

**KISA ZİNCİRLİ SFİNGOLİPİDLERİN AKCİĞER KANSERİ
HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

Şehri TAĞIZADE

Eskişehir 2022



ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

**KISA ZİNCİRLİ SFİNGOLİPİDLERİN AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

Şehri TAĞIZADE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Gökhan KUŞ

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2022

ÖZET

KISA ZİNCİRLİ SFİNGOLİPİDLERİN AKCİĞER KANSERİ HÜCRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Şehri TAĞIZADE

Farmakoloji Anabilim Dalı
Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2022

Danışman: Doç. Dr. Gökhan KUŞ

Akciğer kanseri henüz tedavisi bulunamamış tüm dünyada ölüm nedenlerinin baş sırasında yer alan küresel bir hastalıktır. Son zamanlarda bu alanda yapılan birçok çalışmanın da temel amacı apoptozis ile ilişkili düzenleyici mekanizmaları anlamak ve anti kanser ilaçların geliştirilmesine yeni yaklaşımlar sağlamaktır. Sfingolipid grubu bir molekül olan seramidin kanser patogenezi ve tedavisinde apoptozun tetiklenmesi, hücre proliferasyonu ve migrasyonunun düzenlenmesinde etkisi büyüktür. Kilit role sahip olan seramidlerin, apoptoz yolaklarının bir çoğunda görev aldıkları ve sitoplazmadaki seviyeleri arttığında programlı hücre ölümüne yol açtığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Biz de bu çalışma ile C2 ve C6 seramidin kombine formunun Türkiye ve tüm dünyada en çok ölüm sebebi olan akciğer kanser hücreleri üzerindeki etkilerini araştırdık. Bunun için önce *in vitro* ortamda kısa zincirli sfingolipidlerin etken dozunu zamana bağlı olarak belirledik, C2 ve C6 kombine formunun belirlediğimiz IC₅₀ konsantrasyonunda A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini MTT kolorimetrik testi ile tespit ettik. Hücrelerin yapısında oluşan morfolojik değişiklikleri ikili boyama sonucunda önce konfokal mikroskopu ile, daha sonra geçirimli elektron mikroskopu ile gözlemledik. Sonuç olarak C2 ve C6 kombin seramidin A549 insan akciğer kanseri hücre hattındaki sitotoksik ve apoptotik etkileri belirlenmiş ve çalışmamızın sonucu olarak hücrelerde apoptozisi gösteren morfolojik ve ince yapısal değişiklikler saptanmıştır. Bu çalışma sonrasında hücrelerin sfingolipid ve lipid metabolizması kanser tedavisi ile ilişkilendirilerek yeni tedavi yaklaşımı seçeneği ortaya

konmuştur. Elde ettiğimiz sonuçların akciğer kanserinde C2 ve C6 kombine formunun alternatif bir tedavi çeşiti olarak kullanılmasına yönelik ileriye dönük başka çalışmalara da ışık tutacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Seramid, Akciğer Kanseri, C2, C6, Apoptoz.

ABSTRACT

EFFECTS OF SHORT CHAIN SHINGOLIPIDS ON LUNG CANCER CELLS

Shahri TAGHÍZADE

Department of Pharmacology
Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2022

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Gökhan KUŞ

Lung cancer is a primary disease for which no cure has yet been found, and is one of the leading causes of death in the world. The main purpose of many recent studies in this field is to understand the regulatory mechanisms associated with apoptosis and to provide new approaches to the development of anticancer drugs. Ceramide, a sphingolipid group molecule, has a great effect on triggering apoptosis, regulating cell proliferation and migration in the pathogenesis and treatment of cancer. Studies have shown that ceramides, which have a key role, play a role in many of the apoptosis pathways and lead to programmed cell death when their levels increase in the cytoplasm. In this study, we investigated the effects of the combined form of C2 and C6 ceramide on lung cancer cells, which are the leading cause of death in Turkey and all over the world. For this, we first determined the effective dose of short-chain sphingolipids in vitro in a time-dependent manner, and determined the cytotoxicity effects of the combined form of C2 and C6 on A549 cells at the IC50 concentration we determined by MTT colorimetric test. As a result of double staining, we observed the morphological changes in the structure of the cells first with a confocal microscope and then with a transmission electron microscope. As a result, cytotoxic and apoptotic effects of C2 and C6 combined ceramide in A549 human lung cancer cell line are determined and as a result of our study, morphological and fine structural changes in cells indicating apoptosis are determined. After this study, sphingolipid and lipid metabolism of cells were associated with cancer treatment, and a new treatment approach option was presented. We believe that our results will shed light on other prospective studies on the use of C2 and C6 combined forms as an alternative treatment type in lung cancer.

Keywords: Ceramide, Lung Cancer, C2, C6, Apoptosis.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin ve çalışmamın her aşamasında bilgisiyle bana ışık tutan, her zaman sabır ve anlayışla yardımcı olan, birlikte çalışmaktan onur duyduğum tez danışmanım, değerli Hocam Doç. Dr. Gökhan KUŞ'a,

Çok değerli mesleki bilgisi ve tecrübesiyle çalışmamda bana yol gösteren, azmini ve disiplinini kendime örnek aldığım, bana Hücre Kültürü laboratuvarını sevdiren, çok kıymetli Hocam Prof. Dr. Mehtap Hatice KUTLU'ya,

Tüm bu süreci birlikte paylaştığım yakın arkadaşlarım Gökçe ÖZCAN, Turana ORUJOVA ve Gökhan DİLSİZ'e,

Maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olduklarını hissettiren annem Nurana TAĞIYEVA'ya ve kardeşim Miri TAĞIZADE'ye,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

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

.....

Şehri TAĞIZADE

15/06/2022

STATEMENT OF COMPLIANCE WITH ETHICAL PRINCIPLES AND RULES

I hereby truthfully declare that this thesis is an original work prepared by me; that I have behaved in accordance with the scientific ethical principles and rules throughout the stages of preparation, data collection, analysis and presentation of my work; that I have cited the sources of all the data and information that could be obtained within the scope of this study, and included these sources in the references section; and that this study has been scanned for plagiarism with “scientific plagiarism detection program” used by Anadolu University, and that “it does not have any plagiarism” whatsoever. I also declare that, if a case contrary to my declaration is detected in my work at any time, I hereby express my consent to all the ethical and legal consequences that are involved.

.....

Shahri TAGHIZADE

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Onkogenlerin üç yoldan aktive edilmesi.....	4
Şekil 2.2. Hücre döngüsü basamakları.....	8
Şekil 2.3. Apoptoz yolları.....	10
Şekil 2.4. İnsan kaspaz gen ailesi.....	11
Şekil 2.5. İnsan akciğer anatomisi.....	16
Şekil 2.6. Sfingolipit metabolik yolu.....	25
Şekil 4.1. C2-C6 kombin seramidin 24 saat süre ile uygulandığı A549 hücrelerinin MTT sonucunda elde edilen canlılık inhibisyon grafiği.....	33
Şekil 4.2. C2-C6 seramid kombinininin 24 saat süre ile uygulandığı A549 hücrelerinin konfokal mikroskopi sonuçları.....	34

Şekil 4.3. C2-C6 seramid kombininin 24 saat süre ile uygulandığı A549 hücrelerinin TEMmikroskopisunuçları.....	35
---	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Pro ve anti anjiyogenik faktörler.....	5
Çizelge 2.2. Apoptoz ve nekrozun özelliklerinin karşılaştırılması.....	15

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μL :	Mikrolitre
μM :	Mikromolar
μm :	Mikronmetre
$^{\circ}\text{C}$:	Santigrad derece
Apaf-1:	Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ATCC:	American Type Culture Collection
ATP:	Adenozin trifosfat
Bax:	Bcl-2-ilişkili protein X
Bcl-2:	B-hücreli lenfoma 2
CAD:	Kaspaz aktive edici Dnaz
CO ₂ :	Karbondioksit

DED:	Ölüm efektör alanı
dk.:	Dakika
DMSO:	Dimetil sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik asit
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
EGFR:	Epidermal büyüme faktör reseptörü
FasL:	Fas hücre yüzey ölüm reseptör ligandı
FBS:	Fetal sığır serumu
GWAS:	Genom ilişkilendirme çalışmaları
IC50:	Yarı-maksimal inhibitör Konsantrasyonu 50
kDa:	Kilodalton
KHAK:	Küçük hücreli akciğer kanseri
KHDAK:	Küçük hücre dışı akciğer kanseri
mL:	Mililitre
mM:	Milimolar
MTT:	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyltetrazolium bromide
NaCl:	Sodyum klorür
nm:	Nanometre
nM:	Nanomolar
PAH:	Polisiklik aromatik hidrokarbonlar
PBS:	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PTEN:	Fosfataz ve tensin homologu
RNA:	Ribonükleik asit
ROS:	Reaktif oksijen türevleri

Rpm:	Dakikadaki devir sayısı
SCLC:	Küçük hücreli akciğer kanseri
TBS:	Tris-tamponlu tuz çözeltisi
TBST:	Tween 20 içeren tris-tamponlu tuz çözeltisi
TEM:	Geçirimli Elektron Mikroskobu
VEGF:	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Kanser, hücrelerden birinin transformasyonu sonucu hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılmasıdır. Genetik değişiklikler sonucu hücreler kontrolsüz bir şekilde büyür. Bu hücreler, tümör adı verilen bir kitle oluşturabilir([https-1](#)). Dış etkenlerin veya kalıtsal genetik faktörlerin neden olduğu dönüşüm vücudun hemen her bölgesini etkileyebilir. Normal bir hücrenin bir tümör hücresine dönüşümü, genellikle neoplazmların çevre dokulara büyümesi ve uzak organlarda metastazların ortaya çıkmasıyla birlikte çok aşamalı bir süreçtir.Globocan verilerine göre 2018'de dünya çapında yeni teşhis edilmiş kanserli 18,1 milyon insan ve 9,6 milyon ölüm vardır. İnsidans açısından (her iki cinsiyette) akciğer kanseri (%11,6) birinci, meme kanseri ikinci (%11,5), prostat kanseri (%7,1) ve kolorektal kanser dördüncü (% 6,1) yer almaktadır.Günümüzde, bu sayılar, özellikle akciğer kanserinin oranı dış etkenler ve Covid-19'un yarattığı etkilerle daha da arttı. Kanser insidansı ve mortalitesi tüm dünyada artmaya devam ediyor. Önümüzdeki 20 yıl içinde kanser prevalansının en az %60 oranında artacağı tahmin edilmektedir ([https-2](#)).

Vakaların önemli bir kısmı özellikle erken teşhis edildiğinde cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi gibi yöntemlerle tedavi edilebilmektedir.Akciğer kanseri en agresif kanser türlerinden biridir ve kısa öykü, hızlı seyir ve erken metastaz eğilimi ile karakterizedir.Lipidomik alanın gelişmesi, akciğer kanseri de dahil olmak üzere birçok hastalıkta, hücre sinyalleşmesinde ana düzenleyiciler olarak sfingolipidlerin rolünü ortaya çıkarmıştır. Sfingolipid metabolizmi hücre proliferasyonu, çeşitli hücre ölümü biçimleri, hücre farklılaşması, anjiyogenez ve hücre göçü gibi kanser ilerlemelerinde yüksek öneme sahip biyolojileri içerir (Hannun vd., 2018).

Seramid sinyalleşme yolağı farklı tümör hücrelerinde ana apoptozis tetikleme faktörü olarak bilinmektedir. Son yıllarda ekzojen seramid seviyelerine etki eden elementlerin ve bunların operatörleri ve metabolizmasını etkileyen faktörleri birçok çalışmada yer almıştır. Bu sebeple, seramid ve sfingozin metabolizmasında görev yapan enzim sistemlerini hücre sağkalımı veya ölümündeki rollerini ve bunların efektörlerinin etki mekanizmalarını ele almak faydalı olacaktır (Ogretmen, 2017). Seramid tarafından indüklenmiş apoptoz ilk kez 1993 yılında ekzojen seramidlerle muameleden sonra lösemi hücrelerinde gösterilmiştir (Reynolds vd., 2003). O zamandan sonra, sayısızca çalışma endojen olarak üretilmiş seramidin apoptozun gerçek bir tetikleyicisi olduğunu göstermiştir. Bu apoptozun hücre tipine bağlı ve/veya kontekse bağlı anlamda farklı

mekanizmalar tarafından regüle edildiği bilinmektedir (Kolesnick, 2002; Strelow vd., 2002; Rombaut vd., 2006; Schmelz vd., 1994).

Bu tez çalışması ile seramid C₂ ve C₆ kombine formlarının optimum doz ve süreleri bulunarak akciğer kanser hücrelerindeki etkileri moleküler olarak araştırılmıştır. Hücrelerin seramid kaynaklı akciğer kanseri üzerindeki ince yapısal, organel ve çekirdek yapısındaki değişiklikleri hücre kültürü laboratuvarında çalışılıp, ölüm yolları hakkında ilk verilere ulaşılmış ve orijinal bir çalışma yapılarak sonuçlar elde edilmiştir. Öncelikle seramid C₂ ve C₆'nın A549 akciğer kanseri hücrelerindeki etkin dozu bulunmuş, daha sonra kombine formun hücreler üzerindeki sitotoksite etkileri MTT kolorimetrik testi ile belirlenmiş, sonda A549 hücrelerindeki morfolojik değişiklikler konfokal ve geçirimli elektron mikroskopi ile gözlemlenmiştir. Amacımız doğrultusunda seramid kombine formunun etkisiyle akciğer kanser hücrelerinde apoptozisi gösteren morfolojik ve ince yapısal değişiklikler saptanmış, apoptotik etkiler belirlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

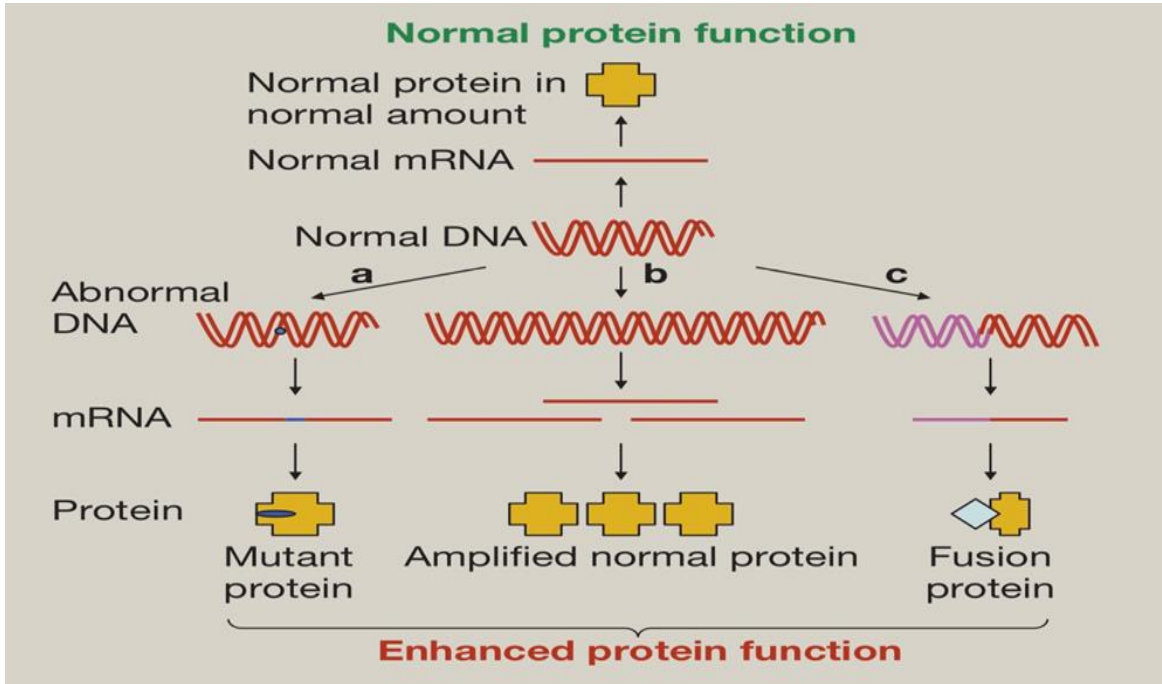
Vücutta anormal şekilde oluşan bir kitle veya hücre grubu tümör veya neoplazm diye adlandırılır. Tümörler vücudun çeşitli bölgelerinde oluşabilir. Yanlış bilinenin aksine, her tümörü kanser adlandıramayız. Kansersiz olmayan tümörler tedavi edilmezse o zaman kanserli hale gelir. Kanser hücreler 4 ana tip olarak ayrılır: karsinomlar, sarkomlar, lösemiler, lenfomalar.

Kanser hücreleri kendi kendine küçülüp kaybolmadığı sürece büyümeye devam eder. Bu süreçte yapılması gerekenler; (1) kanserli kitle cerrahi olarak çıkarılması; (2) kemoterapi veya hormon tedavisi gibi kansere özgü başka bir ilaç türü kullanılması; (3) radyasyon tedavisine başlanmasıdır. Bazı kanser türleri tümör oluşturmaz. Bunlara lösemiler, çoğu lenfoma türü ve miyelom dahildir.

Tüm kanser tanılarının yaklaşık %50'sinden dört kanser türü sorumludur. Meme kanseri, tüm kanser tanılarının %13,1'ini oluşturan en sık teşhis edilen kanserdir (530.000 vaka; yalnızca kadın), bunu kolorektal (520.000, %12.9), akciğer (480.000, %11.8) ve prostat (470.000, %11.7) kanserleri izlemektedir. Cinsiyete göre ayırım yapıldığında erkeklerde en sık görülen kanserler prostat (toplam erkeklerin %22.2'si), akciğer (320.000, %14.8), kolorektum (280.000, %13.2), kadınlarda ise meme kanseridir (toplam kadınların %27.8'i) (Dyba vd., 2021). Sağlıksız beslenme, obezite ve yetersiz fiziksel aktivitenin etkileri birlikte değerlendirildiğinde, sağlıksız yaşam tarzı ile ilişkili kanserlerin oranı %60'a çıkmaktadır (<https-1>).

Kanserin biyolojisi: Genel olarak kanserle ilişkili genler iki gruba ayrılabilir: onkogenler ve tümör baskılayıcı genler (TSG'ler). DNA nükleotid dizisini etkilemeyen epigenomik yapısal değişiklikler (örneğin, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları) aynı zamanda baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna ve protoonkogenlerin aktivasyonuna da katkıda bulunan tümör hastalığına yol açabilir (Alberts vd., 2002; Weinhold vd., 2006). Onkogenler aktivasyona uğrar ve fenotipik olarak baskındır, TSG'ler ise inaktivasyona uğrar ve fenotipik olarak çekiniktir. Onkogenik aktivasyon şu şekilde meydana gelebilir: gen sekansı içindeki belirli nokta mutasyonları; genin kopya sayısının amplifikasyonu; ya da DNA'nın transkripsiyonun daha aktif olduğu ya da biyolojik etkinliği artırılmış bir proteini kodlayan yeni bir füzyon geninin olduğu bölgelere translokasyonu (Nenclares ve Harrington, 2020).

Kanser genleri:Kanser, her biri normal hücrelerde önemli bir işlev sağlayan iki sınıf gen, onkogenler ve tümör baskılayıcı genler (TSG'ler) tarafından yönlendirilir. Çok aşamalı karsinogenez kavramına dayanarak, hastalığın ilerlemesi ve tümör hücrelerinin metastatik aktivitesi, hastalığın son aşamasında değişiklikleri biriktiren ve tümörün malignite derecesi ile ilişkili olan genler tarafından belirlenir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Onkogenler, kansere neden olmak için üç şekilde aktive edilir: (1) gen mutasyonları, bir genin dizisini, ona gelişmiş biyolojik fonksiyon kazandırmak için değiştirir (örneğin, pankreas, akciğer ve kolorektal kanserlerde RAS); (2) gen amplifikasyonu, bir genin normal dizilimini koruduğu, ancak kromozomda çoğaldığında (örneğin, nöroblastomda N-MYC (MYCN olarak da bilinir)); (3) gen translokasyonu, bir genetik dizinin normal kromozomal pozisyonundan (lokusu) yeni, daha aktif bir promotör element tarafından kontrol edildiği yeni bir pozisyona (genellikle farklı bir kromozom üzerinde) hareketini içerir veya geliştirilmiş biyolojik aktiviteye sahip yeni bir füzyon proteini üretir (örneğin, kronik miyeloid lösemide BCR-ABL)Şekil2.1'de onkogenlerin üç yoldan aktive edilmesi detaylıca gösterilmiştir.



Şekil 2.1.Aktive edilmiş onkogenler.(A) DNA kodundaki mutasyonlar, proteinlerin amino asit dizisinde değişikliklere yol açarak aktivitesini artırır.(B) Amplifikasyon, normal protein miktarının artmasıyla sonuçlanır.(C) DNA'nın bir kısmının bir kromozal konumdan diğerine geçişi, biyolojik aktiviteye sahip o füzyon proteini üretebilir (Nenclares ve Harrington.2020).

TSG'ler, hücre çoğalmasını ve hayatta kalmasını engelleme işlevi gören normal hücresel genlerdir. Genellikle hücre döngüsü ilerlemesini ve programlanmış hücre ölümü/apoptozunu kontrol etmede rol oynarlar (Nenclares ve Harrington, 2020).

Sürekli anjiyogenez:Kanserin ilerleme yeteneği, kan akışını sağlama yeteneği ile yakından ilişkilidir. Doğrudan difüzyonla oksijen ve besin elde ederek kanser hücresi kümeleri 60-100 mikrometreye kadar büyüyebilir, ancak bu boyutu aşmak için bir tümörün özel bir kan kaynağı edinmesi gerekir.Boyut olarak birkaç milimetrenin üzerinde büyümek için, yeni başlayan tümörlerin, genişleyen tümör hücrelerine oksijen ve besin iletimini sağlamak için kendi damarlarını oluşturmaları gerekir (Bergers ve Benjamin, 2003). Bununla birlikte, proanjyogenik faktörlerin aşırı üretimi nedeniyle, tümörler genellikle oldukça kaotik, kötü organize olmuş ve işlevsiz bir damar sistemini indükler (Oliveira vd., 2011).Çizelge 2.1’de pro ve anti-anjiyogenik faktörlerin özellikleri gösterilmiştir.

Çizelge 2. 1. Pro ve anti anjiyogenik faktörler (Nenclares ve Harrington, 2020)

Pro-anjiyogenik	Anti-anjiyogenik
• Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF)	• anjiyostatin
• Temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF)	• endostatin
• Asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF)	• Trombospondin (TSP)-1 ve 2
• Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- α ve β	• İnterlökinler (IL-1 β , IL-12, IL-18)
• Trombosit kaynaklı büyüme faktörü(PDGF)	• Anti-trombin III
• Tümör nekroz faktörü (TNF)- α	

Gen ekspresyonu ve hücre tükenmesi çalışmaları tümörle ilişkili makrofajların (TAM'ler) fenotipik ve işlevsel olarak farklı alt kümeler içerdiğini gösterir. Daha iyi karakterize edilen TAM alt kümeleri arasında, tümörlerde bir arada bulunan proanjyogenik (TIE2+) ve anjiyostatik/enflamatuar (CD11c+) makrofajlar bulunur. Bu tür antagonize edici TAM alt kümeleri, tümör mikroçevresinde farklı nişler işgal eder ve tümör tipine ve derecesine göre değişen oranlarda bulunur. TAM'leri spesifik olarak hedeflemek veya onları proanjyogenikten anjiyostatik bir işleve yeniden programlamak,

tümör damar sistemini "normalleştirebilir" ve radyoterapi, kemoterapi ve damar bozucu ajanlar dahil çeşitli antikanser tedavilerinin etkinliğini artırabilir (Squadro vd., 2011).

Kanserin ayırt edici özellikleri ve kolaylaştırıcı özellikleri:2000 yılında, Hanahan ve Weinberg kanserlerde, malign davranışlarını büyük ölçüde açıklayan altı temel değişikliği (büyüme faktörü bağımsızlığı, büyüme baskılayıcılardan kaçınma, hücre ölümünü önleme, anjiyogenez, replikatif potansiyeli sürdürme, istila/metastaz) tanımladılar. (Hanahan ve Weinberg, 2000) Bu, daha sonra 2011'de ortaya çıkan iki ayırt edici özelliğin (enerji metabolizmasının yeniden programlanması, bağışıklık yıkımından kaçınma) ve iki etkinleştirici özelliğin (genomik kararsızlık, iltihaplanma) eklenmesiyle güncellendi. (Hanahan ve Weinberg, 2010).

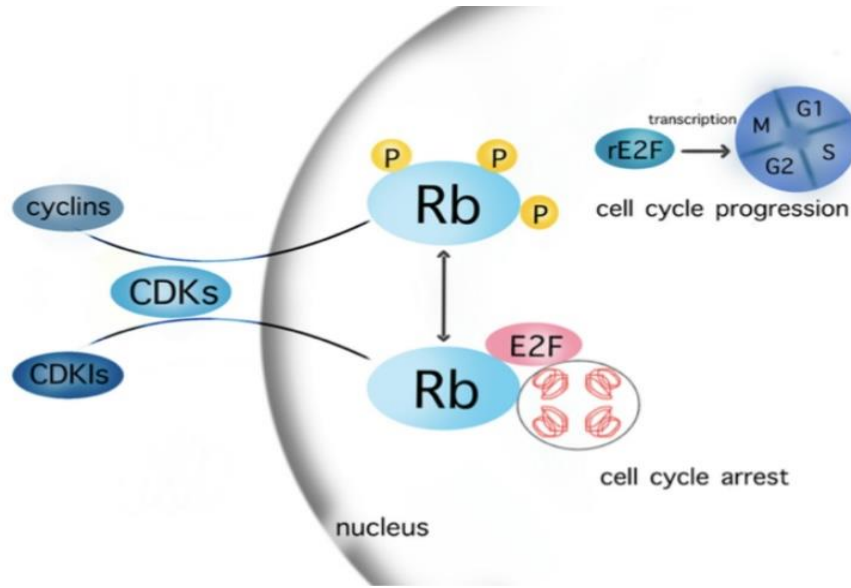
İstila ve metastaz: Uzak metastazlar kanser ölümlerinin %90'ına neden olur. İstila ve metastaz, karmaşık biyolojik süreçlerin sıralı orkestrasyonunu içerir:tümör hücrelerinin yerel bölgedeki yakın komşularından ve stromadan ayrılması; hücre dışı matrisin enzimatik bozunması ve ardından spesifik yönlü hareketlilik (tek hücreler, gruplar); kan veya lenf damarlarının penetrasyonu ve tümör embolizasyonu; uygun büyüme faktörlerinin uygun bir şekilde sağlanması temelinde seçilebilecek bir metastatik bölgeye ulaşana kadar dolaşımında hayatta kalma; varış noktasında kan damarı endoteline bağlanma ve damardan ekstravazasyon; ve yeni yerinin yayılması ve istilası ve yeni bir kan kaynağının sağlanmasıdır. Epitelyal tümörlerin invazyonu ve metastazının altında yatan anahtar süreçlerden biri epitelyalden mezenkimal geçiştir. Bu çok yönlü program, kanser hücrelerini istila ederek geçici veya istikrarlı bir şekilde devreyegirebilir. Ek olarak, tümör metastatik bir birikim oluşturacağı son organa ulaştığında, sıklıkla mezenkimalden epitelyal geçiş meydana gelir (Talmadge ve Fidler, 2010).

2.2 Hücre Döngüsü

Hücre döngüsü ve apoptoz, düzenli koşullar altında organizmanın büyümesine ve homeostazına izin veren hücre biyolojisinin önemli süreçleridir. Bu mekanizmalardaki değişiklikler, azalmış apoptoz ve aşırı proliferasyon durumunda tümör oluşumu ve gelişimi gibi patolojik durumlara neden olabilir. Devam eden hücre döngüsü, durgunluk, yaşlanma, apoptoz veya nekroz gibi birkaç farklı hücre döngüsü ve metabolik durum arasında ayırım yapabiliriz (Pack vd., 2019) Devam eden bölünme altındaki hücreler, bilinen hücre döngüsü fazlarından, yani G1 boşluk fazından, S

fazından (DNA sentezi), G2 boşluk fazından ve M fazından (mitoz) geçer. G1, S ve S2 fazlarına alternatif olarak interfaz denir. Son safhada, hücre organel sayımlarını (G1 fazı) büyütür, DNA'sını kopyalar (S fazı) ve bölünmeye hazırlanırken içeriğini yeniden düzenler (G2 fazı).G0 veya dinlenme fazındaki hücreler, geri dönüşümlü büyüme durması ve düşük metabolizma ile karakterize uyusuk bir durumu temsil eden sessizlikte kalır (Pack vd., 2019). Sessizlik durumuna giriş, direncin stres ve toksik uyarıların üstesinden gelmesine izin verir. Hücresel hasarı tolere ettikten ve onardıktan sonra, hücreler, sikline bağımlı kinaz-2 (CDK2) ve E2F (Yao vd., 2017; Kwon vd.,2017; Hahn vd., 2009; Cappel vd., 2016; Spencer vd., 2013; Dong vd., 2018; Sakaue-Sawano vd., 2008) gibi spesifik büyüme faktörleri tarafından uyarıldıktan sonra yeni bir hücre döngüsüne yeniden girebilirler. Sessizliğin aksine, yaşlanma, yüksek hücre metabolizma ile kalıcı bir hücre döngüsü durması durumudur. Hem durgunluk hem de yaşlanma, iyonlaştırıcı radyasyon, DNA ve kromatin hasarı, endojenik replikasyon stresi, reaktif oksijen türlerinden (ROS) kaynaklanan hücre stres, serum açlığı, temas inhibisyonu vb. gibi dış ve iç sinyaller tarafından tetiklenirken, kalıcı hasar ve stres sinyal verme genellikle yaşlanmayı destekler (Daigh ve ark.,2018; Arors ve ark.,2017; Barr vd.,2017; Yang vd.,2017).Apoptoz terimi, hücre mimarisinin bozulmasına yol açan enerjiye bağlı programlanmış hücre ölümü sürecini tanımlamak için kullanılır ve hücre ölümünden sonra toksik eliminasyon süreçlerini ifade eden enerjiden bağımsız nekroz ile karıştırılmamalıdır (Elmore,2007; Fan vd.,2018). Apoptoz, ciddi şekilde hasar görmüş ve işlevsiz hücrelerin dokulardan gerekli şekilde uzaklaştırılmasını sağlayan fizyolojik bir mekanizmadır. Atılan hücreler, kalan hücrelerin (bir bölümünün) mitotik aktivitesi ile değiştirilir - yani dokuların apoptozu ve G0'da olmayan hücre sayısını dengelemesi gerekir.Hücre döngüsünün süreçleri, iki düzenleyici protein grubu, yani siklinler ve sikline bağımlı kinazlar (CDK'ler) tarafından kontrol edilir. Bu proteinler, p107, p130 ve retinoblastoma (Rb) dahil olmak üzere cep protein ailesinin belirli üyelerinin fosforilasyonunu hedefleyerek bağlanmalarından sonra sinerjistik olarak hareket eder.S fazına girişeve DNA replikasyon sinyallerini kodlayan E2F hedef genlerinin transkripsiyonuna izin veren Rb gibi fosforlanmış cep proteinleri kromatinden salgılanıyor(Pack vd.,2019; Fan vd.,2018). Prensip, CDK'ler ve siklinler, CDK'lere bağlanmak için rekabet eder; CDK2-siklin E gibi bir kompleks hücre döngüsü ilerlemesini yönlendirir; tersine,

CDK4/6-p16 kompleksi hücre döngüsü durmasını indükler. Hücre döngüsünün ilgili basamakları Şekil 2.2'de gösterilmektedir. (Gousias vd.,2022)



Şekil 2.2.Hücre döngüsü basamakları. Hücreler, çeşitli siklinler-CDK kompleksleri ve Rb arasındaki etkileşim bağlamında Rb'nin fosforilasyonu ile desteklenen, çekirdekte salınan E2F'nin transkripsiyonundan sonra hücre döngüsüne girerler. Aksine kompleks CDKI'ler-CDK'ler, Rb'nin fosforilasyonunu inhibe eder.Sonuç olarak, Rb ve E2F kromatinden salınmaz, ancak yine de hücre döngüsüdürmasına yol açan sağlam bir komplekse bağlanır. Kısaltmalar: CDK'ler: sikline bağımlı kinazlar; CDKI'ler: sikline bağımlı kinazlar inhibitörü; Rb: retinoblastom, rE2F: serbest bırakılan E2F. En bilinen siklinler: siklin A, B1, B2, D1, D2, D3, E1, E2, G1; CDK'ler: CDK1, 2, 4, 6, 9; CDKI'ler: p16, p21, p27, p57 (Gousias vd.,2022).

2.3 Apoptoz

Programlanmış hücre ölümünün en iyi çalışılmış biçimleri apoptoz, nekroptoz ve piroptozdur(Damien vd.,2021).Apoptoz mekanizması karmaşıktır ve birçok yolu içerir. Bu yollar boyunca herhangi bir noktada kusurlar meydana gelebilir, bu da etkilenen hücrelerin malign transformasyonuna, tümör metastazına ve antikanser ilaçlara karşı dirence yol açar. Apoptoz, problemin nedeni olmasına rağmen, birçok tedavi stratejisinin popüler bir hedefi olduğu için kanser tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Apoptoz, fizyolojik ve patolojik koşullarda meydana gelen düzenli ve düzenlenmiş bir hücresel süreçtir. Aynı zamanda hücre biyologları arasında en çok

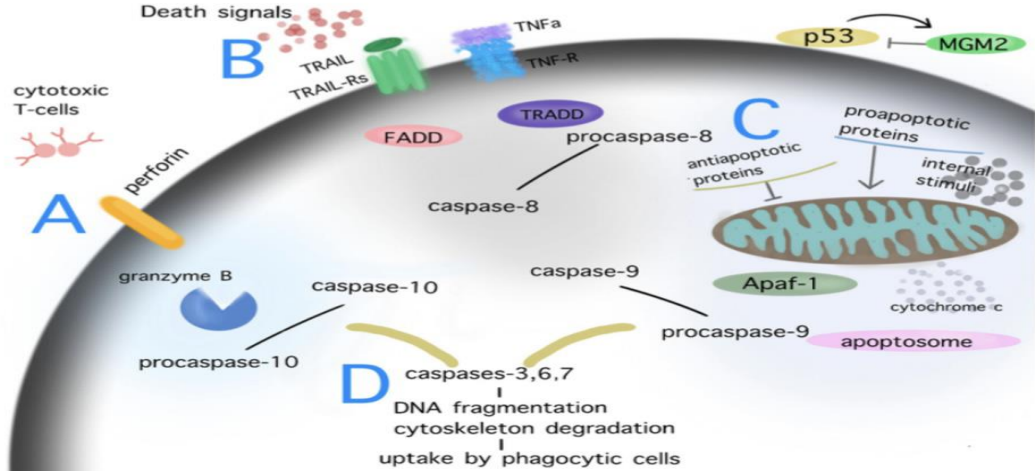
çalışılan konulardan biridir. Apoptozun altında yatan mekanizmanın anlaşılması, birçok hastalığın patogenezinde çok önemli bir rol oynadığı için önemlidir (Wong, 2011).

Apoptozun normal fizyolojideki rolü mitozunkı kadar önemlidir. Çeşitli hücre popülasyonlarının düzenlenmesinde mitoz ve hücre çoğalması için tamamlayıcı ama zıt bir rol gösterilir. Yetişkin insan vücudunda homeostazı korumak ve apoptoz yoluyla ölenleri dengelemek için her gün yaklaşık 10 milyar hücre yapıldığı tahmin edilmektedir. (Renehan vd., 2001) Normal gelişim, yaşlanma veya hastalık sırasında artan apoptoz olduğunda bu sayı önemli ölçüde artabilir. Apoptoz, çeşitli gelişim süreçleri sırasında kritik derecede önemlidir. Apoptoz, embriyogenez sırasında ve hatta sürekli hücre döngüsü ve doku rejenerasyonunun özellikle gerekli olduğu doğumdan sonra doku oluşumunun vazgeçilmez fizyolojik mekanizmasıdır. Gerçekten de, RIPK1 ve kaspaz-8'e bağlı olan temel düzenleyici mekanizmalar, gelişim sırasında embriyonik hücrelerin kaderini düzenler (Kaiser vd., 2014; Dillon vd., 2014; Newton vd., 2016) Apoptoz ayrıca enfeksiyonlarla savaşmak ve onarılamaz DNA hasarı olan hücreleri uzaklaştırmak için bağışıklık sisteminin gerekli bir aracıdır. (Muizo vd., 1996; Talanian vd., 1997). Programlanmış hücre ölümü veya apoptoz yoluyla kanser hücrelerinin etkin bir şekilde ortadan kaldırılması, 30 yılı aşkın bir süredir klinik kanser tedavisinin temel dayanağı ve hedefi olmuştur.

Biyokimyasal Özellikler: Ağır hasarlı hücreler kendi ölümlerini indükleyebilir. Apoptotik hücre kayıpları, kalan hücrelerin mitotik aktivitesi ile dengelenir. Apoptoz sırasındaki morfolojik değişiklikler, ilk hücre küçülmesini, ardından sitoplazma ve organellerin piknozu, kromatinin yoğunlaşması ve hasarlı hücrenin fagositik hücreler tarafından son alımına kadar DNA'nın bozulmasını içerir (Elmore, 2007). Apoptozun basamakları ya içsel ya da dışsal sinyaller tarafından tetiklenir; dış sinyaller, ekstrinsik veya ölüm reseptör yolunu indüklemek için TNF ve FAS'ın hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşime girebilirken, besin kaybı, endojen stres, sıcak veya soğuk şok veya telomer kısalması gibi içsel sinyaller, içsel veya mitokondriyal yolu tetikleyebilir. Tüm farklı başlangıç yolları, nihai bir yürütme yoluna birleşir. Apoptozun hem başlangıç hem de yürütücü fazlarının süreçleri, kaspazlar adı verilen ve başlatıcılar (kaspazlar 1, 2, 8, 9, 10) ve efektörler (kaspazlar 3, 6, 7) olarak kategorize edilen bir grup sistein proteaz tarafından düzenlenir.

Kaspazlar proteolitik olarak hareket eder ve proteinleri aspartik asit kalıntılarında parçalar. İlk intrinsik mitokondriyal yol sırasında apoptozun başka bir

regülasyonu, Bcl-2 protein ailesinin üyeleri tarafından gerçekleştirilir (Adams ve Cory.,2018). İkinci aile hem antihem de proapoptotik proteinlerini içerir. Şekil 2.3 apoptozun yollarını, yani içsel, dışsal ve perforin/granzim yolunu gösterir (Gousiasvd., 2022).



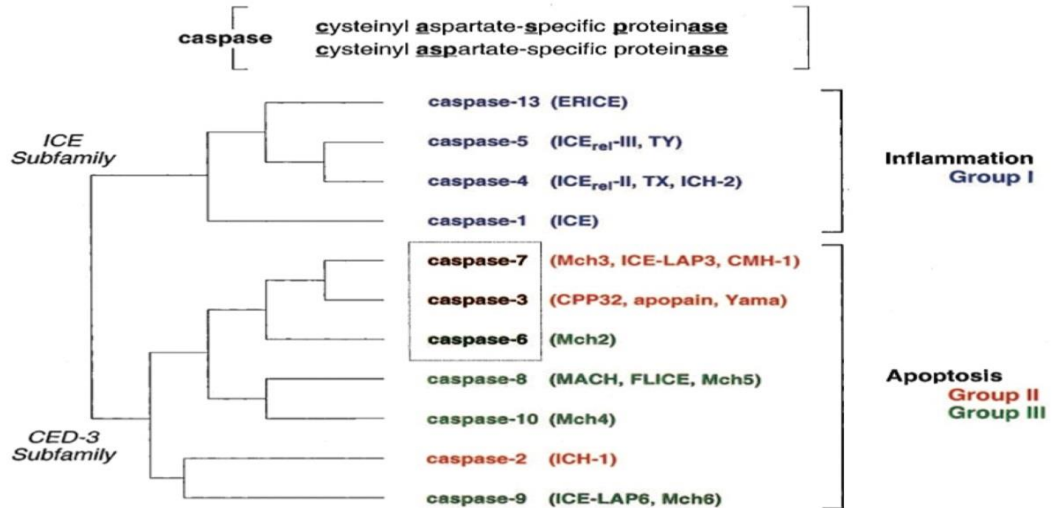
Şekil 2.3. Apoptoz yolları. Apoptoz basamaklarının tasviri. DNA hasarı, hücresel stres, telomer kısalması, iyonlaştırıcı radyasyon, mitokondriyal işlev bozukluğu, ısı, hipoksi gibi kalıcı hasar sinyaline neden olan çeşitli iç ve dış uyaranlar, perforin/granzim (A), dışsal (B) aracılığıyla veya içsel/mitokondriyal (C) yol apoptoz sürecini tetikleyebilir. Yukarıda bahsedilen süreçler, apoptozun yönetici yolu (D) olarak adlandırılan apoptozun son adımını aktive eder. Bu prosedürler sırasında, başlatıcılar (kaspaz 8, 9, 10) ve efektör kaspazları (kaspaz 3, 6, 7) apoptotik hücrenin fagositozuna kadar kritik hücre yapılarının bozulmasında kilit oyuncular. Fizyolojik koşullar altında, p53 aktivitesi MGM2 tarafından kontrol edilir; ciddi kalıcı hasar durumunda, p53 sinyali yukarı doğru düzenlenir ve apoptozun dışsal ve içsel yolunu tetikler. Kısaltmalar: FADD: Fas ile ilişkili protein ve ölüm alanı; TRADD: tümör nekroz faktörü reseptörü tip1 ile ilişkili ölüm alanı proteini; MGM2: fare çift dakika 2; Apaf-1: apoptotik proteaz aktive edici faktör 1; TNFα: tümör nekroz faktörü alfa; TNF-R: tümör nekroz faktörü alfa reseptörü. Dışsal yolun yaygın ligand bağlanmaları, TNFα/TNF-R'ler, ApoL'ler/DR'ler, TRAIL/TRAIL-R'ler, FasL-Fas-R'dir. Bilinen proapoptotik proteinler: Bcl-10, Bax, Bak, Bad; antiapoptotik proteinler: Bcl-2, Bcl-x, BAG.(Gousias, vd., 2022)

Kaspaz, hücre düzenleyici ağlarda programlanmış hücre ölümü ve iltihaplanmaya aracılık eden birendoproteazdır (McIlwainvd.,2013). Kaspazlar,hücrelerde aktif olmayan zimojenler olaraküretilir,daha sonra çeşitli hücre aktivitelerini gerçekleştirmek için çeşitli sinyal olayları tarafından aktive edilir (Kusmardivd.,2021). Kaspazlar bir kez aktive edildiklerinde sıklıkla diğer pro-kaspazları aktive ederek bir proteaz kaskadının başlatılmasına izin verir. Bazı pro-kaspazlar ayrıca toplanarak etkinleştirilebilir. Bir kaspazın diğer kaspazları aktive

edebildiği bu proteolitik kaskad, apoptotik sinyal yolunu güçlendirir ve böylece hızlı hücre ölümüne yol açar.

Apoptozdaki geleneksel rollerinin yanı sıra, kaspazların daha yakın zamanlarda daha geniş bir biyolojik süreç yelpazesinin önemli araçları olduğu gösterilmiştir. Bunların en iyi çalışılanı hücrel farklılaşma olmuştur. Kaspazların, nöral ve gliyal hücrelerin, iskelet miyoblastlarının ve osteoblastların yanı sıra eritrositler de dahil olmak üzere hematopoietik sistemin çeşitli hücre tiplerinin farklılaşması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Crawford ve Wells, 2011; Connolly vd., 2014). İnsanlarda keşf edilen 14 kaspaz yapılarına göre üç tipe ayrılır: inflamatur kaspazlar (kaspaz -1, -4, -5, -11, -12, -13 ve -14), başlatıcı kaspazlar (kaspaz -2, -8, -9 ve -10) ve efektör kaspazlar (-3, -6 ve -7) (Lu vd., 2011).

Kapsamlı protein çapraz bağlanması, apoptotik hücrelerin bir başka özelliğidir ve doku transglutaminazının ekspresyonu ve aktivasyonu yoluyla elde edilir (Nemes vd., 1996). Ca^{2+} - ve Mg^{2+} - bağımlı endonükleazlar tarafından DNA parçalanması da meydana gelir, bu da 180 ila 200 baz çifti DNA fragmanları ile sonuçlanır. (Bortner vd., 1995). Karakteristik bir "DNA merdiveni", etidyum bromür lekesi ve ultraviyole aydınlatma ile agaroz jel elektroforezi ile görselleştirilebilir (Bratton vd., 1997). Şekil 2.4'de insan kaspaz gen ailesi skematik bir şekilde gösterilmiştir.



Şekil 2.4. İnsan kaspaz gen ailesi. Kaspazlar iki ana filogenik alt aileye ayrılır (ICE, CED-3). Kaspazlar ayrıca üç gruba ayrılır: grup I enzimler (mavi) sitokin olgunlaşmasına aracılık ederken, apoptotik kaspazlar hücre ölümünün grup II (kırmızı) efektörleri veya grup III (yeşil) yukarı akış aktivatörleridir. Çoğu kaspaz, kısa peptidik ön alanlara sahip olan kaspazlar-3, -6 ve -7 (kutu) dışında uzun önalanlara sahiptir. Kaspaz-13 dışında, tüm kaspazların insan kromozomal konumu belirlenmiştir. Tandem gen duplikasyonundan kaynaklanan bazı kaspazlarla tutarlı olarak en az iki gen kümesi tanımlanmıştır. **Şekil**

2.4. (Devam ediyor) Bunlar, 11q22.2-q22.3 üzerindeki kaspaz-1, -4, -5 gen kümesini ve 2q33-q34 üzerindeki kaspaz-8, -10, cFLIP/Usurpin gen kümesini içerir. (71,72) -5, -8 ve -10 kaspazlarına homologtur, ancak substrat bağlama ve katalitik belirleyicilerin olmaması, onu baskın bir negatif ölüm baskılayıcı yapar) Sıçangil kaspazları-11, -12 ve -14'ün insandaki karşılıkları henüz tanımlanmamıştır (ancak sıçangil kaspaz-12, insan kaspaz-5'e eşdeğer olabilir).

Apoptozu başlatan dışsal sinyal yolları, tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör gen süper ailesinin üyeleri olan ölüm reseptörlerini içeren transmembran reseptör aracılı etkileşimleri içerir. (Locksley vd., 2001). TNF reseptör ailesinin üyeleri, "ölüm alanı" olarak adlandırılan yaklaşık 80 amino asitlik bir sitoplazmik alana sahip siteinden zengin benzer hücre dışı alanları paylaşır (Ashkenazi ve Dixit, 1998). TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanması, FADD ve RIP alımı ile adaptör protein TRADD'nin bağlanması ile sonuçlanır. (Hsu vd., 1995; Grimm vd., 1996; Wajant, 2002). FADD daha sonra ölüm efektör alanının dimerizasyonu yoluyla prokaspaz-8 ile birleşir. Bu noktada, prokaspaz-8'in otokatalitik aktivasyonu ile sonuçlanan bir ölümü indükleyen sinyal kompleksi (DISC) oluşur. (Kischkel vd., 1995). Ölüm reseptörlerinin aşağı akışında apoptozu indükleyen işlevi ve nekrotik hücre ölümünün bir inhibitörü olarak bilinen kaspaz-8 etkinleştirildiğinde, apoptozun yürütme aşaması tetiklenir (Hitoshi vd., 1998).

Apoptozu başlatan içsel sinyal yolları uyarıcılar, pozitif veya negatif bir şekilde hareket edebilen hücre içi sinyaller üretir. (Saelens vd., 2004). Mitokondriden sitokrom c'nin salınımı, BAX (BCL-2 ile ilişkili X proteini), BAK (BCL-2 antagonist öldürücü 1) gibi proapoptotik BCL-2 ailesi üyeleri tarafından pozitif olarak ve BIM, BID, PUMA ve BCL-2, BCL-XL, Bcl-w, A1 ve MCL gibi anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyeleri tarafından negatif olarak düzenlenir (Yang vd., 1997; Kharbanda vd., 1997; Nijhawan vd., 2003). Negatif sinyaller, ölüm programlarının baskılanmasının başarısız olmasına ve dolayısıyla apoptozu tetikleyebilecek belirli büyüme faktörlerinin, hormonların ve sitokinlerin yokluğunu içerir. Bir çok iç ve dış faktörler iç mitokondriyal zar da değişikliklere neden olabilir (Saelens vd., 2004). Kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 çeşitli substratları parçalayarak efektör veya "infazcı" kaspazlar olarak işlev görür ve sonuçta apoptotik hücrelerde değişikliklere neden olur (Slee vd., 2001).

Dışsal ve içsel yolların her ikisi kaspaz aktivasyonu ile başlayan son yol olarak bilinen yürütme aşamasında sona erer.

P53 geni:Kanser, hücre döngüsü düzenlemesinin,ölmesinin veya çoğalmasının normal mekanizmalarının bozulmasıyla ortaya çıkan bir durumdur (King ve Cidlowski, 1998). Özellikle,bazı kanserlerin gelişimi ve ilerlemesinde karsinogenez sırasında apoptozun baskılanmasının merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir (Kerr vd., 1994). Tümör hücrelerinin apoptozu baskılamak için kullandığı çeşitli moleküler mekanizmalar vardır.Tümör hücresi olan Bcl-2veya Bax gibi proapoptotik proteinlerin aşağı regülasyonu veya mutasyonu ile apoptoza direnç kazanabilir. Hem Bcl-2 hem de Bax'ın ekspresyonu, p₅₃ tümör baskılayıcı gen tarafından düzenlenir. (Miyashita, 1994).

P₅₃ proteini, DNA hasarı, hipoksi ve onkojen aktivasyonu gibi anormal proliferatif sinyaller dahil olmak üzere çeşitli stres sinyallerine hücresel tepkileri ortaya çıkarmada merkezi bir rol oynar. Hücresel stresleri takiben, p₅₃ stabilize edilir ve DNA onarımı, hücre döngüsü durması, yaşlanma ve apoptoz gibi önemli hücresel süreçlere aracılık eden genlerin transkripsiyonel düzenlenmesiyle sonuçlanan diziye özgü bir şekilde DNA'ya bir tetramer olarak bağlanır (Levine, 1997; Riley vd., 2008). Bu çoklu görev, tümör oluşumunun baskılanması ve ayrıca kanser tedavisine neden olan birçok standart DNA hasarına hücresel tepkilere aracılık etmek için önemlidir. İnsanlarda, bu genin tümör baskılanmasındaki önemi, insan kanser hücrelerinde bulunan bol, inaktive edici, somatik mutasyonlarla vurgulanır (Petitjean vd., 2007; Soussi vd., 2007).

P₅₃, DNA hasar gördüğünde DNA onarım proteinlerini aktive edebilir, hücre döngüsünü DNA hasar tanıma üzerindeki G1/S düzenleme noktasında tutabilir ve DNA hasarının onarılamaz olduğu kanıtlanırsa apoptozu başlatabilir (Pientenpol ve Stewart, 2002).Bu sistem ters giderse tümör oluşumu meydana gelebilir. Son zamanlarda, P₅₃ yolunun mitokondriyal fonksiyonların modülasyonunda ve glikolizde olduğu kadar amino asit, nükleotid, lipid ve demir metabolizmasında da önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Lahalle vd., 2021; Yu vd., 2021). Ana rolü -yani hücre döngüsünün düzenlenmesi- ile ilgili olarak p₅₃, siklinler veya CDK'ler gibi hücre döngüsü ilerlemesi düzenleyicilerini tüketebilir ve indükleyebilir. p21Waf/Cip1 (veya o21/CDKN1A) gibi baskılayıcı komplekslerin oluşumu, G1/M veya G2/M durmasıyla sonuçlanır (Engeland,2018; Wong vd.,2021). Geri dönüşü olmayan hasar veya stres sinyalleri üzerine, p₅₃, daha sonra apoptozu indükleyen Bcl-2 protein ailesinin (BAX/BAK) BH3 üyelerini aktive eder. Fizyolojik koşullar altında, p₅₃ seviyeleri ve aktivitesi, fare çift dakika 2 (MDM2) olarak adlandırılan bir E3 protein ligazı tarafından düzenlenir; bu, p₅₃'ün bağlanması ve subselüler translokasyonu üzerine p₅₃ transkripsiyonel

aktivitesini, exportin-1 (CRM1 veya XPO1) yoluyla çekirdekten sitoplazmaya inhibe eder (Nachmias vd., 2020; Miles vd.,2021)

Nekroz: Başka bir hücre ölümü şekli olan nekroz, canlı organizma içinde belirli bir bölgede meydana gelen bir fenomen olan hücre ölümü sürecini tanımlar. Nekroz, bir veya daha fazla hücreyi etkileyen, sonucun düzensiz ve yıkıcı olmasıyla kazara meydana gelebilir. Süreç, enfeksiyon, toksinler veya travma gibi çeşitli dış faktörler nedeniyle oluşur. Biyolojik olarak bunlar gelişigüzel bir şekilde kendini gösterir (Antonella vd.,2010). Bu perspektiften, belirli bir bölgede canlı organizma düzeyinde nekroza neden olabilecek değişiklikler,öncelikle yaralanmaların meydana gelmesiyle bağlantılıdır. Aniden ciddi hücre hasarı meydana gelebilir; örneğin bazen fiziksel ve kimyasal bir travmayı takiben iskemi veya hiperterminin neden olduğu gibi. Bu bağlamda nekroz, hücreler artık iyon homeostazını koruyamadığında meydana gelen bir tür hücre metabolik çöküş olarak (ana inorganik katyonların ve anyonların asimetrik konsantrasyonları, hücre zarlarının ana işlevidir) düşünülebilir(Synthesis vd., 2009). Nekroz, art arda meydana gelen birkaç aşamadan sonra gerçekleşir. İlk aşamada, nekroz öncesi, geri dönüşümlü hücre hasarı ile karakterize edilen distrofik değişikliklerdir. Nekrobiyoz olarak adlandırılan bir sonraki aşamada, bu, distrofik ile geri dönüşü olmayan hücre hasarı ile karakterize edilir; burada hücreler, anabolik ile karşılaştırıldığında katabolik süreçlerin hakim olduğu "ölmektedir". Nekroz adı verilen son aşama, biyolojik bir sistem olarak hayati hücrenin bozulması ile karakterize edilir(Antonella ve Melek, 2011).Hücre ölüm sinyalinin doğası, doku tipi ve gelişim aşaması gibi faktörler hücrenin apoptoz veya nekroz yoluyla ölmesine etki gösterir (Fiers vd., 1999; Zeiss, 2003).

Uyarının yoğunluğu ve süresi, ATP tükenmesinin derecesi ve kaspazların mevcudiyeti gibi faktörlere bağlı olarak eşzamanlı olarak ortaya çıkabildiklerinden apoptozu nekroza ayırmak her zaman kolay değildir (Zeis, 2003). Nekroz, genellikle geniş hücre alanlarını etkileyen kontrolsüz ve pasif bir süreç olduğu halde, apoptoz kontrollü,enerjiye bağımlıdır ve bireysel veya hücre kümelerini etkileyebilir. Hücrenin enerji kaynağına müdahale ve hücre zarlarına doğrudan zarar, nekrotik hücre hasarına aracılık eden iki ana mekanizmadır.

Nekroz zamanı hücre zarı bütünlüğündeki kayıp, sitoplazmik içeriğin çevreleyen dokuya salınmasıyla sonuçlanır. Apoptotik hücreler, hücre bileşenlerini çevreleyen

interstisyel dokuya salmadıklarından ve hızla fagosite edildiğinden esasen inflamatuvar reaksiyon yoktur (Savill ve Fadok, 2000; Kurosaka vd., 2003).

Piknoz ve karyoreksisin apoptoza özgü olmadığını ve nekrozla meydana gelen sitomorfolojik değişiklikler yelpazesinin bir parçası olabileceğini de belirtmek önemlidir (Cotran vd., 1999). Çizelge 2.2’de, apoptoz ve nekrozun başlıca özelliklerinden bazıları karşılaştırılmaktadır (Viktorsson ve Lewensohn, 2007; Korkut, 2018):

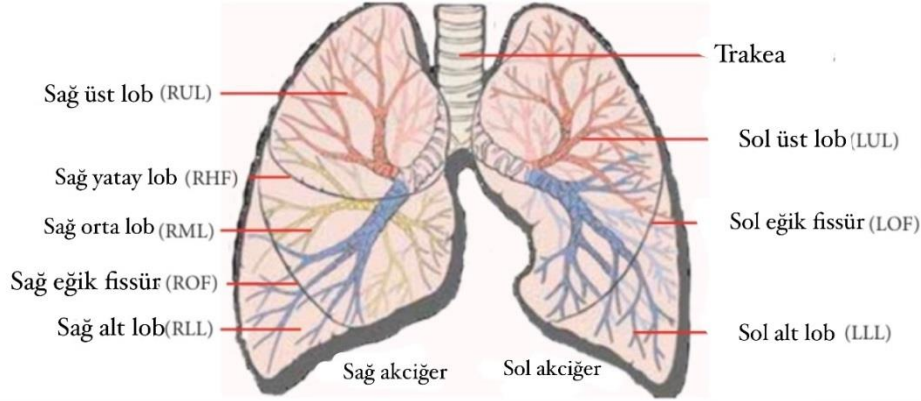
Çizelge 2.2. Apoptoz ve nekrozun özelliklerinin karşılaştırılması (Viktorsson ve Lewensohn, 2007; Korkut, 2018)

Apoptoz	Nekroz
Büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, apoptik yolak aktivasyonu, sitotoksik etki, radyasyon.	Hipotoksik ortam, oksidatif stres, ağır metaller, toksik maddeler, inflamasyon.
Hücre membranı, organeller sağlamdır.	Membran bütünlüğü bozulmuştur, organeller parçalanmıştır.
Hücre büzülmesi ve konvolüsyonu oluşur.	Hücre şişmesi ve lizisi gerçekleşir.
ATP gerektirir.	ATP gerektirmez.
Hücreler fizyolojik şartlar dolayısıyla tek başına veya grup halinde ölür.	Hücreler patoloji nedenlerden dolayı grup halinde ölür.
Makrofajlar tarafından fagosite edilir.	Lizozomal enzimler sekresyonu gerçekleşir.

2.4 Akciğer Anatomisi

Solunum sistemi burunda başlar, daha distalde farenks, gırtlak ve sol ve sağ bronşlara ayrılan trakea tarafından takip edilir. Bronşlar her biri ayrıca daha küçük bronşiyollere bölünür ve yol, akciğerin derinliklerinde, alveolar keselerde terminal bronşiyollerde sona erer. Solunum yolunun farklı bölümlerini sınıflandırmak için çeşitli biçimler vardır. En sık kullanılan kategorilerden biri hava yollarının iki ana bölüme ayrılmasıdır: burun, burun boşluğu ve farinksten oluşan üst solunum yolları; gırtlak, soluk borusu, bronşlar ve alveollerden oluşan alt solunum yolu (Gehr, 1984).

Akciğer pürüzsüz, parlak bir viseral plevra ile kaplıdır. Plevral membran yarı saydamdır, ancak akciğere dayandığı için viseral plevral yüzey pembe görünür. Artan yaşla birlikte, plevra her zaman, miktarı çevresel partiküllere maruz kalma derecesinin bir yansıması olan siyah pigment biriktirir(Yousem, 2001). Şekil 2.5'de sistematik bir diyagram gösterilmektedir:



Şekil 2.5. İnsan akciğeri. İnsan akciğerleri beş lobdan oluşur. Sağ akciğer sağ üst lob (RUL), sağ orta lob (RML) ve sağ alt lob (RLL) olmak üzere alt bölümlere ayrılır ve sağ oblik fissür ve sağ yatay fissür ile ayrılır, sol akciğer ise sol eğik fissür ile ayrılan sol üst lob (LUL) ve sol alt lob (LLL) olarak alt bölümlere ayrılmıştır. Akciğer loblarına ayrı bronş ağaçları ve bunlara karşılık gelen pulmoner arterler hizmet eder ve anatomik olarak bağımsızdır (Doel vd.,2015).

Akciğerler balon gibi sönebilen elastik bir yapıya sahiptir ve şişecek güç olmadığında tüm havayı soluk borusundan içeri doğru iterler. Aynı zamanda akciğerler ile göğüs arasında bazal bölge dışında bir bağlantı yoktur. Akciğerler, çevreleyen plevral sıvının kayganlaştırıcı etkisi nedeniyle göğüs boşluğunda hareket eder ve bu boşlukta "yüzer". Ayrıca, visseral ve parietal plevra arasındaki lenfatik kanallardan fazla sıvının sürekli dışarı akışı, düşük basınçlı vakum etkisi yaratır. Bu nedenle akciğerler göğüs boşluğuna yapışmış gibi görünür ve göğüs genişleyip kasılırken bu kayganlaştırıcı sıvı içinde serbestçe hareket eder (Hall,2011).

2.5. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri, dünya çapında kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir ve insidansı artmaya devam etmektedir (Ginsberg vd., 2001). Akciğer kanseri en kötü huylu tümörlerden biridir ve kısa öykü, hızlı seyir ve erken metastaz eğilimi ile karakterizedir. Akciğer kanserinin 2 ana formu vardır: küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (KHDAK) ve küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK). Küçük hücreli olmayan

akciğer kanserinin de 3 ana tipi vardır: adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom(Travis vd., 2015; Burke vd., 2015). Ayrıca klinik alt tiplerin çeşitli varyantları ve kombinasyonları vardır.Küçük hücreli akciğer kanseri, uzak metastazlar ve malign plevral efüzyonlar dahil olmak üzere bir radyasyon portalını genişletir: hastaların yaklaşık %70'inde teşhis edilir ve kötü prognoza sahiptir, sağkalım yaklaşık 10-12 aydır (Jackman vd., 2005). Akciğer kanserinde tedavi protokolleri ve klinik sonuçlar da adenokarsinom ve skuamöz hücreli karsinom arasında farklıdır (Ettinger vd. , 2017).

2.5.1.Adenokarsinom ve Skuamöz hücreli karsinoma

Adenokarsinom, en yaygın KHDAK tipidir ve akciğer kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturur (Burke vd., 2015). Adenokarsinom, daha küçük hava yolu epitelinde yer alan alveolar hücrelerden kaynaklanır ve TTF-1 ve napsin A gibi immünohistokimyasal belirteçleri ifade etme eğilimindedir.Dünya Sağlık Örgütü'nün sınıflandırması adenokarsinoma *in situ* (pre-invaziv lezyon), minimal invaziv adenokarsinom veya invazivlik derecesine bağlı olarak invaziv adenokarsinom olarak akciğer kanserinin erken evrelerini tanıır(Travis vd., 2015). Geçtiğimiz on yıllar boyunca, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin çeşitli onkogenlerdeki mutasyonların bir sonucu olarak ortaya çıkabileceği ve bu da hücre proliferasyonunu ve hayatta kalmasını uyaran sinyal yollarının yapıcı aktivasyonuna yol açabileceği gösterilmiştir. Adenokarsinom durumunda mutasyonlar ALK, BRAF, EGFR, HER2 MEK1, MET, RET, KRAS, NRAS, PIK3CA, TP53 ve ROS1 genlerini etkiler (Koivunen vd., 2008; Cardarella, vd., 2013; Lynch, vd., 2004; Buttitta, vd., 2006; Arcila, vd., 2015; Ju, vd., 2012; Sun, vd., 2010; Rikova, vd., 2007).Tedavideki ilerlemelere rağmen, esas olarak geç tanı nedeniyle, adenokarsinom için beş yıllık sağkalım oranı şu anda %15'ten azdır.Akciğer adenokarsinomunun erken teşhisi şu anda oldukça zor bir iştir. Her şeyden önce, bunun nedeni spesifik biyobelirteçlerin olmaması ve dolayısıyla toplu tarama yoluyla erken teşhisin imkansız olmasıdır. Ayrıca, sigara içmeyenlerde görülme sıklığının artması nedeniyle böyle bir inceleme için bir “risk grubu” belirlemek de sorunludur (Toh, vd., 2006; Subramanian, vd., 2007).Kural olarak, ilk aşama neredeyse asemptomatiktir ve daha sonra kendini gösteren göğüsteki öksürük ve ağrı, genellikle bronkopulmoner sistemin enflamatuvar hastalıkları ile karıştırılır, bu da yanlış tedaviye ve daha ciddi sonuçlara yol açar. Teşhis, radyografi, bilgisayarlı tomografi (BT) ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI), ultrason ve

bronkoskopik muayene, balgam sitolojisi, tümör belirteçleri için kan testi ve biyopsiyi içerebilen kapsamlı bir çalışma temelinde konur. Ancak akciğer adenokarsinomu durumunda birçok kanser türünün tanısında kendini kanıtlamış balgamın radyografi ve sitolojik incelemelerinin yeterince etkili ve kanıta dayalı olmadığını belirtmek gerekir (Toh, vd., 2006; Subramanian, vd., 2007).

Adenokarsinom, Kuzey Amerika ve çoğu Batı Avrupa ülkesinde en yaygın histoloji iken, Skuamöz hücreli karsinoma Doğu Avrupa ve Asya'da en yaygın histolojidir (Asamura ve ark. 2008). Ayrıca, Adenokarsinom obezite ve yüksek vücut kütlesi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (Chow ve ark. 1998; Lagergren ve ark. 1999). Skuamöz hücreli karsinoma daha çok tütün ve alkol kötüye kullanımıyla ilişkilidir (Cook ve ark. 2010). Tedavilerle ilgili olarak, Adenokarsinom'un kemoterapi ve radyoterapiye Skuamöz hücreli karsinoma'dan daha az duyarlı olduğu görülmektedir. Adenokarsinom'un uzun vadeli sonucu, cerrahi rezeksiyondan sonra Skuamöz hücreli karsinoma daha iyidir (Siewert ve ark. 2001). Sigara tüketimindeki azalma en yaygın histoloji olan Skuamöz hücreli karsinoma insidansını düşürmüş en yaygın akciğer kanseri tipinin akciğer adenokarsinomu olmasına yol açmıştır (Govindan vd., 2006).

2.5.2. Büyük hücreli karsinom

Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinin diğer bir ana tipi büyük hücreli karsinomdur. Büyük hücreli kanserler, tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %5 ila %10'unu oluşturur. Bu tümörler tipik olarak kötü diferansiyedir ve bol sitoplazmalı ve büyük nükleollü büyük hücrelerden oluşur. Belirtileri hemen hemen diğer türler ile aynıdır. Vaka sayısı çok olmasa da uzak organlara metastaz yapma eğiliminin fazla olmasıyla tehlikeli bir türdür.

2.6. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri, dünya çapında hem cinsiyet hem de kadın ve erkek ayrı ayrı kanser ölümlerinin önde gelen nedenidir. 2018'de akciğer kanseri, dünya çapındaki tüm kanser ölümlerinin %18,4'ü olan tahmini 1.761.000 ölümden sorumluydu. 2018'de kadınlar arasında tahmini 576.000 ölümlerle birlikte, kadınların akciğer kanserinden ölme olasılığı erkeklere göre yarıdan daha azdı (Bray vd., 2018). Ancak ABD ve Avrupa'da kadınlar arasında akciğer kanseri insidansı ve mortalitesi artmaktadır. 2017'de akciğer kanseri, 100.000 kadında 14,6 ölümlerle Avrupa'da kadınlar arasında kansere bağlı

ölümlerin önde gelen nedeni olarak meme kanserini geride bırakmıştır (Malvezzi vd.,2017). Akciğer kanseri, sigara içmenin en yaygın olduğu gelişmekte olan ülkelerde en yüksek insidansa sahiptir ve bölgeler arasında görülme sıklığı 20 kattan fazladır. Prostat kanseri 104 ülkede erkekler arasında en sık görülen kanser iken, akciğer kanseri Rusya, Çin ve Doğu Avrupa'nın çoğu, Orta Doğu ve Güneydoğu Asya dahil 37 ülkede en yaygın olanıdır.Ulusal Kanser Enstitüsü'nün Sürveyans, Epidemiyoloji ve Son Sonuçlar (SEER) programına göre, 2020'de ABD'de tahmini 229.000 yeni akciğer kanseri vakası vardır ve tüm kanser teşhislerinin %12,7'sini oluşturmaktadır. 45.6/100.000'lik mevcut insidans, büyük ölçüde sigarayı bırakmaya bağlı olarak 1992'de 69,5/100.000'lik bir zirveden düşmüştür. Birçok Batılı ülke benzer bir eğilim bildirirken, Çin ve eski Sovyetler Birliği ülkeleri gibi gelişmekte olan ülkeler sigarayı bırakma ve akciğer kanseri insidansında benzer bir başarı görmemiştir (Howlander vd., 2019). Çin'de erkeklerin %65'i şu anda 20'li yaşların ortalarında sigara içmeye başlaması akciğer kanseri insidansında gelecek on yıllar boyunca devam edecek bir artışın habercisidir (Doll, 2010).Artan sanayileşme ve dünya çapında tütüne erişim ile birlikte, dünya çapında akciğer kanseri insidansı artmaktadır (Barta,2019).Küresel olarak erkekler, akciğer kanserine yakalanma ve akciğer kanserinden ölme olasılıklarınıniki katından fazla. Cinsiyet eşitsizliğine en büyük katkı, erkeklerin tütün içme olasılığının daha yüksek olmasıdır (Pesch, 2015).

Aile öyküsü: Orta ve Doğu Avrupa'dan yapılan meta-analizlere göre, pozitif bir aile öyküsü akciğer kanseri riskini 1,7 kat artırmaktadır (Lissowska vd., 2010).Anamnez birinci derece akrabalarda ise, sigara içme öyküsü kontrol edilse bile risk 2-4 kata çıkmaktadır (Kanwal vd., 2017). Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), kalıtsal akciğer kanseri riskinin artmasıyla ilişkili çeşitli kromozomal bölgelerde varyantları ilişkilendirmiştir. Bunlar arasında telomeraz ters transkriptaz (TERT) genini (Landi vd., 2009) içeren 5p15 lokusu, G-protein sinyalleşmesini düzenleyen 6p21 lokusu (Yokota vd., 2010) ve 15q25-26 lokusu, nikotin bağımlılığını ve akciğer kanserine yatkınlığı arttırdığı gösterilmiştir (Thorgeirsson vd., 2008). Diğer yaygın kanserlerin aksine, akciğer kanseri için spesifik germ hattı genetik mutasyonları (BRCA1/2 gibi) veya predispozan sendromlar (Lynch sendromu) tanımlanmamıştır. Bununla birlikte, aile öyküsü ve genetik riskin dikkate alınması, özellikle sigara içmek gibi komorbid risk faktörleri olanlarda erken tarama programlarının etkinliğini artırabilir (Kanwal vd., 2017).

Tütün: Hem alkol hem de tütün kullanan kişilerin ağız, nazofarenks, gırtlak ve yemek borusu kanseri geliştirme olasılığı, yalnızca alkol veya yalnızca tütün içen kişilere göre 5 kat daha fazladır. Çok miktarda alkol ve tütün tüketenler için bu risk 30 kata kadar çıkabilmektedir. Tütün kullanımı aynı zamanda akciğer kanserinin de önde gelen nedenidir. Tahminen 186 milyon insanın (yani yetişkin nüfusun %26'sının) tütün kullandığı DSÖ Avrupa Bölgesi'nde tütün, kritik bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Erkeklerde, tütün kullanımı tüm trakea, bronşlar ve akciğer kanserlerinin %92'si ile ilişkilidir; kadınlar için bu rakam %62'dir. Sigara içenlerin akciğer kanserine yakalanma riski, tütün kullanmayan kişilere göre 22 kat daha fazladır. Bununla birlikte, kendileri tütün kullanmayan ancak evde, işte veya diğer halka açık yerlerde tütün dumanına maruz kalan kişilerde kronik solunum yolu hastalığı ve kanser dahil olmak üzere akciğer hastalıkları geliştirme riski daha yüksektir. Sigara içenler tütün kullanmayı bırakırsa 10 vakadan neredeyse 9'u önlenebilir durumdadır. Tütünü bırakmanın faydaları neredeyse anında hissedilir. Sigarayı bıraktıktan sadece 20 dakika sonra nabız yavaşlar. Kan dolaşımı ve akciğer fonksiyonu 2-12 hafta içinde düzelir. 1-9 ay içerisinde öksürük ve nefes darlığı yavaş yavaş kaybolur. Sigarayı bıraktıktan 10 yıl sonra akciğer kanserine yakalanma riski, sigara içen birine göre yaklaşık yarı yarıya azalır (<https-1>).

2005 tarihli bir derlemede, Yüz Yıl Akciğer Kanseri, yazarları tarihsel olarak bu tümörlerin, tütünün savaş kitinin bir parçası olduğu ve komutanlar tarafından teşvik edildiği iki büyük savaştan sonra bir halk sağlığı sorunu haline geldiğini bildirmiştir. Sigaranın popülerleşmesi Birinci Dünya Savaşı sırasında General John J. "Black Jack" Pershing'in "Bana bu savaşı kazanmak için ne gerektiğini sorun, ben de cevaplayayım – tütün ve mermi" dediği zaman gerçekleşmiştir. Şu anda, gelişmiş ülkelerde, tütünün farklı sağlık sorunları ve özellikle akciğer kanseri ile doğrudan ilişkisinin sayısız teyidi nedeniyle akciğer kanseri azalmaktadır. Mevcut endişe, özellikle şu anda dünyanın sigara içen nüfusunun yaklaşık üçte birini oluşturan Çin'de, sigara tüketiminde önemli bir artışın tahmin edildiği gelişmekte olan ülkelerde daha fazla görünmektedir (Spiro ve Silvestri., 2005).

Diğer faktörler: Beslenmenin rolü kanser insidansının %35-50'sini oluşturur (Doll ve Peto., 1984). Yiyeceklerin artan kalori içeriği yağ metabolizmasını ve hormonal dengeyi bozar; bu hücre bölünmesini uyarır (Radkevich vd., 2012). İrsiyet, kanserojen maddeler, alkol, iyonlaştırıcı radyasyon ve ilaçlar gibi kansere yol açan diğer

faktörlerin oranı çok daha azdır (Doll ve Pito.,1984). Öte yandan, protein ürünleri, uzun süre tüketildiğinde kötü huylu tümörleri indükleyebilir. Protein ürünlerinin işleme sıcaklığı ne kadar yüksek olursa, o kadar çok heterosiklik amin oluşur (Eckholm, 1980).

2.7Akciğer Kanseri Teşhis Yöntemleri

Birçok kimyasalın akciğer dokusu üzerinde kanserojen etkisi vardır: kömür ve petrolün (katranlar, koklar, gazlar vb.) ısıl işlem ürünlerinin bir parçası olan polisiklik aromatik hidrokarbonlar, bir dizi basit organik madde (klorometil eterler, vinil klorür, vb.), bazı metaller ve bileşikleri (arsenik, krom, kadmiyum).Çelik, ağaç işleme, metalurji endüstrileri, seramik, asbest, çimento ve fosfat endüstrilerindeki işçilerde, krom bileşiklerine veya taş tozuna maruz kalan kişilerde ve motorlu araç sürücülerinde akciğer kanserinin görülme sıklığı artmaktadır (Pira, 2005).

Göğüs BT taraması: Bugüne kadar akciğer kanserinin primer ve aydınlatıcı tanısında göğüs BT'nin rutin röntgen incelemesine üstünlüğü açıkça görülmektedir. Bu, yöntem yüksek çözünürlüğü sayesinde kötü huylu bir tümörün belirtilerini erken bir aşamada tespit etmeyi mümkün kılar (Ishchenko, 2001; Sedykh vd., 2004; Silvestri vd., 2003).BT'nin modern yetenekleri, yalnızca akciğer dokusunun hipoventilasyon semptomlarının başlangıcından önce merkezi akciğer kanserini teşhis etmekle kalmaz, aynı zamanda peribronşiyal büyüyen tümörler dahil olmak üzere ilk formlarını tanımlamaya da izin verir. Tümör düğümüne kan beslemesinin doğasını belirleyen ve yoğunluk dağılım grafiklerini çizen ek dijital görüntü işleme teknikleri, malign bir sürecin özelliği olan ek belirtileri tanımlamayı mümkün kılar, böylece ayırıcı tanı aralığını daraltır (Sedykh vd.,2007; Adasko, 2003).

Manyetik rezonans görüntüleme: Göğüs organlarının manyetik rezonans görüntülemesinin (MRG) - akciğer kanserinin tanısında BT'ye göre hiçbir avantajı yoktur. Sadece bazı durumlarda, göğüs duvarının (omurlar) yapılarına tümör büyümesi veya akciğer apeks kanserinin brakial pleksus ve subklavian damarlara yayılması hakkında MRI kullanılarak elde edilen veriler, tedavi planı seçimini veya kapsamını etkiler (Bradley, 2004).

Pozitron emisyon tomografi: Pozitron emisyon tomografisi (PET), akciğer ve mediastende saptanabilir değişikliklerle anatomik yapıların ve uzaysal ilişkilerinin net bir görüntüsünü sağlamaz, bu da operasyonun kapsamını veya uzaktan radyasyon tedavisi alanını planlamak için kullanımını sınırlar(Bradley, 2004). PET, mediasten

lenf düğümlerindeki metastazları, plevral efüzyonu ve uzak metastazları saptamada oldukça etkilidir (Reed vd., 2003; Gupta vd., 2002; Vansteenkiste vd., 2004).

Fibrobronkoskopi: Fibrobronkoskopi, akciğer kanseri teşhisi için zorunlu yöntemlerden biridir. Larinks, trakea ve bronşları görsel olarak incelemenize, tümörün yerini ve yayılmasının sınırlarını doğrudan belirlemenize ve ayrıca akciğer ve mediasten kökünün lenf düğümlerinin genişlemesini dolaylı olarak yargılamanıza olanak tanır. Ek olarak, bronkoskopi, sitolojik inceleme için materyal elde ederek (fırça biyopsisi, smearler, baskılar, sıyrıklar veya bronş ağacından yıkamalar) tanıyı morfolojik olarak doğrular ve tümörün histolojik yapısını netleştirir.

Son yıllarda, X-ray endoskopi, endosonografi ve floresan endoskopi özelliklerine sahip bronkoskopik cihazlar, santral akciğer kanserinde primer ve aydınlatıcı tanısında giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır. Mukozal kanserin gizli mikro odaklarını saptamak için en umut verici yöntem, floresansın etkisine dayanan ve tümördeki endojen ışığa duyarlılaştırıcıların konsantrasyonunu kaydeden floresan endoskopidir (Sokolov, 1999; Lam,1996).Büyütülmüş mediastinal lenf düğümlerinin fibrobronkoskopi ile morfolojik olarak doğrulanması amacıyla, BT verileri dikkate alınarak bir transbronşiyal veya transtrakeal ponksiyon yapılır. Endoskopik ultrasonik sensörlerin kullanımı, genişlemiş bronkopulmoner, trakeobronşiyal, pretrakeal ve bifurkasyon lenf düğümlerini daha net bir şekilde görüntülemeyi ve transbronşiyal ponksiyon gerçekleştirmeyi mümkün kılar (Okamoto vd.,2002). Genişlemiş çatalanma lenf düğümleri ile özofagoskopi ile bir ponksiyon biyopsisi yapılır (Wallace vd., 2001).

Transtorasik (perkütan) ponksiyon: Floroskopik, bilgisayarlı tomografik veya ultrason kontrolü altında gerçekleştirilen transtorasik (perkütan) ponksiyon, akciğerdeki periferik bir odaktan araştırma için malzeme elde etmenizi sağlar. 3 cm'ye (T1) kadar bir neoplazm çapı ile, bir bütün olarak yöntemin etkinliği yaklaşık %70'tir (<1 cm - %49, 1-1.5 cm - %63, 1.6-3 cm - %84); ve tümör çapı >3 cm (T2–T3) – %85–90 (Trakhtenberg ve Chissov, 2000; Shimizu vd.,2006).

Mediastinoskopi: Histolojik inceleme için değiştirilmiş mediastinal dokulardan daha büyük miktarda biyopsi materyali elde etmek için genellikle mediastinoskopi, parasternal mediastinotomi veya video-kanseroskopi yapılır. Mediastinoskopi, daha az invaziv yöntemler kullanılmadığında mediastinal lenfadenopati tanısında altın standart olmaya devam etmektedir (Rusch 2005).

Bölgesel ve uzak metastazları tanımlamak için ek tanı yöntemleri kullanılır: karaciğerin ultrason muayenesi, adrenal bezler, retroperitoneal boşluk, supraklaviküler bölgeler, tüm vücudun PET'i, karın organlarının BT'si, beyin, iskeletin radyonüklid muayenesi, omurga kolonu ve pelvik kemiklerin MRG'si, kemik iliğinin morfolojik muayenesi vb. Bu çalışmalara duyulan ihtiyaç ve bunların sırası, birincil tümörün prevalansına, morfolojik yapısına ve klinik semptomlarına bağlıdır.

2.8 Akciğer Kanseri Tedavisi

Genel olarak kemoterapi, yüksek oranda çoğalan hücreleri öldürme yeteneğinden dolayı kanser için etkili bir tedavidir. Kemoterapötik ajanlar, sitoplazmik seviyede kanser hücrelerinde strese neden olur ve yanıt olarak, seramid seviyeleri artar, ardından apoptotik hücre ölümünün indükler. Örneğin, daunorubisin, etoposid ve gempitabin, de novo seramid oluşumunun indükleyicileri olarak tanımlanmıştır (Perry vd.,2000).

Kemoterapi direnci ayrıca, sonuçta hücrenin hayatta kalmasına yol açan lipid türlerinin üretimini destekleyen, değiştirilmiş sfingolipid metabolizmasıyla da bağlantılıdır (Shaw vd.,2018). Bu anlamda, tümörleri öldürmek ve kemoterapi direncini tersine çevirmek için sfingolipid metabolizmasının birçok inhibitörü veya modülatörü geliştirilmiştir (Beckham vd., 2015).

2.8.1 Akciğer kanserinde moleküler prognostik faktörler

DNA dizilemesindeki teknolojik gelişmelerle birlikte KHDAK için onkolojik tedavilerin sonuçlarını iyileştirme çabaları, hastalığın spesifik moleküler özelliklerinin bilgisine ve sınıflandırılmasına dayalı yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine yol açmıştır. Adenokarsinomlu hasta alt grupları ve EGFR geninin kinaz alanındaki aktive edici mutasyonları, erlotinib, gefitinib, afatinib ve osimertinib gibi seçici tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'ler) ile başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir ve geleneksel kemoterapiye kıyasla daha az yan etki ile karakterizedir (Paliogiannis vd., 2015; Dong vd., 2019).

Ek olarak,ALKve ROS1 füzyonlarının krizotinib, alektinib gibi hedefe yönelik inhibitörlerle etkin bir şekilde ilaçlanabildiği gösterilmiştir ve ileri evre adenokarsinom tedavisi için önerilmektedir (Shaw vd., 2013; Bergethon vd., 2012; Lindeman vd., 2018).

Ayrıca, Kirsten sıçan sarkomu viral onkogen homologu (KRAS) ve v-raf murin sarkomu viral onkogen homologu B (BRAF) mutasyonları veya protoonkogen cMET amplifikasyonları gibi ek sürüklenabilir genetik değişikliklerin klinik etkisinin değerlendirilmesi için aktif araştırmalar devam etmektedir ve akciğer kanserinin patogenezi ve diğer malignitelerin tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (Palomba vd., 2016; Sini vd., 2018).

Akciğer kanserinin moleküler temeli karmaşık ve heterojendir. Akciğer kanserinde tümör oluşumu, EGFR, KRAS, BRAF, mayoza özgü serin/treonin protein kinaz 1 (MEK1), tüylü ilişkili 2 (HER2), MET, ALK ve ret proto-onkogen gibi (RET) büyümeyi teşvik eden genlerin aktivasyonunu ve tümör baskılayıcı p53 (TP53), kromozom 10'da silinen fosfataz ve tensin homologu (PTEN), karaciğer kinaz B1 (LKB1) gibi tümör baskılayıcı genlerin etkisizleşmesini içerir(Yoda vd., 2019). Sıklıkla mutasyona uğramış genler arasında tirozin kinazlar, bunların arasında EGFR homologu ERBB4; çoklu efrin reseptör genleri, özellikle EPHA3; vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü VEGFR2 (KDR); ve NTRK genleri bulunur (Ding vd.,2008).

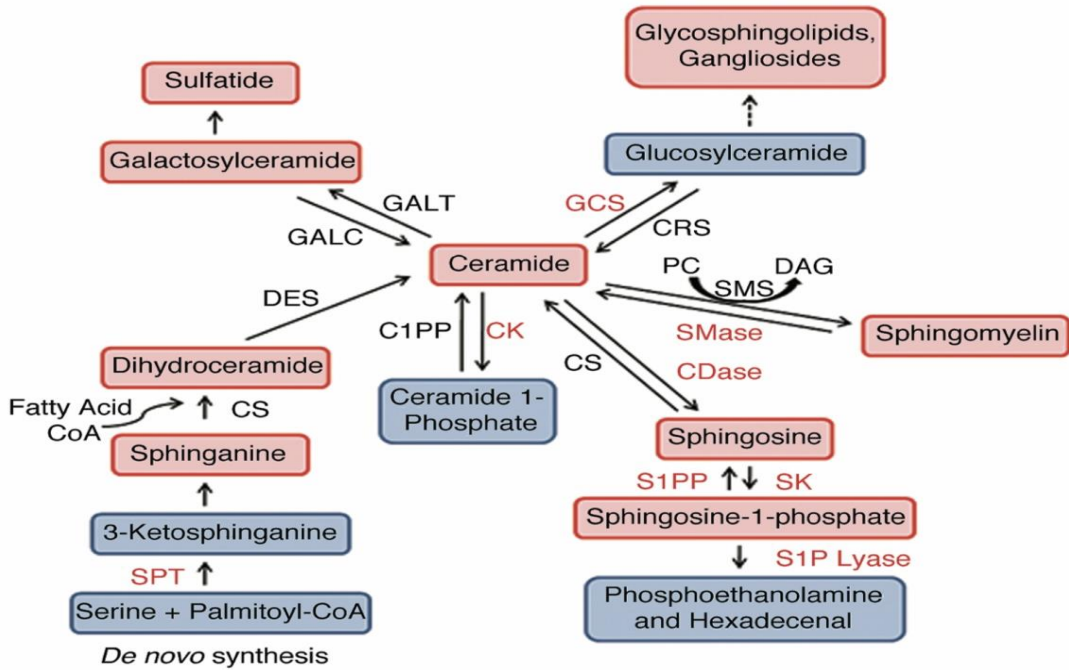
2.8.2 Sfingolipid metabolizması

Sfingolipidler, hücresel yapısal bütünlük için gerekli olan ve lipid çift tabakasının akışkanlığının düzenlenmesinde rol oynayan bir lipid sınıfını oluştururlar.Sfingolipidlerin metabolitleri ayrıca biyoaktif lipid habercileri olarak işlev görür ve reseptörlerin, protein kinazların ve fosfatazların ve iyon taşıyıcıların aktivasyonu veya inhibisyonu yoluyla hücre içi sinyalleme katkıda bulunur. Bu metabolitlerin büyüme, farklılaşma, apoptoz ve otofaji dahil olmak üzere çok sayıda hücresel işlevi etkilediği bilinmektedir (Segui vd., 2006; Zheng vd., 2006; Leong ve Saba 2010).

Mitojenik etkiler ortaya çıkaran veya hücre içinde ölümün düzenlenmesine katkıda bulunan dinamik bir sfingolipid metabolit dengesi vardır.Sfingolipidlerin özellikle ana biyoaktif lipidleri olarak bilinen seramid ve sfingosin, tipik olarak hücre büyümesinin durması, hücre ölümünün indüklenmesi, hücre ölümünü ve sağkalımını düzenlemesi ile ilişkili sfingolipid metabolitlerinin örnekleridir; sfingosin-1-fosfat (S1P) dahil olmak üzere diğer fosforile edilmiş ve glikozile edilmiş sfingolipid metabolitleri, hücresel çoğalma, hayatta kalma ve ilaç direnci ile ilgilidir.Bu nedenle, hücrenin nihai kaderini belirleyen karmaşık bir sfingolipid dengesi vardır (Lindsay vd.,2011).

Bu iki molekül sfingolipid metabolizmasının ve sinyalleşmesinin antikanser terapiye cevaben oluşturulan proseslerdeki rollerinin anlaşılabilmesi için önemlidir. Son zamanlarda sfingolipidlerin ve bunların yol üstü hedeflerinin tümör büyümesini düzenlemedeki ve kemoterapiye, radyoterapiye ve/veya immünoterapiye, sfingolipid sinyalleşme noktalarını hedeflemek için olan genetik ve farmakolojik elemanlara karşı kanser hücrelerinin verdiği cevaplara düzenlemeleriyle ilgili mekanistik detaylar ortaya konulmuştur (Cuvillier, 2002).

Sfingolipid molekülleri kanser hücresi ölümünün veya hayatta kalmasının indüklenmesinde anahtar rollere sahip olan metabolik enzimler tarafından yüksek oranda düzenlenir. Düzensiz sfingolipid metabolizması, insan kanserleri arasında ortak bir tema haline gelmiştir. Sfingolipit metabolizmasının merkezi molekülü seramidir. Seramid, sfingozin molekülünün amino azotuna farklı uzunluklarda bir yağ asidinin amid bağı ile bağlanmasıyla oluşur (Çakır 2010 , Adan 2018). Sfingolipid metabolik yolunun temel bir teması Şekil 2.6'da gösterilmiştir (Öğretmen ve Hannun. 2004; Fyrst ve Saba 2004; Saddoughi vd., 2008).



Şekil 2.6. Sfingolipid metabolik yol. Endojen seramid, serin ve palmitoil-CoA'nın yoğunlaştırılması, sfingomyelinazlar tarafından sfingomyelin katabolizması, glikosfingolipidlerin katabolizması veya seramid 1-fosfat ve sfingosin 1-fosfat gibi metabolitlerin fosforilasyonu yoluyla de novo sentez yoluyla üretilir. El yazmasında ayrıntılı olarak açıklandığı gibi, bu sfingolipid enzimlerinin ve metabolitlerinin bir çoğunun kanserde düzensiz olduğu bilinmektedir. CK, seramid kinaz; C1PP, seramid 1-fosfat

fosfataz; cR'ler, serebrosidaz; cs, seramid sentaz; cdase, seramidaz; dAG, diasilgliserol; des, dihidroseramid desatürüz; GALc, galaktosilseramidaz; GALT, galakto-iltransferaz; Gcs, glukozilseramid sentaz; PC, fosfatidilkolin; sK, sfingosin kinaz; sIPP, sfingosin 1-fosfat fosfataz; sIP Liyaz, sfingosin 1-fosfat liyaz; sMs, sfingomyelin sentaz; sMase, sfingomyelinaz; sPT, serin palmitoil transferaz.(Lindsay vd.,2011).

Seramid hücre içinde salvage (kazanım) yolağı, de novo yol izi, sfingomiyelin döngüsü ve katabolik yolak olmak üzere dört şekilde oluşmaktadır (Adan 2018 ; Moro vd 2019). De novo yolağında seramid, endoplazmik retikulum zarının sitozolik yüzeyinde, çekirdek zarında, mitokondride ve lizozomda sentezlenir. De novo yol izinin ilk basamağında L-serin ve palmitoil koenzim-A'dan serin palmitoil transferaz (SPT) enzimi aracılığı ile 3-keto-sfinganin sentezlenir. Oluşan 3-keto-sfinganin ise 3-keto-sfinganin redüktaz enzimi aracılığı ile dihidrosfingozin oluşur. Dihidrosfingozin ise seramid sentaz (SerS) tarafından dihidroseramide dönüştürülür ve bu da desaturaz enzimi ile seramide dönüştürülür (Şekil 13) (Adan 2018 ; Moro vd 2019).

Salvage yolağında, kompleks sfingolipitlerin terminal ucundaki hidrofilik grupları spesifik hidrolazlar aracılığıyla sfingolipitlerin terminal uçlarından uzaklaştırılarak katalize edilerek seramid üretimi gerçekleştirilir (Adan vd 2013).

Sfingomiyelin yolağında, sfingomiyelinaz (SMaz) enzimi aracılığı ile hücre membranında bulunan sfingomiyelinin hidroliz edilmesi sonucu seramid üretimi gerçekleştirilir (Adan vd 2013, Adan 2018, Moro, vd 2019).

Katabolik yolakta ise seramid ile negatif korelasyon içerisindeki sfingozin-1-fosfatın S1F fosfataz ile sfingozine daha sonra seramid sentaz aracılığı ile seramide dönüştürülmesi sonucu seramid üretilir (Moro vd2019).

2.8.3 Seramid

Bir hücrenin kanserli hale gelmesi için, öncelikle hücre döngüsünün durdurulması ve apoptosis (Hanahan ve Weinberg., 2000) gibi aşırı çoğalmasını önlemek için kurulmuş sistemleri yenmesi gerekir. Apoptozun düzenleyicisi olarak seramid, kanserli hücrelerin gerekli çoğalmayı sağlamak için atlatması gereken moleküllerden biridir, birçok kanserli hücre hattının metabolik dönüşümünü/bozunmasını üstlendiği bulunmuştur (Morad ve Cabot., 2013). Bu nedenlerden dolayı, kanserli hücrelerde seramid seviyelerinin eski haline getirilmesi, onlarca yıldır çalışmanın odak noktası olmuştur.

Seramid, biyoaktif sfingolipit ailesi üyeleri arasında üzerinde en fazla çalışma yapılmış bir tümör baskılayıcı lipittir. Tümör baskılayıcı lipit olma özelliğinin temel sebebi apoptozu tetiklemesinden kaynaklanmaktadır. Fakat sadece apoptozu tetiklemesinden dolayı tümör baskılayıcı özellik göstermez aynı zamanda hücre büyümesi ve farklılaşması, hücre yaşlanması, invazyon, metastaz, anjiyogenez, nekroz ve nekroptoz gibi olayları da regüle ederek tümör baskılayıcı özellik gösterir (Adan vd 2013). DNA hasarı, hipoksi, stres ve apoptotik moleküllerin indüklenmesiyle hücre içinde seramid artışı gerçekleşir ve bu artış hücre çoğalmasının baskılanması, apoptozun indüklenmesi, telomeraz aktivitesinin inhibe edilmesi ve hücre yaşlanması ile sonuçlanır (Yıldız 2016). 1993 yılında, seramid ile apoptoz indüksiyonu ilk olarak lösemik hücrelerde eksojen seramid 85 ile tedavi edilerek gösterilmiştir. O zamandan beri, endojen olarak üretilen seramidin, hücre tipine bağlı çeşitli mekanizmalar tarafından düzenlenen (ana metinde tartışıldığı gibi) gerçek bir apoptoz indükleyicisi olduğunu gösteren sayısız çalışma yapılmıştır (Reynolds vd., 2003). Seramidler endoplazmik retikulumda (ER) sentezlenir ve daha sonra Golgiapparatus yoluyla hücre zarına, lipid çift tabakasının yapısal bileşenleri olarak, çekirdeğe veya esas olarak sinyal molekülleri olarak işlev gördükleri mitokondriye taşınabilirler (Bieberich. 2008). Seramidler, kendi başlarına sfingolipid olmanın yanı sıra, sfingolipid ailesinin diğer üyeleri için metabolik ara ürünlerdir(van Echten-Deckert ve Herget., 2006).

Kemoterapötikler, etoposid ve doksorubisin, lösemi hücrelerinde hücre ölümünün indüklenmesi sırasında seramidi yükseltir (Perry ve Hannun., 1998). Paklitaksel ve tamoksifen kombinasyonu, yumurtalık adenokarsinomunda seramidi artırır ve ilaç direncinin üstesinden gelir(Devalapally vd.,2008). E vitamini süksinat, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomunda seramid birikimi yoluyla hücresel büyümeyi engeller(Gu vd.,2008). PC3 prostat kanseri hücrelerinin kemoterapiye direnci, kusurlu seramid oluşumundan kaynaklanmaktadır (Wang vd.,1999). Bu güne kadar yapılan araştırmalarda, çoğu kemoterapötik ilacın seramidlerin seviyesini arttırdığı gösterilmiştir.Kemoterapötik ajanlar yoluyla hücre içindeki endojen seramid seviyelerinin arttırılmasına bir alternatif, eksojen kısa zincirli seramidlerin uygulanmasıdır. Eksojen seramid analogları beyin, prostat ve meme kanseri hücrelerinde sitotoksik bir etkiye aracılık etti (Bieberich vd.,2000; Bieberich vd.,2002; Oh vd.,2006; Crawford vd.,2003). Eksojen kısa zincirli seramidlerin (C2-, C6-, C8-seramid) uygulanması, artan hücresel geçirgenlikleri nedeniyle özellikle ilgi çekicidir.

Bununla birlikte, bu eksojen kısa zincirli seramidlerin sistemik dağıtımının önünde, çökme ve minimum zar taşınması dahil olmak üzere potansiyel engeller mevcuttur (Shabbits ve Mayer., 2003; Stover vd.,2005; Liu vd.,2010; Tran vd.,2008;Kester vd., 2008; Stover vd.,2008).Çeşitli seramid analogları tarafından insan nöroblastom, glioma, medulloblastom ve adenokarsinom hücrelerinde de apoptotik hücre ölümü gözlenmiştir(Bieberich vd.,2002). C6-piridinyum-seramid, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomunun büyümesini önemli ölçüde engelleyen katyonik suda çözünür bir seramid analogudur (Senkal vd.,2006). Katyonik uzun zincirli piridinyum seramid analogu LCL-30, kolon kanserinde de sitotoksitate göstermiştir (Dindo vd.,2006; Dahm vd.,2008). Nanolipozomal C6-seramidin, proinflamatuvar kinazların fosforilasyonunu inhibe ettiği ve insan nötrofillerinde sitokin ve kemokin üretimini bloke ettiği gösterilmiştir(Sun vd., 2008).Seraamidin deasilasyonu yoluyla oluşan sfingosinin fosforilasyonu, sfingolipid metaboliti olan sfingosin-1-fosfat (S1P) üretimine yol açar (Nava vd.,2002; Wang vd.,1999).

Seraamid aracılı apoptozun tetiklenmesi, mitokondri zar geçirgenliğini artırıp mitokondriden sitokrom c salınımını tetiklemek suretiyle intrinsik apoptoz yolağını tetiklemiş olur. Ayrıca seramid pro-apoptotik özellikte olan Bax'ın mitokondri zarına lokalizasyonunu sağlayarak intrinsik apoptozu başlatır (Adan 2018). Matriks metalloproteinaz (MMP) enzimleri kanser hücrelerinin metastaz ve invazyon yapmasında önemli rol oynar. Seraamidlerin kanser hücrelerinin metastaz ve invazyonuna etkisi bronşial kanser hücrelerinde yapılan bir çalışma sonucunda seramidin MMP-2 seviyesinin azalttığı gösterilmiştir (Debret vd 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Osmium tetraoksit

Glutaraldehit, Araldit

Propilen oksit

Uranil asetat

Kurşun sitrat (Electron Microscopy Science)

Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI)

Dimetil sülfoksit (DMSO)

Fetal Bovine Serum (FBS)

Tripsin-Etilendiaminotetraasetik asit (Tripsin/EDTA)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)

Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000 U/mL penisilin, 10mg/mL streptomisin)

25 ve 75 cm²'lik flask

96 ve 6 kuyucuklu plakalar

Pastör ve cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 mL hacimlerinde)

Enjektörler (10, 20 ve 50 mL hacimlerinde)

Steril falkon tüpler (15 ve 50 mL)

Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında)

Yuvarlak lamel

Bakır grid deney

3.2. Yöntemler

3.2.1. Hücre kültürü

Hücrelerin vücut dışında- in vitro ortamda tedavi amacıyla yetiştirilmesi ve çoğaltılmasına hücre kültürü denilmektedir. Hücre kültürü tekniği: kök hücrelerin üretimi, kanser araştırmaları, biokimya ve moleküler biyoloji çalışmaları, tüp bebek ve kısırlık tedavisi, zarar gören bir dokunun yeniden oluşturulması, aşı üretimi, ilaç sanayisinde, kullanılacak tıbbi değeri yüksek bitkilerin üretilmesi, bitki islah çalışmaları ve gen kaynaklarının korunması gibi bir çok alanda kullanılmaktadır.

Adenokarsinomik insan alveolar bazal epitelyal hücreli A549 ilk kez 1972 yılında D.J.Giard ve diğerleri tarafından elde edilmiştir.

3.2.2. İnsan akciğer kanseri A549 hücrelerinin çoğaltılması

ATCC'den (American Type Culture Collection) temin edilen küçük hücreli olmayan akciğer kanser hücre hattı - A549 (CCL-185), tez kapsamında deneylerde kullanılmak üzere stoktan çıkartıldı. Kriyo tüpler içerisinde -80 °C'deki donuk hücreler protokole uygun olarak, 37°C'ye getirilmiş sıcak su banyosunda hızlı bir şekilde çözdürülmüştür.

Hücreler, içerisinde besiyeri bulunan kültür flasklarına alınarak 37 °C'de %5 karbondioksit içeren ortamda inkübe edilmiştir. Çoğalan hücrelerin pasajlama işlemini tamamı hücreler tarafından kaplanmış flaskalara gerçekleştirilmiştir. Hücre dizileri, mikroskop altında inceleme sonucunda flask yüzeyini %80 oranında kapladıklarında besiyeri uzaklaştırılmış flask üzerine 2 mL fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) ilave edilmiş, hücrelerin hafifçe yıkanması sağlandıktan sonra PBS de ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Flaska hidrolitik bir enzim olan 2 mL Tripsin- EDTA çözeltisi eklenip 37 °C, %5 karbondioksit içeren ortamda 5 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Daha sonra bu çözeltiyi inaktive etmek amacıyla tekrar 4 ml besiyer eklenmiştir. Tüplere alınan hücreler santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmından uzaklaştırılır ve süspansiyon haline getirilir. Çoğalan hücreler 3 günlük periyotlar halinde pasajlanmıştır. Daha sonra çoğaltılan hücreler 8. pasajdan sonra tüm deneylerde kullanılmıştır.

3.2.3. MTT kolorimetrik testi ile C2 ve C6 kombine formunun A549 hücrelerine sitotoksik etkilerinin belirlenmesi

Kimyasal, biyolojik ve fiziksel faktörler hücreleri farklı derecelerde etkileyerek sitotoksositeye neden olabilir. Bir bileşiğin biyolojik karakteristiğini anlamak için toksik veya toksik olmayan etkilerini belirlemek esastır. In vitro sitotoksosite deneyleri, genellikle olası ilaç adaylarını değerlendirmek veya bazı bileşiklerin sitotoksik profillerini araştırmak için kullanılan hücre kültürü tabanlı ölçüm yöntemleridir. Bu yöntemlerle birçok bileşiği kısa sürede değerlendirmek ve daha sonraki hayvan deneyleri için gerekli temel bilgileri elde etmek mümkündür. Farklı mekanizmalara ve çeşitli hassasiyetlere sahip kolorimetrik, enzimatik, lüminometrik prensiplere vb. dayalı birçok hücre canlılığı belirleme yöntemi mevcuttur. MTT, MTS, XTT, WST, LDH enzim tahlili, alamar mavi tahlili, ATP biyoluminesan sitotoksosite testi türleridir (Orhan ve Abdurrahman., 2017).

Kolorimetrik testler, biyokimyasal markörün ölçülmesi ile hücrelerin metabolik aktivitesini değerlendirmeyi sağlar. Hücre canlılığının spektrofotometre ile kolorimetrik ölçümü, kullanılan reaktifler sonucu hücrelerin canlılığa yanıt olarak renk geliştirmesine dayalıdır. Sitotoksositeyi veya hücre canlılığını değerlendirmek için en sık kullanılan kolorimetrik testlerden biri süksinat dehidrojenaz gibi mitokondriyal enzimlerin aktivitesini, aynı zamanda hücrelerin mitokondriyal fonksiyonunun belirlenmesi yoluyla hücre canlılığını ölçen MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il) -2-5-difeniltetrazolyum bromür) testidir.

İnsan akciğer kanseri hücre hattı olan A549 hücreleri 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına, kuyu başına 5×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. C2 ve C6 kombine formunun 3.13-200 μM konsantrasyon aralığında seri dilüsyon şeklinde kontrol kuyusu hariç her kuyuya ilave edilerek, hücreler 24 saat 37°C 'de ve %5 karbon dioksitli ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklara 20 μL MTT boyası (5mg/mL) ilave edildikten sonra 37°C 'de 2 saat daha inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonucunda plakada bulunan kuyucukların içerisindeki sıvı kısım boşaltılarak canlı hücreler tarafından meydana getirilen formazan tuzlarının çözünebilmesini sağlamak amacıyla 200 μL DMSO eklenmiştir ve HTX-Synergy (Bio-Tek, USA) plaka okuyucusunda 540 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirilmiştir. Madde ile muamele edilmeyen hücre grubu kontrol olarak kabul edilmiştir. Her doz için ayrı ayrı canlılık değerleri kontrol grubuna göre yüzde canlılık hesabı ile hesaplanmıştır.

Elde edilen absorbanans değerleri kullanılarak maddelerin hücreler üzerindeki IC50 konsantrasyonu canlılık eğrisinden hesaplanmıştır. Değerlerin standart sapmaları ve istatistiksel anlamlılık değerlerinin belirlenmesinde GraphPad 6.0 programı kullanılmıştır.

3.2.4. Hücrelerdeki morfolojik değişikliklerin konfokal mikroskopi ile tayini

Konfokal mikroskopun Marvin Minsk tarafından 1950 yılında ilk temelleri atılmıştır. 1970-1990'lı yıllarda teknolojinin gelişmesiyle birlikte konfokal mikroskop da gelişmiştir. Görüntü oluşumunda odak dışı ışığı bloke etmek için, uzamsal bir iğne deliği kullanarak bir mikrografın optik çözünürlüğünü ve kontrastını artırmak için kullanılan optik bir görüntüleme tekniğidir.

Konfokal mikroskopi yöntemi ile C2 ve C6 kombine formunun A549 hücreleri üzerinde neden olabileceği morfolojik değişiklikler incelenmiştir. Bunun için, hücreler 3×10^5 hücre/kuyu yoğunluğunda steril edilmiş lameller üzerine ekilerek uygulanan maddelerin MTT ile belirlenmiş olan IC₅₀ konsantrasyonu uygulanarak 24 saat süre ile 37°C'de ve %5 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda besi yeri uzaklaştırılarak, hücreler fosfat tamponu (PBS)'de yıkanmış ve glutaraldehitte fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrasında tekrar PBS ile yıkandıktan sonra hücreler akridin oranj ve falloidin boyaarı ile boyanarak konfokal mikroskopta (Leica TCS-SP5 II) Leica Confocal Software Version 2.00 yazılımı kullanılarak incelenip görüntülenmiştir.

3.2.5. Geçirimli elektron mikroskobunda C2 ve C6 kombine formunun uygulandığı hücrelerdeki ince yapısal değişikliklerin saptanması

Geçirimli elektron mikroskopu (TEM) görüntüleme ve kırınım tekniklerini birlikte kullanarak malzemelerin mikro yapısal incelemesini ve kristal yapılarının belirlenmesini birlikte sağlayabilen çok özel bir malzeme karakterizasyon cihazıdır. Bir başka deyişle, nanometre mertebesinde çok küçük ve ince alanlardan milyon kat büyütmelerde malzemenin kristalagrojik ve morfolojik bilgilerine aynı anda ulaşılmasına olanak sunan bir tekniktir. TEM, bir elektron demetinin numuneden geçişini görüntüleyen yüksek büyütme ölçüm tekniğidir.

Geçirimli elektron mikroskobunda (TEM) ince yapı değişikliklerini incelemek amacıyla 1×10^6 mL yoğunluğundaki A549 hücreleri her grup için üçer tekrarlı olacak şekilde ekilerek üzerine C2 ve C6 kombine formunun IC₅₀ konsantrasyonu uygulanarak tüm deney gruplarına ait hücreler 24 saat etüv içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon

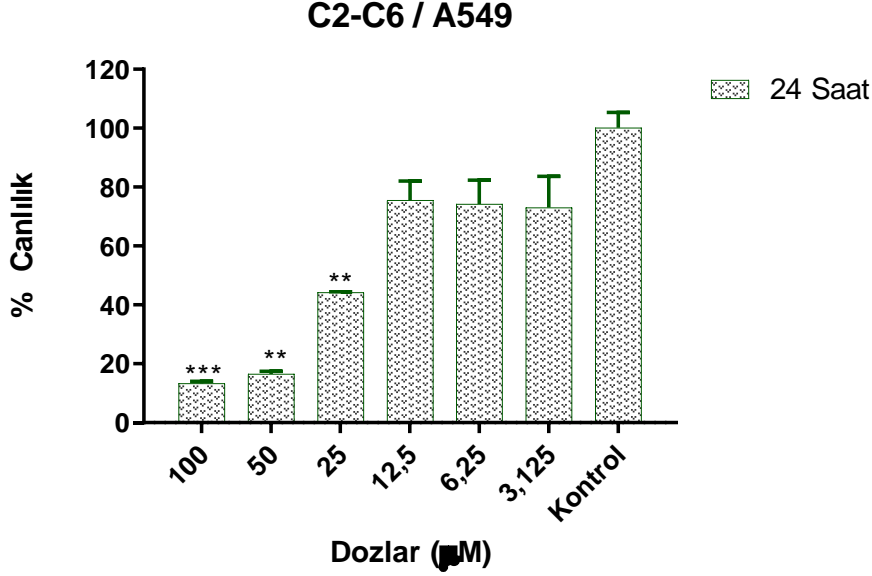
süresi sonunda flasklarda glutaraldehit ile fikse edilen hücreler doku takibine alınarak gece boyu +4°C'de glutaraldehit içinde fikse edilmiştir. Süre sonunda tampon ile yıkamaya tabi tutulan hücreler osmiyum tetraoksit içerisinde ikincil fiksasyon uygulamasına tabi tutulmuştur. Osmiyumun hücrelerden tampon çözeltisinde yıkanmasından sonra etil alkol serisinde (%50, %70, %90, %96 ve absöü etil alkol) dehidrate edilmiştir. Propilen oksit ile şeffaflaştırma sonucunda hücreler resine alıştırılarak yeni hazırlanmış resin ile kalıplara bloklanmıştır. Örnekler 60°C'de etüv içerisinde 48 saat boyunca polimerize edildikten sonra bloklar kesit alınımına hazır duruma getirilmiştir. Hazır hale getirilen bloklar tıraşlanıp 80-100 nm'lik ince kesitleri alınmıştır. Hazırlanan ince kesitler bakır gridlere alınmış, kurşun sitrat ve uranil asetatla boyanarak geçirimli elektron mikroskobunda 120 KV'de (Biotwin FEI, USA) görüntüleme yapılmıştır.

3.2.6. İstatistiksel analiz

Deneylerden elde edilen sonuçlar ortalama \pm standart hata şeklinde belirtilmiştir. GraphPad 6.0 programı kullanılarak verilerin anlamlılıkları belirlenmiştir. Deney gruplarının istatistiksel değerlendirmesi kontrol grubu hücrelerinden elde edilen verilere göre gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MTT Kolorimetrik Test Sonuçları

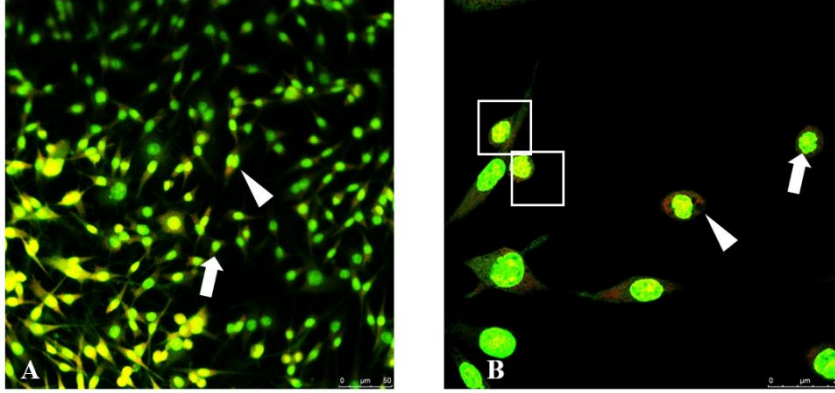


Şekil 4.1: C2-C6 kombin seramidın 24 saat süre ile uygulandığı A549 hücrelerinin MTT sonucunda elde edilen canlılık inhibisyon grafiği. (** >0.001, *** >0.001)

A549 insan akciğer kanseri hücre hattı laboratuvar ortamında kontaminasyonsuz olarak uygun şartlar altında üretilmiş ve tam gelişme göstermiştir. Bu hücre hattı ile MTT deneyleri gerçekleştirilmiştir.

C2-C6 kombine seramid formunun A549 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerini tespit etmek için MTT sitotoksosite testi gerçekleştirilmiştir. Tez amacımız doğrultusunda MTT sitotoksosite testi ile IC_{50} değerleri $19.7 \mu\text{M}$ olarak belirlenmiştir. A549 hücrelerinin canlılığının C2-C6 kombine seramid formunun uygulamasından sonra doza bağlı olarak düştüğü gözlemlenmiştir. Hücelere uygulanan madde konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığının inhibisyona uğradığı tespit edilmiştir.

4.2. C2-C6 Seramid Kombininin Uygulandığı A549 Hücrelerindeki Morfolojik Değişikliklerin Konfokal Mikroskopi Bulguları ve Değerlendirilmesi



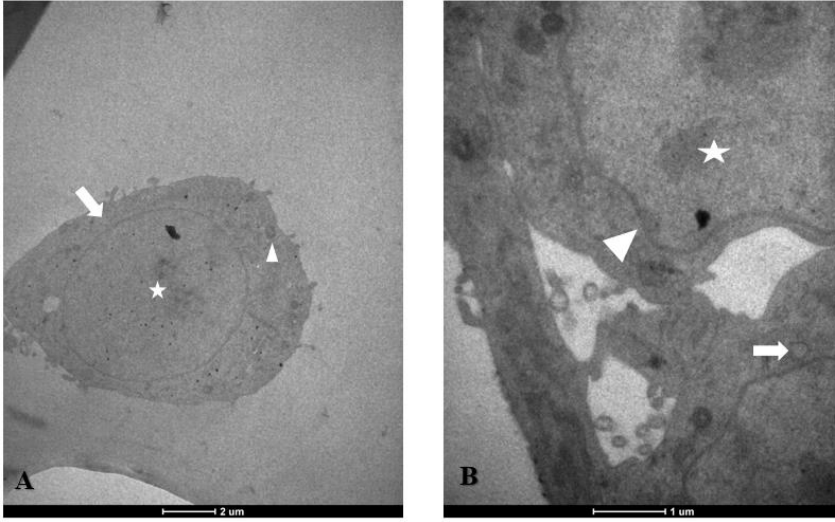
Şekil 4.2: C2-C6 seramid kombininin 24 saat süre ile uygulandığı A549 hücrelerinin konfokal mikroskopi sonuçları. A: kontrol grubu: Ok hücre çekirdeği. Ok başı hücre iskeleti B: Deney Grubu: Kare-buzulmuş ve yuvarlaklaşmış hücreler, ok- kondanze kromatin, ok başı- hücre iskeletinde delik oluşumu

A549 kontrol hücrelerine gerçekleştirilen ikili boyama sonucunda elde edilen konfokal mikroskobik görüntülerde hücre morfolojisinin değişmemiş olduğu, çekirdeğin, hücre membranının ve iskeletinin bütün olarak durduğu saptanmıştır. A549 kontrol hücrelerine ait konfokal mikroskop görüntüsü Şekil 4.2’de yer almaktadır.

C2 ve C6 seramid kombini uygulanan A549 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntülerinde büzölmüş ve yuvarlaklaşmış hücreler, kondanze kromatin, hücre iskeletinde delik oluşumu meydana geldiği görülmektedir (Şekil 4.2). Ayrıca hücrelerin büzüştüğü ve yuvarlaklaşmaların meydana geldiği saptanmıştır. Bu değişikliklerin apoptotik hücre ölümünün ince yapısal değişiklikleri olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

4.3. Geçirimli Elektron Mikroskopunda C2-C6 Seramid Kombininin Uygulandığı Hücrelerdeki İnce Yapısal Bulguların Değerlendirilmesi

C₂-C₆ seramid kombininin uygulanan A549 hücrelerinin ince yapısında boşalmış mitokondriler, çekirdek zarında undulasyon ve kromatin kondanzasyonu hücrelerinin ince yapısı üzerinde sitotoksitesine işaret etmektedir ve konfokal mikroskop bulgularıyla uyumluluk göstererek apoptotik belirteçler olarak değerlendirilebilecek sonuçlar teşkil etmektedirler.



Şekil 4.3: C2-C6 seramid kombinininin 24 saat süre ile uygulandığı A549 hücrelerinin TEM mikroskopi sonuçları. A: kontrol grubu: Yıldız- hücre çekirdeği, ok başı- mitokondri, ok- hücre zarı B: Deney Grubu: Ok-içi boşalmış mitokondri, Ok başı-çekirdek zarında undulasyon, Yıldız- kromatin kondanzasyonu

Elde edilen sonuçlara kapsamında C2 ve C6 seramidlerinin kombin formunun akciğer kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu ve hücrelerde meydana gelen hücre içi deformasyonlar gibi apoptotik bulgular tespit edilmiştir. Daha kapsamlı *in vivo* ve *in vitro* araştırmalar neticesinde akciğer kanseri tedavileri için terapötik bir ajan olarak bu moleküllerin kombin formu düşünülmektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer kanseri erken aşamada tespit edilmesi zor olan bir hastalıktır. Son yıllarda, akciğer kanseri için tedavi stratejileri cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi ile sınırlı kalmıştır. Kanserli hücrelerde çoğalmayı ve büyümeyi baskılayıp apoptozu uyaran seramid düzeyinin çeşitli ilaçlarla artırılmasının, kanser tedavilerinde etkili bir yöntem olabileceği akla gelmektedir. Son yapılan çalışmalarda açıkça görülmektedir ki, seramid, kanser tedavisinde kullanılan radyasyon ve kemoterapi sonucu ortaya çıkan apoptoz etkisine aracılık ederek aynı zamanda kansere karşı koruyucu etkileri bilinen ilaçların da (kurkumin, resveratrol, non-steroid, anti-inflamatör ilaçlar vb.) etkisini düzenlemektedirler. Bu ilaçların tedavi etkileri sırasında kanserli hücrelerde seramid miktarını artırarak hücrelerde programlanmış hücre ölümü olan apoptozu yol açtıkları bildirilmiştir. Seramidin tümör hücresi ilaç yanıtlarındaki rolünün daha iyi anlaşılması, yeni yerleşik kemoterapötik ajanlar için yeni stratejilerin geliştirilmesini kolaylaştırabilir. Sfingolipidlerin biyolojik (organel) zarları içindeki hızlı metabolik karşılıklı dönüşümleri ve sinyal rolleri, seramidlerin apoptozun düzenlenmesinde hayatta kalmaya karşı olan rollerini tanımlamak için biyokimyasal ve biyofiziksel zorluklar sunar (Menuz, vd., 2009; Mesicek, vd., 2010).

Sfingolipid metabolizmasının enzimlerinin protein-protein veya lipid-protein etkileşimleri tarafından nasıl düzenlendiğini belirlemek için gelecekteki çalışmalara ihtiyaç vardır. Bunun için, sfingolipid metabolizmasının enzimlerine veya biyoaktif sfingolipidlerine karşı daha yüksek seçiciliğe ve özgüllüğe sahip antikolar dahil olmak üzere ek moleküler ve analitik araçlar geliştirilmelidir. Genel olarak, sfingolipidlerinin kanser hücresi sinyalini ve metabolizmasını kontrol ettiği mekanizmaların daha iyi anlaşılması, gelecekteki antikanser tedavisinin iyileştirilmesine yardımcı olacaktır (Öğretmen., 2017). Pubmed verilerinde farklı deneylerle sfingolipidlerin kanser hücresi üzerindeki etkisinin anlaşılması için yapılan bir çok çalışmalar mevcuttur.

Bizim çalışmamızda A549 akciğer kanseri hücre hattında MTT sitotoksosite deneyi yapılmıştır. Bu hücre hattı laboratuvar ortamında kontaminasyonsuz olarak uygun şartlar altında üretilmiş ve tam gelişme gösteren hücreler ile MTT deneyleri gerçekleştirilmiştir. MTT testi sonucu C2 ve C6 kombine formunun IC₅₀ değeri 19,7 µM (C₂=22 µM, C₆=50 µM) olarak bulunmuştur. Elde edilen IC₅₀ konsantrasyonu diğer deney aşamalarında A549 hücrelerine C2 ve C6 seramidinin uygulamasından sonra meydana gelen ölüm şekillerini belirlemek için gerçekleştirilen deneylerde

kullanılmıştır. Hücre çoğalmasında baskılayıcı etkiler konfokal ve TEM mikroskoplarında detaylı incelenmiştir.

Seramid odaklı hedefe yönelik tedavi yöntemlerinde temel amaçlardan biri hücre içinde seramid düzeyini azaltan yolakların baskılanması, seramid düzeyini ve sentezini arttıran yolakların uyarılması olmalıdır. Seramid baskılayıcı maddelerin hücrelerde seramid toplanması artırılarak, kanserli hücrelerde antimitotik etki gösterdiği saptanmış olduğundan, tez kapsamında akciğer kanseri üzerindeki olası etkilerini *in vitro* ortamda çalışılmıştır.

Araştırmalar sonucunda, literatürde ilk kez C2 ve C6 kombin seramidin A549 insan akciğer kanseri hücre hattındaki sitotoksik etkileri belirlenmiş ve C2 ve C6 seramidlerinin kombin formunun etkisiyle akciğer kanseri hücrelerinde meydana gelen hücre içi deformasyonlar gibi apoptotik bulgular tespit edilmiştir. Çalışmamızın sonucu olarak hücrelerde apoptozisi gösteren morfolojik ve ince yapısal değişiklikler saptanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçların akciğer kanserinde C2 ve C6 kombine formunun alternatif bir tedavi çeşiti olarak kullanılmasına yönelik ileriye dönük başka çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz. Daha kapsamlı *in vivo* ve *in vitro* araştırmalar neticesinde akciğer kanseri tedavileri için terapötik bir ajan olarak bu moleküllerin kombin formu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Antonella Cheșcă, Simona Marcu, Mariana Tilinca (2010) Essentials in Cell Biology and General Histology - for faculties of medicine and healthcare. “Transilvania” University of Brașov Publishing House CNCSIS 1-350 recognized publishing house.
- Antonella Cheșcă, Melek Öztürk (2011) Methods for Cellular and Molecular Diagnostics in Human Pathology, Istanbul University Press House 1- 156. *Introductory Notions and general Data of Cellular and Molecular Biology*, Antonella Cheșcă, Faculty of Medicine “Transilvania” University of Brasov Romania 1-12.
- Arcila M.E., Drilon A., Sylvester B.E., Lovly C.M., Borsu L., Reva B., Kris M.G., Solit D.B., Ladanyi M. (2015) *Clin. Cancer Res.*, 21, 1935-1943.
- Arora, M.; Moser, J.; Phadke, H.; Basha, A.A.; Spencer, S.L. Endogenous Replication Stress in Mother Cells Leads to Quiescence of Daughter Cells. *Cell Rep.* 2017, 19, 1351–1364. [CrossRef]
- Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–8.
- Asamura H, Goya T, Koshiishi Y et al (2008) A Japanese Lung Cancer Registry study: prognosis of 13,010 resected lung cancers. *J Thorac Oncol* 3:46–52
- Barr, A.R.; Cooper, S.; Heldt, F.S.; Butera, F.; Stoy, H.; Mansfeld, J.; Novak, B.; Bakal, C. DNA damage during S-phase mediates the proliferation-quiescence decision in the subsequent G1 via p21 expression. *Nat. Commun.* 2017, 8, 14728. [CrossRef]
- Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global epidemiology of lung cancer. *Ann Glob Health* 2019; 85: 9.
- Beckham TH, Cheng JC, Marrison ST, Norris JS, Liu X. Interdiction of Sphingolipid Metabolism to Improve Standard Cancer Therapies. *Adv Cancer Res* 2015. 1–36. doi: 10.1016/B978-0-12-394274-6.00001-7

- Bergethon K, Shaw AT, Ou SH, Katayama R, Lovly CM, McDonald NT, et al. ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol.* 2012;30:863–70.
- Bergers, G., Benjamin, L.E., 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3 (6), 401–410.
- Besim Ogretmen. Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. 2017
- Bieberich E (2008) Ceramide signaling in cancer and stem cells. *Future Lipidol* 3, 273–300.
- Bieberich E, Hu B, Silva J, MacKinnon S, Yu RK, Fillmore H, et al. Synthesis and characterization of novel ceramide analogs for induction of apoptosis in human cancer cells. *Cancer Lett* 2002; 181:55-64.
- Bieberich E, Kawaguchi T, Yu RK. N-acylated serinol is a novel ceramide mimic inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2000; 275:177-81.
- Blom, T. et al. LAPT4B facilitates late endosomal ceramide export to control cell death pathways. *Nat. Chem. Biol.* 11, 799–806 (2015).
- Bortner, C. D., Oldenburg, N. B., and Cidlowski, J. A. (1995). The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 5, 21–6.
- Bradley J. et al. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2004. V. 59. P. 78
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018; 68: 394-424.
- Buttitta F., Barassi F., Fresu G., Felicioni L., Chella A., Paolizzi D., Lattanzio G., Salvatore S., Campese PP, Rosini S., Iarussi T., Mucilli F., Sacco R., Mezzetti A., Marchetti A. (2006) *Int. J. Cancer.*, 119, 2586-2591.
- Cappell, S.D.; Chung, M.; Jaimovich, A.; Spencer, S.L.; Meyer, T. Irreversible APC(Cdh1) Inactivation Underlies the Point of No Return for Cell-Cycle Entry. *Cell* 2016, 166, 167–180. [CrossRef] [PubMed]

- Cardarella S., Ogino A., Nishino M., Butaney M., Shen J., Lydon C., Yeap B.Y., Sholl L.M., Johnson B.E., Jänne P.A. (2013) *Klinik. Cancer Res.*, 19, 4532-4540.
- Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., Garcia, I., and Browning, J. L. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *J Biol Chem* 272, 32401–10.
- Chinnaiyan, A. M. (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia* 1,5–15.
- Connolly PF, Jäger R, Fearnhead HO. 2014. New roles for old enzymes: killer caspases as the engine of cell behavior changes. *Front Physiol* 5: 149. doi:10.3389/fphys.2014.00149
- Crawford ED, Wells JA. 2011. Caspase substrates and cellular remodeling. *Annu Rev Biochem* 80: 1055–1087. doi:10.1146/annurev-biochem-061809-121639
- Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T. (1999) Cellular pathology I: cell injury and cell death. In: Robbins Pathologic Basis of Disease (R. S. Cortan, V. Kumar and T. Collins, eds.), Sixth edition, pp. 1–29. W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA.
- Chow WH, Blot WJ, Vaughan TL et al (1998) Body mass index and risk of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia. *J Natl Cancer Inst* 90:150–155
- Cook MB, Kamangar F, Whitman DC et al (2010) Cigarette smoking and adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction: a pooled analysis from the international BEACON consortium. *J Natl Cancer Inst* 102:1344–1353
- Crawford KW, Bittman R, Chun J, Byun HS, Bowen WD. Novel ceramide analogues display selective cytotoxicity in drug resistant breast tumor cell lines compared to normal breast epithelial cells. *Cell Mol Biol* 2003;49:1017-23.
- Dahm F, Bielawska A, Nocito A, Georgiev P, Szulc ZM, Bielawski J, et al. Mitochondrially targeted ceramide LCL-30 inhibits colorectal cancer in mice. *Br J Cancer* 2008; 98:98-105.
- Daigh, L.H.; Liu, C.; Chung, M.; Cimprich, K.A.; Meyer, T. Stochastic Endogenous Replication Stress Causes ATR-Triggered
- Dandona, M., Linehan, D., Hawkins, W., et al., *Pancreas*, 2011.

- Damien Bertheloot, Eicke Latz and Bernardo S. Franklin. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cellular & Molecular Immunology* (2021) 18:1106–1121
- Devalapally H, Duan Z, Seiden MV, Amiji MM. Modulation of drug resistance in ovarian adenocarcinoma by enhancing intracellular ceramide using tamoxifen-loaded biodegradable polymeric nanoparticles. *Clin Cancer Res* 2008; 14:3193-203
- Dindo D, Dahm F, Szulc Z, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA, et al. Cationic long-chain ceramide LCL-30 induces cell death by mitochondrial targeting in SW403 cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5:1520-9.
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D. A., Mardis, E. R., McLellan, M. D., Cibulskis, K.,... Wilson, R. K. “Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma.”, *Nature*, 455(7216): 1069–1075 (2008)
- Dillon, C. P. et al. RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase-8 and RIPK3. *Cell* 157, 1189–1202 (2014).
- Doll R. Evolution of knowledge of the smoking epidemic. *Tob Sci Policy Public Heal* 2010. doi:10.1093/acprof:oso/9780199566655.003.0001.
- Doll, R. and Peto, R., *Prichiny raka (The Causes of Cancer)*, Kiev: Naukova Dumka, 1984.
- Dong J, Li B, Lin D, Zhou Q, Huang D. Advances in targeted therapy and immunotherapy for non-small cell lung cancer based on accurate molecular typing. *Front Pharmacol.* 2019;10:230.
- Dong, P.; Zhang, C.; Parker, B.T.; You, L.; Mathey-Prevot, B. Cyclin D/CDK4/6 activity controls G1 length in mammalian cells. *PLoS ONE* 2018, 13, e0185637. [CrossRef] [PubMed]
- Duan, R. D. 2005. Anticancer compounds and sphingolipid metabolism in the colon. *In vivo*, 19: 293-300.
- Dyba et al. / *European Journal of Cancer* 157 (2021) 308-347
- Eckholm, E., *Okruzhayushchaya sreda izdorov'ye cheloveka (Environment and Human Health)*, Moscow: Progress, 1980.

- Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* 2007, 35, 495–516. [CrossRef]
- Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL et al (2017) Non-Small Cell Lung Cancer, Version 5.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 15:504–535
- Fan, H.C.; Chi, C.S.; Chang, Y.K.; Tung, M.C.; Lin, S.Z.; Harn, H.J. The Molecular Mechanisms of Plant-Derived Compounds Targeting Brain Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 395. [CrossRef]
- Ferlay J., Shin H.R., Bray F. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 // *Int. J. Cancer.* – 2010. – Vol. 15. – P. 2893-2917.
- Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (1999). More than one way to die : apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18, 7719–30.
- Fillet M, Van Heugen JC, Servais AC, De Graeve J, Crommen J. Separation, identification and quantification of ceramides in human cancer cells by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2002;949:225–33.
- Fluctuations in CDK2 Activity that Dynamically Adjust Global DNA Synthesis Rates. *Cell Syst.* 2018, 7, 17–27.e13. [CrossRef]
- Fox TE, Finnegan CM, Blumenthal R, Kester M. The clinical potential of sphingolipid- based therapeutics. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1017–1023. [PubMed: 16568241]
- Futerman AH, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep* 2004;5:777–782. [PubMed: 15289826]
- Fyrst H, Saba JD. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat Chem Biol* 6:489-97.
- Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., Bratton, D. L., Oldenborg, P. A., Michalak, M., and Henson, P. M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123, 321–34.
- Gehr P. Respiratory tract structure and function. *Journal of Toxicology and Environmental Health.* 1984;13(2–3):235–49.

- Ginsberg, R. J., Vokes, E. E., Rosenzweig, K., Non-small Cell Lung Cancer. DeVita, V. T., Jr., Hellman, S., Rosenberg, S. A., (Eds.), *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Ed. 6, Lippincott Williams and Wilkins, *Philadelphia* 2001, pp. 917– 983.
- Gouaze-Andersson V, Yu JY, Kreitenberg AJ, Bielawska A, Giuliano AE, Cabot MC. Ceramide and glucosylceramide upregulate expression of the multidrug resistance gene MDR1 in cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:1407–1417. [PubMed: 18035065]
- Gousias, K; Theocharous, T; Simon,M. Mechanisms of Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Glioblastoma. *Biomedicines* 2022, 10,564.
- Govindan R., Sayfa N., Morgensztern D., Read W., Tierney R., Vlahiotis A., Spitznagel E.L., Piccirillo J. (2006) *J. Clin. Oncol.*, 24, 4539-4544.
- Gu X, Song X, Dong Y, Walters E, Zhang R, Pang X, et al. Vitamin E succinate induces ceramide-mediated apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2008; 14:1840-8.
- Gupta N.C. et al. // *Chest*. 2002. V. 122. P. 1918.
- Hahn, A.T.; Jones, J.T.; Meyer, T. Quantitative analysis of cell cycle phase durations and PC12 differentiation using fluorescent biosensors. *Cell Cycle* 2009, 8, 1044–1052. [CrossRef]
- Hall JE, Respiration. Guyton and Hall *Textbook of Medical Physiology*.12th ed. Saunders Elsevier, 2011;7:465-507.
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646e74.
- Hannun YA,Obeid LM.Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018;19(3):175–91.
- Hannun, Y. A. & Bell, R. M. Lysosphingolipids inhibit protein kinase C: implications for the sphingolipidoses. *Science* 235, 670–674 (1987).
- Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 139–150 (2008).

- Han-Lin Chou, Yi-Hsiung Lin, Wangta Liu, Chang-Yi Wu, Ruei-Nian Li, Hurng-Wern Huang, Chi-Hsien Chou, Shean-Jaw Chiou and Chien-Chih Chiu. Combination Therapy of Chloroquine and C2-Ceramide Enhances Cytotoxicity in Lung Cancer H460 and H1299 Cells. 2019.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770–6.
- Hill, M. M., Adrain, C., Duriez, P. J., Creagh, E. M., and Martin, S. J. (2004). Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J* 23, 2134–45.
- Hitoshi, Y., Lorens, J., Kitada, S. I., Fisher, J., LaBarge, M., Ring, H. Z., Francke, U., Reed, J. C., Kinoshita, S., and Nolan, G. P. (1998). Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity* 8, 461–71.
- Howlader NNA, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/, based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site,. April 2017
- Howlander N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review 1975–2016. *National Cancer Institute*, 2019.
- Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495–504.
- Hu, S., Snipas, S. J., Vincenz, C., Salvesen, G., and Dixit, V. M. (1998). Caspase- 14 is a novel developmentally regulated protease. *J Biol Chem* 273, 29648– 53.
- Igney, F. H., and Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer* 2, 277–88.
- I-Ling Lin, Han-Lin Chou, Jin-Ching Lee, Feng-Wei Chen, Yao Fong, Wei-Chiao Chang, Hurng Wern Huang, Chang-Yi Wu, Wen-Tsan Chang, Hui-Min David Wang and Chien-Chih Chiu. The antiproliferative effect of C2-ceramide on lung cancer cells through apoptosis by inhibiting Akt and NFκB. 2014, *Cancer Cell International* 14:1.
- Ishchenko B.I. Radiation diagnostics for thoracic surgeons. SPb., 2001.

- Jackman, D.M.; Johnson, B.E. Small-cell lung cancer. *Lancet* 2005, 366, 1385–1396. [CrossRef]
- Jayadev S, Liu B, Bielawska AE, Lee JY, Nazaire F, Pushkareva MYu, Obeid LM, Hannun YA. Role for ceramide in cell cycle arrest. *J Biol Chem* 1995;270:2047–52.
- Ju Y.S., Lee W.C., Shin J.Y., Lee S., Bleazard T., Won J.K., Kim Y.T., Kim J.I., Kang J.H., Seo J.S. (2012) *Genome Res.*, 22, 436-445.
- Kang, S. J., Wang, S., Kuida, K., and Yuan, J. (2002). Distinct downstream pathways of caspase-11 in regulating apoptosis and cytokine maturation during septic shock response. *Cell Death Differ* 9, 1115–25.
- Kanwal M, Ding XJ, Cao Y. Familial risk for lung cancer. *Oncol Lett* 2017; 13: 535-542.
- Kaiser,W. J. et al. RIP1 suppresses innate immune necrotic as well as apoptotic cell death during mammalian parturition. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 111,7753–7758 (2014).
- Kester M, Heakal Y, Fox T, Sharma A, Robertson GP, Morgan TT, et al. Calcium phosphate nanocomposite particles for in vitro imaging and encapsulated chemo- therapeutic drug delivery to cancer cells. *Nano Lett* 2008; 8:4116-21.
- King, K. L., and Cidlowski, J. A. (1998). Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 60, 601–17.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)- associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579–88.
- Koenig, U., Eckhart, L., and Tschachler, E. (2001). Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 1150–4.
- Koivunen J.P., Mermel C., Zejnullahu K., Murphy C., Lifshits E., Holmes A.J., Choi H.G., Kim J., Chiang D., Thomas R. ve diğerleri. (2008) *Klin. Cancer Res.*, 14, 4275-4283.
- Kok JW, Sietsma H. Sphingolipid metabolism enzymes as targets for anticancer therapy. *Curr Drug Targets* 2004;5:375–382. [PubMed: 15134220]

- Kraveka, J. M. et al. Involvement of dihydroceramide desaturase in cell cycle progression in human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 282, 16718–16728 (2007).
- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., and Kobayashi, Y. (2003). Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 171, 4672–9.
- Kusmardi, Kusmardi, Elvan Wiyarta, Ari Estuningtyas, Nurhuda Sahar, Yurnadi Hanafi Midoen, and Aryo Tedjo. 2021. “Potential of Phaleria macrocarpa Leaves Ethanol Extract to Upregulate the Expression of Caspase-3 in Mouse Distal Colon after Dextran Sodium Sulphate Induction.” *Pharmacognosy Journal* 13: 23-29.
- Kwon, J.S.; Everetts, N.J.; Wang, X.; Wang, W.; Della Croce, K.; Xing, J.; Yao, G. Controlling Depth of Cellular Quiescence by an Rb-E2F Network Switch. *Cell Rep.* 2017, 20, 3223–3235. [CrossRef]
- L. A. Radkevich, Academician L. A. Piruzyan, I. S. Nikolaeva, A. S. Kabankin, A. V. Sintsov, K. S. Gulazizova, and D. A., *Cancer and Environmental Factors*. 2012 pp 1-6.
- Lahalle, A.; Lacroix, M.; De Blasio, C.; Cisse, M.Y.; Linares, L.K.; Le Cam, L. The p53 Pathway and Metabolism: The Tree That Hides the Forest. *Cancers* 2021, 13, 133. [CrossRef]
- Lam S. // *Curr. Opin. Pulm. Med.* 1996. V. 2. P. 271.
- Landi MT, Chatterjee N, Yu K, et al. A Genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 679-691.
- Lagergren J, Bergstrom R, Nyren O (1999) Association between body mass and adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Ann Intern Med* 130:883–890
- Lee, H. et al. Mitochondrial ceramide-rich macrodomains functionalize Bax upon irradiation. *PLoS ONE* 6, e19783 (2011).
- Leong WI, Saba JD. S1P metabolism in cancer and other pathological conditions. *Biochimie* 2010; 92:716-23.
- Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331 (1997).

- Lindeman NI, Cagle PT, Aisner DL, Arcila ME, Beasley MB, Bernicker EH, et al. Updated molecular testing guideline for the selection of lung cancer patients for treatment with targeted tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, the International Association for the Study of Lung Cancer, and the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn.* 2018;20:129–59.
- Lindsay K. Ryland, Todd E. Fox, Xin Liu, Thomas P. Loughran & Mark Kester (2011) Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer, *Cancer Biology & Therapy*, 11:2, 138-149, DOI: 10.4161/cbt.11.2.14624
- Lissowska J, Foretova L, Dąbek J, et al. Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control* 2010; 21: 1091-1104.
- Liu X, Ryland L, Yang J, Liao A, Aliaga C, Watts R, et al. Targeting of survivin by nanoliposomal ceramide induces complete remission in a rat model of NK-LGL leukemia. *Blood* 2010; 116:4192-201.
- Lu, Ying, and Guo-Qiang Chen. 2011. "Effector Caspases and Leukemia." *International Journal of Cell Biology* 2011: 738301. <https://doi.org/10.1155/2011/738301>. <https://doi.org/10.1155/2011/738301>.
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487– 501.
- Lynch T.J., Bell D.W., Sordella R., Gurubhagavatula S., Okimoto R.A., Brannigan B.W., Harris P.L., Haserlat S.M., Supko J.G., Haluska F.G., Louis D.N., Christiani D.C., Settleman J., D.C., Settleman J., D. (2004) N. *Engl. J. Med.*, 350, 2129-2139.
- Mario Leonardo Squadrito, Michele De Palma. Macrophage regulation of tumor angiogenesis: Implications for cancer therapy. *Molecular Aspects of Medicine* 32 (2011) 123–145.
- Menuz, V. et al. Protection of *C. elegans* from anoxia by HYL-2 ceramide synthase. *Science* 324, 381–384 (2009).
- Mesicek, J. et al. Ceramide synthases 2, 5, and 6 confer distinct roles in radiation-induced apoptosis in HeLa cells. *Cell Signal* 22, 1300–1307 (2010).

- McIlwain, D. R., T. Berger, and T. W. Mak. 2013. "Caspase functions in cell death and disease." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5 (4): a008656.
- Miles, X.; Vandevorde, C.; Hunter, A.; Bolcaen, J. MDM2/X Inhibitors as Radiosensitizers for Glioblastoma Targeted Therapy. *Front. Oncol.* 2021, 11, 703442. [CrossRef]
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H. G., Lin, H. K., Liebermann, D. A., Hoffman, B., and Reed, J. C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799–805.
- Miyoshi, H.; et al. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* 2008, 132, 487–498. [CrossRef] [PubMed]
- Modrak DE, Gold DV, Goldenberg DM. Sphingolipid targets in cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2006;5:200–208. [PubMed: 16505092]
- Morad SA & Cabot MC (2013) Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 13, 51–65.
- Muzio, M. et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817–827 (1996).
- Nachmias, B.; Schimmer, A.D. Targeting nuclear import and export in hematological malignancies. *Leukemia* 2020, 34, 2875–2886.[CrossRef] [PubMed]
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403, 98–103.
- Nava VE, Hobson JP, Murthy S, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinase type 1 promotes estrogen- dependent tumorigenesis of breast cancer MCF-7 cells. *Exp Cell Res* 2002; 281:115-27.
- Nemes, Z., Jr., Friis, R. R., Aeschlimann, D., Saurer, S., Paulsson, M., and Fesus, L. (1996). Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue. *Eur J Cell Biol* 70, 125–33.
- Newton, K. et al. RIPK1 inhibits ZBP1-driven necroptosis during development. *Nature* 540, 129–133 (2016).

- Nijhawan, D., Honarpour, N., and Wang, X. (2000). Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci* 23, 73–87
- Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:604-16.
- Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 2004;4:604–616. [PubMed: 15286740]
- Oh JE, So KS, Lim SJ, Kim MY. Induction of apoptotic cell death by a ceramide analog in PC-3 prostate cancer cells. *Arch Pharm Res* 2006; 29:1140-6.
- Okamoto H. et al. // Chest. 2002. V. 121. P. 1498.
- Orhan T., Abdurrahman A. In Vitro Sitotoksikite Testleri. Harran Üniv Vet Fak Derg Derleme, 2017; 6 (1): 112-118
- Oskouian B, Sooriyakumaran P, Borowsky AD, Crans A, Dillard-Telm L, Tam YY, Bandhuvula P, Saba JD. Sphingosine-1-phosphate lyase potentiates apoptosis via p53- and p38-dependent pathways and is down-regulated in colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:17384–17389. [PubMed: 17090686]
- Oskouian, B. and Saba, J.D., 2010, Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism, *Adj Exp Med Biol*, 688, 185-205.
- Pack, L.R.; Daigh, L.H.; Meyer, T. Putting the brakes on the cell cycle: Mechanisms of cellular growth arrest. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2019, 60, 106–113. [CrossRef]
- Paliogiannis P, Attene F, Cossu A, Defraia E, Porcu G, Carta A, et al. Impact of tissue type and content of neoplastic cells of samples on the quality of epidermal growth factor receptor mutation analysis among patients with lung adenocarcinoma. *Mol Med Rep.* 2015;12:187–91.
- Palomba G, Doneddu V, Cossu A, Paliogiannis P, Manca A, Casula M, et al. Prognostic impact of KRAS, NRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal carcinomas: a population-based study. *J Transl Med.* 2016;14:292.
- Perry DK, Carton J, Shah AK, Meredith F, Uhlinger DJ, Hannun YA. Serine Palmitoyltransferase Regulates De Novo Ceramide Generation During Etoposide-Induced Apoptosis. *J Biol Chem* (2000) 275:9078–84. doi: 10.1074/jbc.275.12.9078

- Perry DK, Hannun YA. The role of ceramide in cell signaling. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1436:233-43.
- Pesch B, Kendzia B, Gustavsson P, et al. Cigarette smoking and lung cancer – relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case – control studies. *Int J Cancer* 2012; 131: 1210-1219.
- Peter, M. E., and Krammer, P. H. (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 10, 545–51.
- Petitjean, A., Achatz, M. I., Borresen-Dale, A. L., Hainaut, P. & Olivier, M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 26, 2157–2165 (2007).
- Pewzner-Jung, Y., Ben-Dor, S. & Futerman, A. H. When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *J. Biol. Chem.* 281, 25001–25005 (2006).
- P.Nenclares,K.J.Harrington. The biology of cancer. Medicine (Elsevier),2020. 10.1016/j.mpmed.2019.11.001
- Pietenpol, J. A., and Stewart, Z. A. (2002). Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology* 181–182, 475–81.
- Pira E. et al. // *Cancer*. 2005. V. 92. No 3. P. 580.
- Reed C.E. et al. // *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2003. V. 126.P. 1943.
- Renehan, A. G., Booth, C., and Potten, C. S. (2001). What is apoptosis, and why is it important? *Bmj* 322, 1536–8.
- Reynolds CP, Maurer BJ, Kolesnick RN. Ceramide synthesis and metabolism as a target for cancer therapy. *Cancer Lett* 2004;206:169–180. [PubMed: 15013522]
- Rebecca SY Wong. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Wong Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2011, 30:87
- Riley, T., Sontag, E., Chen, P. & Levine, A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 402–412 (2008).

- Rikova K., Guo A., Zeng Q., Possemato A., Yu J., Haack H., Nardone J., Lee K., Reeves C., Li Y. ve diğeri. (2007) *Celi.*, 131, 1190-1203.
- Rombaut, R., Dewettinck, K., 2006. Properties, analysis and purification of milk polar lipids. *International Dairy Journal* 16: 1362-1373.
- Rosenwald, A., Climent, J., Martinez, J. I., Schilhabel, M., Karran, E. L., Gesk, S., Esteller, M., deLeeuw, R., Staudt, L. M., Fernandez-Luna, J. L., Pinkel, D., Dyer, M. J., and Martinez-Climent, J. A. (2005). Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood* 106, 3214–22.
- Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., Rusch V.W. // *J. Clin. Oncol.* 2005. V. 23. No33. P. 8283.
- Saddoughi SA, Song P, Ogretmen B. Roles of bioactive sphingolipids in cancer biology and therapeutics. *Subcell Biochem* 2008; 49:413-40.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gorp, M., van Loo, G., and Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* 23, 2861–74
- Sakaue-Sawano, A.; Kurokawa, H.; Morimura, T.; Hanyu, A.; Hama, H.; Osawa, H.; Kashiwagi, S.; Fukami, K.; Miyata, T.; Schmelz, E. M., 2004. Sphingolipids in the chemoprevention of colon cancer. *Frontiers in Bioscience* 9: 2632-2639.
- Schmelz, E. M., Crall, K. J., Larocque, R., Dillehay, D. L., ve Merrill, A.H. 1994. Uptake and metabolism of sphingolipids in isolated intestinal loops of mice. *Journal of Nutrition* 124: 702-712.
- Schmelz, E. M., Sullards, M. C., Dillehay, D. L., ve Merrill, A. H. 2000. Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1,2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice. *Journal of Nutrition* 130: 522-527.
- Schmelz, E.M., Dillehay, D.L., Webb, S.K., Reiter, A., Adams, J., Merrill, A.H. JR., 1996. Sphingomyelin consumption suppresses aberrant colonic crypt foci and increases the proportion of adenomas versus adenocarcinomas in CF1 mice treated with 1,2-dimethylhydrazine: implications for dietary sphingolipids and colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 56: 4936-4941.

- Sedykh S.A. and others // Ros. oncol. magazine 2007. No 1. C. 4.
- Sedykh S.A., Kashutina E.I. Analysis of the results of CT, radiography, bronchoscopy in the diagnosis of central lung cancer. *Differential diagnosis and treatment of RL. Perm*, 2004, pp. 59–62.
- Segui B, Andrieu-Abadie N, Jaffrezou JP, Benoist H, Levade T. Sphingolipids as modulators of cancer cell death: potential therapeutic targets. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758:2104-20.
- Senkal CE, Ponnusamy S, Rossi MJ, Sundararaj K, Szulc Z, Bielawski J, et al. Potent antitumor activity of a novel cationic pyridinium-ceramide alone or in combination with gemcitabine against human head and neck squamous cell carcinomas in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 317:1188-99.
- Shabbits JA, Mayer LD. High ceramide content liposomes with in vivo antitumor activity. *Anticancer Res* 2003; 23:3663-9.
- Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crinó L, Ahn MJ, et al. Crizotinib versus chemotherapy in advanced ALK-positive lung cancer. *N Engl J Med*. 2013;368:2385–94.
- Shaw J, Costa-Pinheiro P, Patterson L, Drews K, Spiegel S, Kester M. Novel Sphingolipid-Based Cancer Therapeutics in the Personalized Medicine Era. *Adv Cancer Res* (2018) 140:327–66. doi: 10.1016/bs.acr.2018.04.016
- Shimizu K. et al. // *Cancer*. 2006. V. 51. No 2. P. 173
- Siewert JR, Stein HJ, Feith M et al (2001) Histologic tumor type is an independent prognostic parameter in esophageal cancer: lessons from more than 1,000 consecutive resections at a single center in the Western world. *Ann Surg* 234:360–367 (**Discussion 368-369**)
- Silvestri G.A. et al. // *Chest*. 2003. V. 123. No 1. Suppl. P. 147S.
- Sini MC, Doneddu V, Paliogiannis P, Casula M, Colombino M, Manca A, et al. Genetic alterations in main candidate genes during melanoma progression. *Oncotarget*. 2018;9:8531–4
- Siskind, L. J. et al. Anti-apoptotic Bcl-2 family proteins disassemble ceramide channels. *J. Biol. Chem.* 283, 6622–6630 (2008).

- Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276, 7320–6.
- Sokolov V.V. Modern possibilities of endoscopy in oncology. Oncology at the turn of the XXI century // Proceedings of the international scientific forum. M., 1999. C. 361.
- Spencer, S.L.; Cappell, S.D.; Tsai, F.C.; Overton, K.W.; Wang, C.L.; Meyer, T. The proliferation-quiescence decision is controlled by a bifurcation in CDK2 activity at mitotic exit. *Cell* 2013, 155, 369–383. [CrossRef]
- Spiro, S. G.; SILVESTRI, G. A. One hundred years of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*, v. 172, n. 5, p. 523-9, 2005.
- Spira, A., Ettinger, D. S., *N. Engl. J. Med.* 2004, 350, 379–392.
- Stover TC, Kim YS, Lowe TL, Kester M. Thermoresponsive and biodegradable linear-dendritic nanoparticles for targeted and sustained release of a pro-apoptotic drug. *Biomaterials* 2008; 29:359-69
- Stover TC, Sharma A, Robertson GP, Kester M. Systemic delivery of liposomal short-chain ceramide limits solid tumor growth in murine models of breast adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11:3465-74.
- Soussi, T. & Wiman, K. G. Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell* 12, 303–312 (2007).
- Subramanian J., Govindan R. (2007) *J. Clin. Oncol.*, 25., 561-570.
- Sugiki H, Hozumi Y, Maeshima H, Katagata Y, Mitsuhashi Y, Kondo S. C2-ceramide induces apoptosis in a human squamous cell carcinoma cell line. *Br J Dermatol.* 2000;143(6):1154-63.
- Suliman, A., Lam, A., Datta, R., and Srivastava, R. K. (2001). Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene* 20, 2122–33.
- Sun Y, Fox T, Adhikary G, Kester M, Pearlman E. Inhibition of corneal inflammation by liposomal delivery of short-chain, C-6 ceramide. *J Leukoc Biol* 2008; 83:1512-21.

- Sun Y., Ren Y., Fang Z., Li C., Fang R., Gao B., Han X., Tian W., Pao W., Chen H., Ji H. (2010) *J. klinik. Oncol.*, 28, 4616-4620.
- Synthesis, Antonella Cheșcă, Mariana Cornelia Tilinca (2009) Cellular and molecular biology. "Transilvania" University of Brașov Publishing House, CNCSIS 1-177 recognized publishing house.
- T. Doel, D. J. Gavaghan, and V. Grau, "Review of automatic pulmonary lobe segmentation methods from CT," *Computerized Medical Imaging and Graphics*, vol. 40, pp. 14–29, 2015.
- Talmadge JE, Fidler IJ. AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* 2010; 70: 5649e69
- Talanian, R. V. et al. Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. *J. Exp. Med.* 186, 1323–1331 (1997).
- Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. *Nature* 2008; 452: 638-642.
- Toh C.K., Gao F., Lim W.T., Leong S.S., Fong K.W., Yap S.P., Hsu A.A., Eng P., Koong H.N., Thirugnanam A., Tan E.H. (2006) *J. Clin. Oncol.*, 24, 2245-2251.
- Torre LA, Bray F, Siegel RL et al (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 65:87–108
- Trakhtenberg A.Kh., Chissov V.I. *Clinical onco-pulmonology*. M., 2000.
- Tran MA, Smith CD, Kester M, Robertson GP. Combining nanoliposomal ceramide with sorafenib synergistically inhibits melanoma and breast cancer cell survival to decrease tumor development. *Clin Cancer Res* 2008; 14:3571-81.
- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. Introduction to the 2015 World Health Organization classification of tumors of the lung, pleura, thymus, and heart. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1240-1242.
- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al. The 2015 World Health Organization classification of lung tumors: impact of genetic, clinical and radiologic advances since the 2004 classification. *J Thorac Oncol.* 2015;10(9):1243-1260.

- Travis, W. D., Colby, T. V., Corrin, B., Shimosato, Y., Brambilla, E., Histopathological Typing of Lung and Pleural Tumors. International Histological Classification of Tumors, Ed. 3, World Health Organization. *Springer-Verlag Berlin, Heidelberg* 1999, pp. 31–40.
- van Echten-Deckert G & Herget T (2006) Sphingolipid metabolism in neural cells. *Biochim Biophys Acta* 1758, 1978–1994.
- van Loo, G., Saelens, X., van Gurp, M., MacFarlane, M., Martin, S. J., and Vandenabeele, P. (2002b). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death Differ* 9, 1031–42.
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2002a). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* 9, 20–6.
- Vansteenkiste J. et al. // *Lancet Oncol.* 2004. V. 5. P. 531.
- Wajant, H. (2002). The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science* 296, 1635–6.
- Wallace M.B. et al. // *Ann. Thorac. Surg.* 2001. V. 72. P. 1861.
- Wang F, Van Brocklyn JR, Edsall L, Nava VE, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate inhibits motility of human breast cancer cells independently of cell surface receptors. *Cancer Res* 1999; 59:6185-91.
- Wang XZ, Beebe JR, Pwiti L, Bielawska A, Smyth MJ. Aberrant sphingolipid signaling is involved in the resistance of prostate cancer cell lines to chemotherapy. *Cancer Res* 1999; 59:5842-8.
- White-Gilbertson, S. et al. Ceramide synthase 6 modulates TRAIL sensitivity and nuclear translocation of active caspase-3 in colon cancer cells. *Oncogene* 28, 1132–1141 (2009).
- Wong, S.C.; Kamarudin, M.N.A.; Naidu, R. Anticancer Mechanism of Curcumin on Human Glioblastoma. *Nutrients* 2021, 13, 950.[CrossRef] [PubMed]
- Yang, H.W.; Chung, M.; Kudo, T.; Meyer, T. Competing memories of mitogen and p53 signalling control cell-cycle entry. *Nature* 2017, 549, 404–408. [CrossRef]

- Yao, K.; Wang, Q.; Jia, J.; Zhao, H. A competing endogenous RNA network identifies novel mRNA, miRNA and lncRNA markers for the prognosis of diabetic pancreatic cancer. *Tumour Biol.* 2017, 39, 1010428317707882. [CrossRef]
- Yoda S, Dagogo-Jack I, Hata AN. Targeting oncogenic drivers in lung cancer: recent progress, current challenges and future opportunities. *Pharmacol Ther* 2019;193:20–30.
- Yokota J, Shiraishi K, Kohno T. Genetic basis for susceptibility to lung cancer. recent progress and future directions. *Adv Cancer Res* 2010; 109: 51-72.
- Youlden DR, Cramb SM, Baade PD (2008) The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J Thorac Oncol* 3:819–831
- Yousem SA. Pulmonary apical cap: a distinctive but poorly recognized lesion in pulmonary surgical pathology. *Am J Surg Pathol* 2001;25(5):679-683.
- Yu, L.; Wu, M.; Zhu, G.; Xu, Y. Emerging Roles of the Tumor Suppressor p53 in Metabolism. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021, 9, 762742. [CrossRef]
- Zeiss, C. J. (2003). The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Vet Pathol* 40, 481–95.
- Zheng et al. *Cell Death and Disease* (2019) 10:157
- Zheng W, Kollmeyer J, Symolon H, Momin A, Munter E, Wang E, et al. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758:1864-84.

<https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/cancer-basics/what-cancer>)

https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1