tp73) ve transkripsiyonel hedefleriyle (PUMA/BBC3 and NOXA/PMAIP1) yapılan bir çalışmada PUMA'nın genotoksik strese bağlı p53-bağımlı apoptozun temel aracısı olduğu gösterilmiştir (Wang vd., 2021). Bu bağlamda gelecek çalışmalarda MBH-1'in p53 bağımlı/bağımsız apoptotik yollara etkisinin detaylandırılması literatüre katkı sağlayacaktır.

MBH-1 uygulanan SHAK hücre hatlarında elektron taşınması ve enerji metabolizmasıyla ilişkili mitokondriyal gen ekspresyonlarında azalma, mitokondriyal enerji metabolizmasında bozulmalara yol açtığını düşündürmektedir. Pink1 ve PRKN ekspresyonundaki artış, istatistiksel olarak yalnızca H520'de anlamlı olsa da, hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılmasına katkıda bulunabilen bir süreç olan mitofajinin (Bhat vd., 2017) aktivasyonu açısından incelenmesi gelecekteki çalışmalar için yol gösterici olabilir.

Doğal bileşikler birçok moleküler mekanizmayı etkileyerek antineoplastik özellikler gösterebilir. SHAK'de artmış mutasyon profili düşünüldüğünde bu geliştirilmeye çalışılan terapötik bir bileşik için avantajlı olduğu kadar, klinik basamakta dezavantaj da yaratabilir. Bu açıdan gelecek çalışmalarda MBH-1'in etkilediği hücresel süreçler ve yollar detaylandırılmalıdır.

ER stresi iki yönlü bir süreçtir. Aynı zamanda bu süreç hücre hattına özgü olarak ve deneysel koşullara göre değişebilir (Zhang vd., 2024). Bazı çalışmalarda kanser hücrelerinde direnci arttırabileceğinden bahsedilmiştir (Xia vd., 2021). Fakat son yıllarda yapılan çalışmalardan önemli bir kısmı, önceki bölümlerde bahsedildiği üzere kanser hücrelerinde apoptoz, otofaji, mitofaji, paraptoz gibi programlı hücre ölüm mekanizmalarını tetiklediği yönünde sonuçlar ortaya koymuştur (Bonsignore vd., 2023; Seo vd., 2023). Geniş bir hasta ve kontrol grubu kullanılarak çeşitli kanserlerde nadir varyantların analiz edildiği, yeni yayımlanan güçlü bir çalışma, hücresel stres mekanizmalarının önemini vurgulayarak, GADD34 inhibisyonunun ve EIF2 α

fosforilasyonunun artırılmasının yeni terapötik yaklaşımlarda kullanılabileceğini ortaya koymuştur (Ivarsdottir vd., 2024).

Bu bağlamda 3 α -asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit, skuamöz hücreli akciğer kanseri hücrelerinde seçici sitotoksitesi, migrasyonu ve ankoraj bağımsız koloni oluşumunu azaltıcı etkileri ve apoptotik yolları aktive etmesi açısından umut vaadeden ve yeni terapötik stratejilere ışık tutabilecek bir molekül olarak değerlendirilmelidir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, 3 α -asetoksi-25-hidroksi-olean-12-en-28-oik asitin insan SHAK hücre hatları H520 ve SK-MES-1 ile kontrol olarak kullanılan sağlıklı akciğer bronşiyal epitel hücre hattı BEAS-2B üzerindeki etkileri hücre kültürü deneyleri ve moleküler tekniklerle detaylı olarak incelenmiştir. MBH-1'in kanser hücreleri üzerindeki etkisini literatüre sunmayı ve tedavi seçeneklerinin sınırlı olduğu SHAK için yeni terapötik stratejilere katkı sağlamasını hedeflediğimiz bu çalışmada ulaştığımız sonuçlar:

I. MBH-1, SHAK hücre hatları üzerinde, BEAS-2B'ye kıyasla daha yüksek sitotoksik etki göstermiştir ve SHAK hücre hatlarında proliferasyonu baskılamaktadır.

II. MBH-1 uygulanan kanser hücrelerinde migrasyonun ve ankoraj bağımsız koloni oluşumunun engellendiği gözlemlenmiştir.

III. MBH-1 uygulaması, kanser hücre hatlarında apoptotik yanıtı artırırken, kontrol hücre hattı olan BEAS-2B hücresinde bu etkiyi göstermemiştir.

IV. ER stres genlerinde üç hücre hattında gözlenen artış, MBH-1'in ER stresini tetiklediğini desteklemektedir. Bu artışın özellikle H520 ve SK-MES-1 hücrelerinde daha belirgin olması, MBH-1'in bu hücrelerde ER stresine bağlı apoptoz sürecini hızlandırdığını göstermektedir.

V. Protein düzeyinde yapılan analizlerle, MBH-1'in, hücrelerde EIF2 α 'nın fosforilasyonu ile EIF2 α /ATF4/CHOP yolağını aktive ettiği ortaya konulmuştur.

VI. Bcl-2 gen ekspresyonunun azalması, PUMA gen ekspresyonunun yüksek seviyede artışı, Caspase-3'ün aktifleşmesi ve p53 proteinlerinin artışı, ER stresi yoluyla başlayan apoptotik sürecin mitokondriyal ve p53-bağımlı yollar üzerinden ilerlediğini desteklemektedir.

VII. MBH-1'in H520 ve SK-MES-1 hücrelerinde mitokondriyal işlevlerle ilişkili genlerin (özellikle elektron taşıma zinciriyle ilgili olanlar) ekspresyonlarını azalttığı ve mitokondriyal enerji metabolizmasında bozulmalara yol açmış olabileceği ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak, elde edilen tüm bu veriler MBH-1'in moleküler etkilerinin detaylandırılmasının yarar sağlayacağını ve skuamöz hücreli akciğer kanserinde yeni terapötik stratejilere ışık tutabileceğini göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

- Antoniou, K. M., Tomassetti, S., Tsitoura, E., & Vancheri, C. (2015). Idiopathic pulmonary fibrosis and lung cancer: a clinical and pathogenesis update. *Current opinion in pulmonary medicine*, 21(6), 626–633. <https://doi.org/10.1097/MCP.0000000000000217>
- Arslan, M.B., & Şahin, H.T. (2021). Unutulmuş bir orman ürünü kaynağı: Anadolu sığla ağacı (*Liquidambar orientalis* Miller). *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 23(2), 455-465. <https://doi.org/10.24011/barofd.765843>
- Asamura H, Nishimura K, IASLC 9th edition TNM stage proposal. WCLC 2023, abstract PL04.03
- Asamura, H., Nishimura, K. K., Giroux, D. J., Chansky, K., Hoering, A., Rusch, V., Rami-Porta, R., & Members of the IASLC Staging and Prognostic Factors Committee and of the Advisory Boards, and Participating Institutions (2023). IASLC Lung Cancer Staging Project: The New Database to Inform Revisions in the Ninth Edition of the TNM Classification of Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 18(5), 564–575. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2023.01.088>
- Bade, B. C., & Dela Cruz, C. S. (2020). Lung Cancer 2020: Epidemiology, Etiology, and Prevention. *Clinics in Chest Medicine* (C. 41, Sayı 1, ss. 1-24). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.ccm.2019.10.001>
- Baer-Dubowska, W., Narożna, M., & Krajka-Kuźniak, V. (2021). Anti-Cancer Potential of Synthetic Oleanolic Acid Derivatives and Their Conjugates with NSAIDs. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(16), 4957. <https://doi.org/10.3390/molecules26164957>
- Balasubramanian, M. N., Butterworth, E. A., & Kilberg, M. S. (2013). Asparagine synthetase: regulation by cell stress and involvement in tumor biology. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 304(8), E789–E799. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00015.2013>
- Barta, J. A., Powell, C. A., & Wisnivesky, J. P. (2019). Global Epidemiology of Lung Cancer. *Annals of global health*, 85(1), 8. <https://doi.org/10.5334/aogh.2419>
- Bennett, R. N., & Wallsgrove, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *The New phytologist*, 127(4), 617–633. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1994.tb02968.x>
- Bhat, T. A., Chaudhary, A. K., Kumar, S., O'Malley, J., Inigo, J. R., Kumar, R., Yadav, N., & Chandra, D. (2017). Endoplasmic reticulum-mediated unfolded protein response and mitochondrial apoptosis in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*

- Reviews on Cancer (C. 1867, Sayı 1, ss. 58-66). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.12.002>
- Bonsignore, G., Martinotti, S., & Ranzato, E. (2023). Endoplasmic Reticulum Stress and Cancer: Could Unfolded Protein Response Be a Druggable Target for Cancer Therapy? *International Journal of Molecular Sciences* (C. 24, Sayı 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms24021566>
- Borella, R., Forti, L., Gibellini, L., De Gaetano, A., De Biasi, S., Nasi, M., Cossarizza, A., & Pinti, M. (2019). Synthesis and Anticancer Activity of CDDO and CDDO-Me, Two Derivatives of Natural Triterpenoids. *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(22), 4097. <https://doi.org/10.3390/molecules24224097>
- Bray, F., Laversanne, M., Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Jemal, A. (2024). Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 74(3), 229-263. <https://doi.org/10.3322/caac.21834>
- Brenner, D. R., Amos, C. I., Brhane, Y., Timofeeva, M. N., Caporaso, N., Wang, Y., Christiani, D. C., Bickeböllner, H., Yang, P., Albanes, D., Stevens, V. L., Gapstur, S., McKay, J., Boffetta, P., Zaridze, D., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Rudnai, P., Fabianova, E., Mates, D., ... Hung, R. J. (2015). Identification of lung cancer histology-specific variants applying Bayesian framework variant prioritization approaches within the TRICL and ILCCO consortia. *Carcinogenesis*, 36(11), 1314–1326. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv128>
- Cao, S., Wendl, M. C., Wyczalkowski, M. A., Wylie, K., Ye, K., Jayasinghe, R., Xie, M., Wu, S., Niu, B., Grubb, R., 3rd, Johnson, K. J., Gay, H., Chen, K., Rader, J. S., Dipersio, J. F., Chen, F., & Ding, L. (2016). Divergent viral presentation among human tumors and adjacent normal tissues. *Scientific reports*, 6, 28294. <https://doi.org/10.1038/srep28294>
- Chen, X., & Cubillos-Ruiz, J. R. (2021). Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nature Reviews Cancer* (C. 21, Sayı 2, ss. 71-88). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00312-2>
- Cho, E., Hunter, D. J., Spiegelman, D., Albanes, D., Beeson, W. L., van den Brandt, P. A., Colditz, G. A., Feskanich, D., Folsom, A. R., Fraser, G. E., Freudenheim, J. L., Giovannucci, E., Goldbohm, R. A., Graham, S., Miller, A. B., Rohan, T. E., Sellers, T. A., Virtamo, J., Willett, W. C., & Smith-Warner, S. A. (2006). Intakes of vitamins A, C and E and folate and multivitamins and lung cancer: a pooled analysis of 8 prospective studies. *International journal of cancer*, 118(4), 970–978. <https://doi.org/10.1002/ijc.21441>
- Dat, N. T., Lee, I. S., Cai, X. F., Shen, G., & Kim, Y. H. (2004). Oleanane triterpenoids with inhibitory activity against NFAT transcription factor from *Liquidambar formosana*. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 27(3), 426–428. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.426>
- Dietel, M., Bubendorf, L., Dingemans, A. M., Doms, C., Elmberger, G., García, R. C., Kerr, K. M., Lim, E., López-Ríos, F., Thunnissen, E., Van Schil, P. E., & von Laffert, M. (2016). Diagnostic procedures for non-small-cell lung cancer (NSCLC): recommendations of the European Expert Group. *Thorax*, 71(2), 177–184. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2014-206677>

- Dong, J., Hu, Z., Wu, C., Guo, H., Zhou, B., Lv, J., Lu, D., Chen, K., Shi, Y., Chu, M., Wang, C., Zhang, R., Dai, J., Jiang, Y., Cao, S., Qin, Z., Yu, D., Ma, H., Jin, G., Gong, J., ... Shen, H. (2012). Association analyses identify multiple new lung cancer susceptibility loci and their interactions with smoking in the Chinese population. *Nature genetics*, 44(8), 895–899. <https://doi.org/10.1038/ng.2351>
- Dotto, G. P., & Rustgi, A. K. (2016). Squamous Cell Cancers: A Unified Perspective on Biology and Genetics. *Cancer cell*, 29(5), 622–637. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.04.004>
- Drilon, A., Rekhtman, N., Ladanyi, M., & Paik, P. (2012). Squamous-cell carcinomas of the lung: Emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy. *The Lancet Oncology* (C. 13, Sayı 10). [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70291-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70291-7)
- Duru, M. E., Çakır, A., & Harmandar, M. (2002). Composition of the volatile oils isolated from the leaves of *Liquidambar orientalis* Mill. var. *orientalis* and *L. orientalis* var. *integriloba* from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*, 17(2), 115–118. <https://doi.org/10.1002/ffj.1050>
- Dzubak, P., Hajduch, M., Vydra, D., Hustova, A., Kvasnica, M., Biedermann, D., Markova, L., Urban, M., & Sarek, J. (2006). Pharmacological activities of natural triterpenoids and their therapeutic implications. *Natural Product Reports* (C. 23, Sayı 3, ss. 394-411). <https://doi.org/10.1039/b515312n>
- Elsayed, H. E., Akl, M. R., Ebrahim, H. Y., Sallam, A. A., Haggag, E. G., Kamal, A. M., & El Sayed, K. A. (2015). Discovery, optimization, and pharmacophore modeling of oleanolic acid and analogues as breast cancer cell migration and invasion inhibitors through targeting BRK/Paxillin/Rac1 axis. *Chemical Biology & Drug Design*, 85, 231–243.
- Fang, L., Li, F., & Gu, C. (2019). GDF-15: A Multifunctional Modulator and Potential Therapeutic Target in Cancer. *Current pharmaceutical design*, 25(6), 654–662. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190402101143>
- Ferone, G., Song, J. Y., Sutherland, K. D., Bhaskaran, R., Monkhorst, K., Lambooi, J. P., Proost, N., Gargiulo, G., & Berns, A. (2016). SOX2 Is the Determining Oncogenic Switch in Promoting Lung Squamous Cell Carcinoma from Different Cells of Origin. *Cancer cell*, 30(4), 519–532. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.09.001>
- Fischer, H., Koenig, U., Eckhart, L., Tschachler, E., 2002. Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 722–726.
- Freedman, N. D., Leitzmann, M. F., Hollenbeck, A. R., Schatzkin, A., & Abnet, C. C. (2008). Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer in men and women: analysis of a prospective cohort study. *The Lancet. Oncology*, 9(7), 649–656. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70154-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70154-2)
- Fukuda, Y., Yamada, T., Wada, S. I., Sakai, K., Matsunaga, S., & Tanaka, R. (2006). Lupane and oleanane triterpenoids from the cones of *Liquidambar styraciflua*. *Journal of Natural Products*, 69(1), 142-144. <https://doi.org/10.1021/np0581014>
- Gazdar, A. F., Bunn, P. A., & Minna, J. D. (2017). Small-cell lung cancer: what we know, what we need to know and the path forward. *Nature Reviews Cancer*, 17(12), 725-737. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.87>

- Gridelli, C., Rossi, A., Carbone, D. P., Guarize, J., Karachaliou, N., Mok, T., Petrella, F., Spaggiari, L., & Rosell, R. (2015). Non-small-cell lung cancer. *Nature Reviews Disease Primers* (C. 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.9>
- Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y. H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C. L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M. S., Sartor, M. A., & Kaufman, R. J. (2013). ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nature cell biology*, 15(5), 481–490. <https://doi.org/10.1038/ncb2738>
- Heist, R. S., Sequist, L. V., & Engelman, J. A. (2012). Genetic changes in squamous cell lung cancer: a review. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 7(5), 924–933. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31824cc334>
- Herbst, R. S., Morgensztern, D., & Boshoff, C. (2018). The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature* (C. 553, Sayı 7689, ss. 446-454). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature25183>
- Hetz C. (2017). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(2), 89–102. <https://doi.org/10.1038/nrm3270>
- Hetz, C., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(8), 421–438. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0250-z>
- Hong, S., Mok, Y., Jeon, C., Jee, S. H., & Samet, J. M. (2016). Tuberculosis, smoking and risk for lung cancer incidence and mortality. *International journal of cancer*, 139(11), 2447–2455. <https://doi.org/10.1002/ijc.30384>
- Hu, D., Meng, R. Y., Nguyen, T. V., Chai, O. H., Park, B. H., Lee, J. S., & Kim, S. M. (2023). Inhibition of colorectal cancer tumorigenesis by ursolic acid and doxorubicin is mediated by targeting the Akt signaling pathway and activating the Hippo signaling pathway. *Molecular medicine reports*, 27(1), 11. <https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12898>
- Hua, Y., Zhang, Z., Li, J., Li, Q., Hu, S., Li, J., Sun, M., & Cai, Z. (2011). Oleanolic acid derivative Dex-OA has potent anti-tumor and anti-metastatic activity on osteosarcoma cells in vitro and in vivo. *Investigational New Drugs*, 29, 258–265.
- Hua, P., Zhang, G., Zhang, Y., Sun, M., Cui, R., Li, X., Li, B., & Zhang, X. (2016). Costunolide induces G1/S phase arrest and activates mitochondrial-mediated apoptotic pathways in SK-MES 1 human lung squamous carcinoma cells. *Oncology letters*, 11(4), 2780–2786. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4295>
- Hubbard, R., Venn, A., Lewis, S., & Britton, J. (2000). Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161(1), 5–8. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.1.9906062>
- Hung, R. J., Christiani, D. C., Risch, A., Popanda, O., Haugen, A., Zienolddiny, S., Benhamou, S., Bouchardy, C., Lan, Q., Spitz, M. R., Wichmann, H. E., LeMarchand, L., Vineis, P., Matullo, G., Kiyohara, C., Zhang, Z. F., Pezeshki, B., Harris, C., Mechanic, L., Seow, A., ... Brennan, P. (2008). International Lung

- Cancer Consortium: pooled analysis of sequence variants in DNA repair and cell cycle pathways. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 17(11), 3081–3089. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-0411>
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2012). Personal habits and indoor combustions. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 100(Pt E), 1–538.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Man-made Mineral Fibres and Radon. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer; 1988. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 43.) Man-Made Mineral Fibres. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK316363/>
- Ivarsdottir, E. V., Gudmundsson, J., Tragante, V., Sveinbjornsson, G., Kristmundsdottir, S., Stacey, S. N., Halldorsson, G. H., Magnusson, M. I., Oddsson, A., Walters, G. B., Sigurdsson, A., Saevarsdottir, S., Beyter, D., Thorleifsson, G., Halldorsson, B. V., Melsted, P., Stefansson, H., Jonsdottir, I., Sørensen, E., Pedersen, O. B., ... Stefansson, K. (2024). Gene-based burden tests of rare germline variants identify six cancer susceptibility genes. *Nature genetics*, 56(11), 2422–2433. <https://doi.org/10.1038/s41588-024-01966-6>
- Jin, C., Zhang, G., Zhang, Y., Hua, P., Song, G., Sun, M., Li, X., Tong, T., Li, B., & Zhang, X. (2017). Isoalantolactone induces intrinsic apoptosis through p53 signaling pathway in human lung squamous carcinoma cells. *PloS one*, 12(8), e0181731. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181731>
- Khanna, N., Jayaram, H. N., & Singh, N. (2004). Benzamide riboside induced mitochondrial mediated apoptosis in human lung cancer H520 cells. *Life sciences*, 75(2), 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.11.026>
- Kim, Y., Hammerman, P. S., Kim, J., Yoon, J. A., Lee, Y., Sun, J. M., Wilkerson, M. D., Pedamallu, C. S., Cibulskis, K., Yoo, Y. K., Lawrence, M. S., Stojanov, P., Carter, S. L., McKenna, A., Stewart, C., Sivachenko, A. Y., Oh, I. J., Kim, H. K., Choi, Y. S., Kim, K., ... Park, K. (2014). Integrative and comparative genomic analysis of lung squamous cell carcinomas in East Asian patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(2), 121–128. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.8556>
- Kirk, G. D., Merlo, C., O' Driscoll, P., Mehta, S. H., Galai, N., Vlahov, D., Samet, J., & Engels, E. A. (2007). HIV infection is associated with an increased risk for lung cancer, independent of smoking. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45(1), 103–110. <https://doi.org/10.1086/518606>
- Kroemer G. (1997). The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature medicine*, 3(6), 614–620. <https://doi.org/10.1038/nm0697-614>
- Lau, S. C. M., Pan, Y., Velcheti, V., & Wong, K. K. (2022). Squamous cell lung cancer: Current landscape and future therapeutic options. *Cancer Cell (C. 40, Say1 11, ss. 1279-1293)*. Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2022.09.018>
- Lee, N. R., Meng, R. Y., Rah, S. Y., Jin, H., Ray, N., Kim, S. H., Park, B. H., & Kim, S. M. (2020). Reactive Oxygen Species-Mediated Autophagy by Ursolic Acid

- Inhibits Growth and Metastasis of Esophageal Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*, 21(24), 9409. <https://doi.org/10.3390/ijms21249409>
- Leiter, A., Veluswamy, R. R., & Wisnivesky, J. P. (2023). The global burden of lung cancer: current status and future trends. *Nature Reviews Clinical Oncology (C. 20, Say1 9*, ss. 624-639). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41571-023-00798-3>
- Li, J., Lee, B., & Lee, A. S. (2006). Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53. *The Journal of biological chemistry*, 281(11), 7260–7270. <https://doi.org/10.1074/jbc.M509868200>
- Li, L., Lin, J., Sun, G., Wei, L., Shen, A., Zhang, M., & Peng, J. (2016). Oleanolic acid inhibits colorectal cancer angiogenesis in vivo and in vitro via suppression of STAT3 and Hedgehog pathways. *Molecular Medicine Reports*, 13, 5276–5282.
- Li, Y., & Hecht, S. S. (2022). Metabolic Activation and DNA Interactions of Carcinogenic *N*-Nitrosamines to Which Humans Are Commonly Exposed. *International journal of molecular sciences*, 23(9), 4559. <https://doi.org/10.3390/ijms23094559>
- Littman, A. J., Jackson, L. A., & Vaughan, T. L. (2005). Chlamydia pneumoniae and lung cancer: epidemiologic evidence. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(4), 773–778. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0599>
- Lu, Y., Futtner, C., Rock, J. R., Xu, X., Whitworth, W., Hogan, B. L., & Onaitis, M. W. (2010). Evidence that SOX2 overexpression is oncogenic in the lung. *PloS one*, 5(6), e11022. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011022>
- Lucio, K. A., Rocha Gda, G., Moncao-Ribeiro, L. C., Fernandes, J., Takiya, C. M., & Gattass, C. R. (2011). Oleanolic acid initiates apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines and reduces metastasis of a B16F10 melanoma model in vivo. *PLoS ONE*, 6, e28596.
- Malhotra, J., & Boffetta, P. (2020). Epidemiology of occupational lung cancer. In *Occupational Cancers* (pp. 287-294). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30766-0_15
- Malo, J., Benlaïfaoui, M., Lehoux-Dubois, C., Mendez Salazar, E., Diop, K., Ponce, M., Kourtian, S., Maillou, J., Moreau-Amaru, D., Duttagupta, S., Belkaid, W., Blais, N., Tehfe, M., Florescu, M., Elkrief, A., Messaoudene, M., Marcil, V., & Routy, B. (2024). Correlation between diet, microbiome composition and clinical outcomes in patients with non-small cell lung cancer. *ESMO Open*, 9(Supplement 3), 102652. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2024.102652>
- Martinez, J. A., Zhang, Z., Svetlov, S. I., Hayes, R. L., Wang, K. K., & Larner, S. F. (2010). Calpain and caspase processing of caspase-12 contribute to the ER stress-induced cell death pathway in differentiated PC12 cells. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 15(12), 1480–1493. <https://doi.org/10.1007/s10495-010-0526-4>
- McKay, J. D., Hung, R. J., Gaborieau, V., Boffetta, P., Chabrier, A., Byrnes, G., Zaridze, D., Mukeria, A., Szeszenia-Dabrowska, N., Lissowska, J., Rudnai, P., Fabianova,

- E., Mates, D., Bencko, V., Foretova, L., Janout, V., McLaughlin, J., Shepherd, F., Montpetit, A., Narod, S., ... Brennan, P. (2008). Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nature genetics*, 40(12), 1404–1406. <https://doi.org/10.1038/ng.254>
- McKay, J. D., Hung, R. J., Han, Y., Zong, X., Carreras-Torres, R., Christiani, D. C., Caporaso, N. E., Johansson, M., Xiao, X., Li, Y., Byun, J., Dunning, A., Pooley, K. A., Qian, D. C., Ji, X., Liu, G., Timofeeva, M. N., Bojesen, S. E., Wu, X., Le Marchand, L., ... Amos, C. I. (2017). Large-scale association analysis identifies new lung cancer susceptibility loci and heterogeneity in genetic susceptibility across histological subtypes. *Nature genetics*, 49(7), 1126–1132. <https://doi.org/10.1038/ng.3892>
- Mukhopadhyay, A., Berrett, K. C., Kc, U., Clair, P. M., Pop, S. M., Carr, S. R., Witt, B. L., & Oliver, T. G. (2014). Sox2 cooperates with Lkb1 loss in a mouse model of squamous cell lung cancer. *Cell reports*, 8(1), 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.036>
- Mungrue, I. N., Pagnon, J., Kohannim, O., Gargalovic, P. S., & Lulis, A. J. (2009). CHAC1/MGC4504 Is a Novel Proapoptotic Component of the Unfolded Protein Response, Downstream of the ATF4-ATF3-CHOP Cascade 1. *J Immunol (C)*. 182, Sayı 1).
- Nakagawa, T., & Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *The Journal of cell biology*, 150(4), 887–894. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.4.887>
- Nicholson, A. G., Tsao, M. S., Beasley, M. B., Borczuk, A. C., Brambilla, E., Cooper, W. A., Dacic, S., Jain, D., Kerr, K. M., Lantuejoul, S., Noguchi, M., Papotti, M., Rekhtman, N., Scagliotti, G., van Schil, P., Sholl, L., Yatabe, Y., Yoshida, A., & Travis, W. D. (2022). The 2021 WHO Classification of Lung Tumors: Impact of Advances Since 2015. *Journal of Thoracic Oncology (C)*. 17, Sayı 3, ss. 362–387). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.11.003>
- Niu, Z., Jin, R., Zhang, Y., & Li, H. (2022). Signaling pathways and targeted therapies in lung squamous cell carcinoma: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy (C)*. 7, Sayı 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01200-x>
- Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Jr, Valanis, B., Williams, J. H., Jr, Barnhart, S., Cherniack, M. G., Brodtkin, C. A., & Hammar, S. (1996). Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(21), 1550–1559. <https://doi.org/10.1093/jnci/88.21.1550>
- Öztürk, M., Çelik, A., Güvensen, A., & Hamzaoğlu, E. (2008). Ecology of tertiary relict endemic *Liquidambar orientalis* Mill. forests. *Forest Ecology and Management*, 256(4), 510–518. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.01.027>
- Patil, V. M. (2022). Structure-activity relationship studies on anti-cancer bioactive natural products. *Studies in Natural Products Chemistry (C)*. 72, ss. 147–199). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823944-5.00013-2>
- Pattnaik, B., Lakshma Nayak, V., Ramakrishna, S., & Venkata Mallavadhani, U. (2016). Synthesis of ring-C modified oleanolic acid derivatives and their cytotoxic

- evaluation. *Bioorganic Chemistry*, 68, 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.08.001>.
- Pollier, J., & Goossens, A. (2012). Oleanolic acid. *Phytochemistry*, 77, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.12.022>
- Raaschou-Nielsen, O., Andersen, Z. J., Beelen, R., Samoli, E., Stafoggia, M., Weinmayr, G., Hoffmann, B., Fischer, P., Nieuwenhuijsen, M. J., Brunekreef, B., Xun, W. W., Katsouyanni, K., Dimakopoulou, K., Sommar, J., Forsberg, B., Modig, L., Oudin, A., Oftedal, B., Schwarze, P. E., Nafstad, P., ... Hoek, G. (2013). Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *The Lancet. Oncology*, 14(9), 813–822. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70279-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70279-1)
- Raaschou-Nielsen, O., Beelen, R., Wang, M., Hoek, G., Andersen, Z. J., Hoffmann, B., Stafoggia, M., Samoli, E., Weinmayr, G., Dimakopoulou, K., Nieuwenhuijsen, M., Xun, W. W., Fischer, P., Eriksen, K. T., Sørensen, M., Tjønneland, A., Ricceri, F., de Hoogh, K., Key, T., Eeftens, M., ... Vineis, P. (2016). Particulate matter air pollution components and risk for lung cancer. *Environment international*, 87, 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.11.007>
- Redman, M. W., Papadimitrakopoulou, V. A., Minichiello, K., Hirsch, F. R., Mack, P. C., Schwartz, L. H., Vokes, E., Ramalingam, S., Leighl, N., Bradley, J., Miao, J., Moon, J., Highleyman, L., Miwa, C., LeBlanc, M. L., Malik, S., Miller, V. A., Sigal, E. V., Adam, S., Wholley, D., ... Herbst, R. S. (2020). Biomarker-driven therapies for previously treated squamous non-small-cell lung cancer (Lung-MAP SWOG S1400): a biomarker-driven master protocol. *The Lancet. Oncology*, 21(12), 1589–1601. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30475-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30475-7)
- Rock, J. R., Onaitis, M. W., Rawlins, E. L., Lu, Y., Clark, C. P., Xue, Y., Randell, S. H., & Hogan, B. L. (2009). Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12771–12775. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906850106>
- Roszkowski S. (2023). Application of Polyphenols and Flavonoids in Oncological Therapy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 28(10), 4080. <https://doi.org/10.3390/molecules28104080>
- Sabbula BR, Gasalberti DP, Mukkamalla SKR, et al. Squamous Cell Lung Cancer. [Updated 2024 Feb 14]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564510/>
- Sakai, K., Fukuda, Y., Matsunaga, S., Tanaka, R., & Yamori, T. (2004). New cytotoxic oleanane-type triterpenoids from the cones of *Liquidamber styraciflua*. *Journal of Natural Products*, 67(7), 1088-1093. <https://doi.org/10.1021/np0305369>
- Saleh, M., Vaillancourt, J. P., Graham, R. K., Huyck, M., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Steinberg, M. H., Nolan, V., Baldwin, C. T., Hotchkiss, R. S., Buchman, T. G., Zehnauer, B. A., Hayden, M. R., Farrer, L. A., Roy, S., & Nicholson, D. W. (2004). Differential modulation of endotoxin responsiveness by human caspase-12 polymorphisms. *Nature*, 429(6987), 75–79. <https://doi.org/10.1038/nature02451>

- Sanges, D., & Marigo, V. (2006). Cross-talk between two apoptotic pathways activated by endoplasmic reticulum stress: differential contribution of caspase-12 and AIF. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 11(9), 1629–1641. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-9006-2>
- Sano, R., & Reed, J. C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*, 1833(12), 3460–3470. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.028>
- Sánchez-Danés, A., & Blanpain, C. (2018). Deciphering the cells of origin of squamous cell carcinomas. *Nature reviews. Cancer*, 18(9), 549–561. <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0024-5>
- Shao, Y., Zhong, D. S., & Guan, S. S. (2020). Histologic transformation of lung adenocarcinoma to squamous cell carcinoma after chemotherapy: two case reports. *Translational cancer research*, 9(1), 388–393. <https://doi.org/10.21037/tcr.2019.11.34>
- Shen, Y., Chen, J.-Q., & Li, X.-P. (2024). Differences between lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma: Driver genes, therapeutic targets, and clinical efficacy. *Genes & Diseases*, 101374. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2024.101374>
- Shiraishi, K., Kunitoh, H., Daigo, Y., Takahashi, A., Goto, K., Sakamoto, H., Ohnami, S., Shimada, Y., Ashikawa, K., Saito, A., Watanabe, S., Tsuta, K., Kamatani, N., Yoshida, T., Nakamura, Y., Yokota, J., Kubo, M., & Kohno, T. (2012). A genome-wide association study identifies two new susceptibility loci for lung adenocarcinoma in the Japanese population. *Nature genetics*, 44(8), 900–903. <https://doi.org/10.1038/ng.2353>
- Shtivelman, E., Hensing, T., Simon, G. R., Dennis, P. A., Otterson, G. A., Bueno, R., & Salgia, R. (2014). Molecular pathways and therapeutic targets in lung cancer. *Oncotarget*, 5(6), 1392–1433. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1891>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7-30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Smith, C. J., Perfetti, T. A., Rumple, M. A., Rodgman, A., & Doolittle, D. J. (2001). "IARC Group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 39(2), 183–205. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(00\)00164-2](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(00)00164-2)
- Suarez-Arnedo, A., Torres Figueroa, F., Clavijo, C., Arbeláez, P., Cruz, J. C., & Muñoz-Camargo, C. (2020). An ImageJ plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLOS ONE*, 15(7), e0232565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232565>
- Sun, H., Fang, W. S., & Hu, C. (2008). An efficient semi-synthesis and structure revision of a cytotoxic triterpenoid 25-acetoxy-3 α -hydroxyolean-12-en-28-oic acid from *Liquidamber styraciflua*. *Journal of Asian Natural Products Research*, 10(4), 271-276. <https://doi.org/10.1080/10286020701766539>
- Syrjänen K. J. (1980). Bronchial squamous cell carcinomas associated with epithelial changes identical to condylomatous lesions of the uterine cervix. *Lung*, 158(3), 131–142. <https://doi.org/10.1007/BF02713715>

- Szegezdi, E., Fitzgerald, U., & Samali, A. (2003). Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1010, 186–194. <https://doi.org/10.1196/annals.1299.032>
- Tang, Z. Y., Li, Y., Tang, Y. T., Ma, X. D., & Tang, Z. Y. (2022). Anticancer activity of oleanolic acid and its derivatives: Recent advances in evidence, target profiling and mechanisms of action. *Biomedicine and Pharmacotherapy (C. 145)*. Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112397>
- Travis, W. D., Brambilla, E., & Riely, G. J. (2013). New pathologic classification of lung cancer: Relevance for clinical practice and clinical trials. *Journal of Clinical Oncology (C. 31, Sayı 8, ss. 992-1001)*. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.9270>
- Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., ... & Powell, C. A. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of genetic, clinical, and radiologic advances since the 2004 classification. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9), 1243-1260. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000630>
- Tsai, D. H., Chung, C. H., & Lee, K. T. (2018). *Antrodia cinnamomea* induces autophagic cell death via the CHOP/TRB3/Akt/mTOR pathway in colorectal cancer cells. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35780-y>
- Turner, M. C., Chen, Y., Krewski, D., Calle, E. E., & Thun, M. J. (2007). Chronic obstructive pulmonary disease is associated with lung cancer mortality in a prospective study of never smokers. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 176(3), 285–290. <https://doi.org/10.1164/rccm.200612-1792OC>
- Vellichirammal, N., Albahrani, A., & Guda, C. (2022). Fusion gene recurrence in non-small cell lung cancers and its association with cigarette smoke exposure. *Translational Lung Cancer Research*, 11(10), 2022-2039. <https://doi.org/10.21037/tlcr-22-113>
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6059), 1081–1086. <https://doi.org/10.1126/science.1209038>
- Wang, M., & Kaufman, R. J. (2014). The impact of the endoplasmic reticulum protein-folding environment on cancer development. *Nature reviews. Cancer*, 14(9), 581–597. <https://doi.org/10.1038/nrc3800>
- Wang, J., Thomas, H. R., Li, Z., Yeo, N. C., Scott, H. E., Dang, N., Hossain, M. I., Andrabi, S. A., & Parant, J. M. (2021). Puma, noxa, p53, and p63 differentially mediate stress pathway-induced apoptosis. *Cell Death and Disease*, 12, 659. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03902-6>
- Wang, X., Ricciuti, B., Nguyen, T., Li, X., Rabin, M. S., Awad, M. M., Lin, X., Johnson, B. E., & Christiani, D. C. (2021). Association between Smoking History and Tumor Mutation Burden in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer research*, 81(9), 2566–2573. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-3991>
- WEB1: <https://www.ilcn.org/comments-on-the-8th-edition-of-the-tnm-classification-of-lung-cancer/>
- WEB2:https://toraks.org.tr/site/sf/books/pre_migration/b68519154cbccde07a387687e60523fa91dda3554c006e7daf02b909bc70a6b2.pdf

- WEB3: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/illumina_prep/RNA/illumina-stranded-mrna-reference-guide-1000000124518-02.pdf
- WEB4: https://support-docs.illumina.com/SW/DRAGEN_v41/illumina-dragen-bio-it-platform-v41-200034077-00.pdf
- Weeden, C. E., Chen, Y., Ma, S. B., Hu, Y., Ramm, G., Sutherland, K. D., Smyth, G. K., & Asselin-Labat, M. L. (2017). Lung Basal Stem Cells Rapidly Repair DNA Damage Using the Error-Prone Nonhomologous End-Joining Pathway. *PLoS biology*, 15(1), e2000731. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000731>
- Wen, X., Sun, H., Liu, J., Wu, G., Zhang, L., Wu, X., & Ni, P. (2005). Pentacyclic triterpenes. Part 1: The first examples of naturally occurring pentacyclic triterpenes as a new class of inhibitors of glycogen phosphorylases. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 15(22), 4944-4948. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.08.026>
- Wu, P. K., Chi Shing Tai, W., Liang, Z. T., Zhao, Z. Z., & Hsiao, W. L. (2009). Oleanolic acid isolated from *Oldenlandia diffusa* exhibits a unique growth inhibitory effect against ras-transformed fibroblasts. *Life sciences*, 85(3-4), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.04.025>
- Xia, S., Duan, W., Liu, W., Zhang, X., & Wang, Q. (2021). GRP78 in lung cancer. *Journal of translational medicine*, 19(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s12967-021-02786-6>
- Yang, H., Zeng, X., Tong, W., Yao, G., Lan, C., Liu, J., ... & Zhong, N. (2022). Influence of abo blood group on susceptibility to different pathological types of lung cancer: a retrospective study. *World Journal of Surgical Oncology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12957-022-02845-2>
- Yang, P., Sun, Z., Krowka, M. J., Aubry, M. C., Bamlet, W. R., Wampfler, J. A., Thibodeau, S. N., Katzmann, J. A., Allen, M. S., Midthun, D. E., Marks, R. S., & de Andrade, M. (2008). Alpha1-antitrypsin deficiency carriers, tobacco smoke, chronic obstructive pulmonary disease, and lung cancer risk. *Archives of internal medicine*, 168(10), 1097–1103. <https://doi.org/10.1001/archinte.168.10.1097>
- Yao, Y., Lu, Q., Hu, Z., Yu, Y., Chen, Q., & Wang, Q. K. (2017). A non-canonical pathway regulates ER stress signaling and blocks ER stress-induced apoptosis and heart failure. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00171-w>
- Yu, J., & Zhang, L. (2008). PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27 *Suppl 1*(Suppl 1), S71–S83. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.45>
- Yüzer, Ö., Tonguç, A., & Doğaç, E. (2024). Genetic characterization of relict endemic liquidambar orientalis (altingiaceae) populations. *Mugla Journal of Science and Technology*, 10(1), 42-50. <https://doi.org/10.22531/muglajsci.1419958>
- Zang, E. A., & Wynder, E. L. (1996). Differences in lung cancer risk between men and women: examination of the evidence. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(3-4), 183–192. <https://doi.org/10.1093/jnci/88.3-4.183>
- Zhang, W., Shi, Y., Oyang, L., Cui, S., Li, S., Li, J., Liu, L., Li, Y., Peng, M., Tan, S., Xia, L., Lin, J., Xu, X., Wu, N., Peng, Q., Tang, Y., Luo, X., Liao, Q., Jiang, X.,

- & Zhou, Y. (2024). Endoplasmic reticulum stress-a key guardian in cancer. *Cell death discovery*, 10(1), 343. <https://doi.org/10.1038/s41420-024-02110-3>
- Žiberna, L., Šamec, D., Mocan, A., Nabavi, S. F., Bishayee, A., Farooqi, A. A., Sureda, A., & Nabavi, S. M. (2017). Oleanolic acid alters multiple cell signaling pathways: Implication in cancer prevention and therapy. *International Journal of Molecular Sciences* (C. 18, Sayı 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18030643>
- Zou, K., Sun, P., Huang, H., Zhuo, H., Qie, R., Xie, Y., Luo, J., Li, N., Li, J., He, J., Aschebrook-Kilfoy, B., & Zhang, Y. (2022). Etiology of lung cancer: Evidence from epidemiologic studies. *Journal of the National Cancer Center* (C. 2, Sayı 4, ss. 216-225). Chinese National Cancer Center. <https://doi.org/10.1016/j.jncc.2022.09.004>

EKLER



Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

Investigation of diabetes-related molecular changes in embryo-endometrium crosstalk

Semih Tan ^{a,*}, Seçil Tan ^b, Onur Tokgün ^b, Hülya Çetin ^c, Elvan Tokgün ^b, Saim Özdamar ^c^a *Ordu University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Türkiye*^b *Pamukkale University, Faculty of Medicine, Department of Medical Genetic, Türkiye*^c *Pamukkale University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Türkiye*

ARTICLE INFO

Edited by: Daniel Petrovic

Keywords:

Diabetes

Pregnancy

Implantation

Matrix metalloproteases

cAMP

Calcium

ABSTRACT

The primary aim of this study was to explore the impact of diabetes on matrix metalloproteases and tissue inhibitors, crucial factors for successful implantation, and to elucidate the molecular mechanisms that undergo changes in the endometrium and the embryo during diabetic pregnancies. In this investigation, we established a streptozotocin-induced diabetic pregnant rat model. Microarray analysis followed by RT-PCR was utilized to identify gene regions exhibiting expression alterations. Subsequently, we assessed the effects of MMPs and tissue inhibitors using ELISA and immunohistochemistry techniques, in addition to analyzing changes at the genetic level. Diabetes led to the upregulation of MMP3, MMP9, and MMP20 on the 6.5th day of pregnancy, while causing the downregulation of MMP3, MMP9, and MMP11 on the 8.5th day of pregnancy. TIMP1 expression was downregulated on the 8.5th day compared to the control group. No statistically significant differences were observed between the groups regarding other TIMP expressions. KEGG pathway analysis revealed that diabetes induced alterations in the expression of genes associated with certain microRNAs, as well as signaling pathways such as cAMP, calcium, BMP, p53, MAPK, PI3K-Akt, Jak-STAT, Hippo, Wnt, and TNF. Additionally, gene ontology analysis unveiled changes in membrane structures, extracellular matrix, signalling pathways, ion binding, protein binding, cell adhesion molecule binding, and receptor-ligand activity. This study serves as a valuable guide for investigating the mechanisms responsible for complications in diabetic pregnancies. By revealing the early-stage effects of diabetes, it offers insight into the development of new diagnostic and treatment approaches, ultimately contributing to improved patient care.



Expression Levels and Clinical Values of miR-195, miR-424, miR-10b, miR-103a-3p, and miR-542-3p in Vasculo-Behçet's Disease

Serdar Kaymaz¹, Aydın Demiray², Uğur Karasu³, Veli Çobankara³, Seçil Tan¹

¹Department of Rheumatology; ²Department of Genetics; ³Department of Cancer Molecular Biology, Pamukkale University, Denizli, Turkey

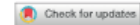
ABSTRACT

Objective: MicroRNAs (miRNAs) are involved in a range of pathological and biological processes. Vascular involvement is an important complication associated with morbidity and mortality in Behçet's disease (BD). In this study, we aimed to evaluate the expression levels of miR-195, miR-424, miR-10b, miR-103a-3p, and miR-542-3p in Turkish patients with BD, and their possible association with vascular involvement and clinical activity. **Methods:** This cross-sectional study included 61 BD patients and 25 age- and sex-matched healthy individuals. The patients were categorised into two groups based on the presence or absence of vascular involvement. Demographic data, disease duration, disease activity, and medical treatments were recorded. Disease activity was evaluated using the Behçet's Disease Current Activity Form (BDCAF) and the Behçet's Syndrome Activity Scale (BSAS). The expression levels of miRNAs were measured using real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results:** The comparison of the clinical features of BD patients with and without vascular involvement revealed no significant difference. However, the expression levels of miR-195, miR-424, miR-10b, miR-103a-3p, and miR-542-3p were significantly higher in BD patients than in healthy controls ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p = 0.010$, $p < 0.01$, $p = 0.039$, respectively). Moreover, the expression level of miR-195 was significantly higher in vasculo-Behçet patients than in the other groups ($p = 0.0318$). However, no significant association was found between the expression levels of miR-195 and clinical activity. **Conclusion:** Our study results indicated elevated serum levels of miR-195 in BD patients, which may be associated with vascular involvement. Therefore, miR-195 could potentially serve as a biomarker for the diagnosis and monitoring of vasculo-Behçet's disease.








Molter J Rheumatol 2024;35(2):255-62

<https://doi.org/10.21155/rhp.202403.048>

Article Submitted: 3 Jun 2023; Revised Form: 30 Jul 2023; Article Accepted: 5 Sep 2023; Available Online: 7 Sep 2023



***Bryonia multiflora* Extract Induces Autophagy via Regulating Long Non-coding RNAs in Breast Cancer Cells**

Onur Tokgun^{a,b} , Pervin Elvan Tokgun^a , Samet Turel^a , Behcet Inal^c , Kubilay Inci^b ,
Secil Tan^b , and Ozge Can Alvir^d 

^aMedical Genetics, Faculty of Medicine, Pamukkale University, Denizli, Turkey; ^bDepartment of Cancer Molecular Biology, Institute of Medical Sciences, Pamukkale University, Denizli, Turkey; ^cFaculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Siirt University, Siirt, Turkey; ^dMedical Biology, Faculty of Medicine, Yuzuncu Yil University, Van, Turkey

ABSTRACT

Bryonia multiflora, one of the species of *Bryonia* L. (Cucurbitaceae) genus, is a perennial, dioecious, herbaceous plant with rhizome-shaped roots. *Bryonia* species have anti-inflammatory, antimicrobial, cytotoxic, antioxidant, etc., activities and their components consume anti-tumoral effects. Purpose of the study to investigate the effect of *Bryonia Multiflora* extract (BMST) on breast cancer cells. Our results revealed that MCF-7 and MDA-MB-231 cells underwent significant morphological changes leading to cell rounding. No significant changes were observed in the cell viability by MTT. Acridine orange staining of our cells gave rise to think that BMST might lead our cells to autophagy. Therefore, possible molecular mechanisms underlying morphological changes such as autophagy (LC-3B, Beclin, AMBRA1) and apoptosis (Bcl-2) were evaluated on mRNA and protein levels. BMST treated MCF-7 and MDA-MB-231 cells had increased levels of autophagy markers whereas decreased levels of Bcl-2. p21 levels were also found to be increased in both cells. Analysis of lncRNA expressions has shown that BMST treatment led to changes in the expression levels of several lncRNAs playing roles in autophagy. The current study has shown that BMST induces autophagy in MCF-7 and MDA-MB-231 cells via regulating the lncRNAs revealing that BMST could be a promising therapeutic agent.

ARTICLE HISTORY

Received 2 October 2020
Accepted 8 April 2021