

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BCL-2 İNHİBİTÖRÜ NAVİTOCLAX VE HSP27 İNHİBİTÖRÜ J2
MOLEKÜLLERİNİN AKCİĞER ADENOKARSİNOM KANSERİ ÜZERİNDE İN
VİTRO SİNERJİSTİK ANTİKANSER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Mine ÖZ

Danışman: Doç. Dr. Mehmet KUZUCU

II. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Murat GÜNAY

TEZ JÜRİ ÜYELERİ

Doç. Dr. Mehmet KUZUCU

Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR

Dr. Öğr. Üyesi Özlem ADMIŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERZİNCAN, 2026

© 2026 [Mine ÖZ]. Tüm hakları saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Doç. Dr. Mehmet KUZUCU danışmanlığı ve Dr. Öğr. Üyesi Murat GÜNEY'in eş danışmanlığında, Mine ÖZ tarafından hazırlanan bu çalışma 02.07.2026 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

Başkan	:	Doç. Dr. Aykut ÖZGÜR	İmza:
Üye	:	Doç. Dr. Mehmet KUZUCU	İmza:
Üye	:	Dr. Öğr. Üyesi Özlem ADMIŞ	İmza:

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunun / / 20.... tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kemal Volkan ÖZDOKUR
Enstitü Müdür V.

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etięe Uygunluk Sayfası

“BCL-2 İnhibitörü Navitoclax ve HSP27 İnhibitörü J2 Moleküllerinin Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri üzerinde *in vitro* Sinerjik Antikanser Etkilerinin yanıt yüzey yöntemi Tabanlı Analizi” isimli “Yüksek Lisans” tezim tarafımca intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiğı gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 02/07/2026

(İmza)

Mine ÖZ

ÖZET

BCL-2 İNHİBİTÖRÜ NAVITOCCLAX VE HSP27 İNHİBİTÖRÜ J2 MOLEKÜLLERİNİN AKCİĞER ADENOKARSİNOM KANSERİ ÜZERİNDE İN VİTRO SİNERJİSTİK ANTİKANSER ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Mine ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet KUZUCU

II. Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Murat GÜNAY

2026, 68 sayfa

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (NSCLC), akciğer kanserlerinin en yaygın alt tiplerinden biri olup tedavi direnci ve apoptotik mekanizmaların baskılanması ile karakterize edilen, agresif öneme sahip bir malignitedir. Bu çalışmada, Bcl-2 inhibitörü Navitoclax ve HSP27 inhibitörü J2 molekülünün küçük hücreli dışı akciğer kanserinde in vitro sinerjik antikanser etkilerini araştırmak amacıyla A549 hücre hattı model sistem olarak kullanılmıştır. Hücre canlılığı MTT yöntemiyle, ilaç etkileşimleri CompuSyn ve Bliss bağımsızlık modeli ile, doz-yanıt ilişkileri ise Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY) ile değerlendirilmiştir. Ayrıca *BCL2*, *BAX*, *APAF-1*, *CTNNB1* ve *CASP9* gen ekspresyon düzeyleri RT-qPCR ile, Bax, Bcl-2 ve Casp-3 protein düzeyleri ise ELISA yöntemiyle analiz edilmiştir. Bliss analizine göre ters orantılı kombinasyonda en belirgin sinerjik etki 0,625 µM Navitoclax + 10 µM J2 dozunda saptanmış; doğru orantılı kombinasyonda ise 0,625 µM Navitoclax + 0,156 µM J2 dozunda saptanmıştır. Bulgular, kombinasyonun A549 hücrelerinde daha seçici antiproliferatif etki gösterebileceğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: HSP27, J2 molekülü, Navitoclax, A549

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE IN VITRO SYNERGISTIC ANTICANCER EFFECTS OF THE BCL-2 INHIBITOR NAVITOCCLAX AND THE HSP27 INHIBITOR J2 ON LUNG ADENOCARCINOMA

Mine ÖZ

Master's Thesis

Erzincan Binali Yıldırım University, Institute of Science and Technology,

Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet KUZUCU

Co-advisor: Assit. Prof. Dr. Öğr. Üyesi Murat GÜNAY

2026, 68 pages

Non-small cell lung cancer (NSCLC) is one of the most common subtypes of lung cancer and represents an aggressive and clinically significant malignancy characterized by treatment resistance and the suppression of apoptotic mechanisms. In this study, the A549 cell line was used as a model system to investigate the in vitro synergistic anticancer effects of the Bcl-2 inhibitor Navitoclax and the HSP27 inhibitor J2 in NSCLC. Cell viability was assessed using the MTT assay, drug interactions were evaluated using CompuSyn and the Bliss independence model, and dose-response relationships were analyzed through response surface methodology (RSM). In addition, the expression levels of the *BCL2*, *BAX*, *APAF-1*, *CTNNB1*, and *CASP9* genes were determined by RT-qPCR, while Bax, Bcl-2, and Caspase-3 protein levels were analyzed using ELISA. According to the Bliss analysis, the most pronounced synergistic effect in the inversely proportional combination was observed at 0.625 μ M Navitoclax + 10 μ M J2, whereas in the directly proportional combination, it was detected at 0.625 μ M Navitoclax + 0.156 μ M J2. These findings suggest that the combination may exert a more selective antiproliferative effect on A549 cells.

Keywords: HSP27, J2 molecule, Navitoclax, A549

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocam Doç. Dr. Mehmet KUZUCU'ya teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tez sürecimde katkı ve destekleriyle yanımda olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Murat GÜNAY'a teşekkür ederim.

Çalışmamın yürütülmesi sırasında bilgi ve deneyimlerini paylaşarak laboratuvar çalışmalarına katkı sağlayan değerli hocalarım Dr. Ahmet ÇETİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreç boyunca yardımını, emeğini ve manevi desteğini esirgemeyen, ihtiyaç duyduğum her anda yanımda olan Uğur DURMUŞ'a ayrıca teşekkür ederim.

Tez sürecimde desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, katkılarıyla her zaman yanımda olan Dr. Nihan GÜNAY ve Dr. Seda KILINÇ'a içtenlikle teşekkür ederim.

Lisansüstü eğitimim ve tez çalışmam boyunca her zaman yanımda olan, bana güç veren ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim. Bu süreçte gösterdikleri sabır, anlayış ve manevi destek benim için en büyük motivasyon kaynaklarından biri olmuştur.

Mine ÖZ

Haziran, 2026

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLOLAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	10
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Araştırmanın Amacı	1
1.2. Araştırmanın Önemi	1
1.3. Varsayımlar	2
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	3
2.1. Akciğer kanseri.....	3
2.1.1. Akciğer Kanseri epidemiyolojisi.....	3
2.1.2. Akciğer kanseri çeşitleri	6
2.1.3. Akciğer Kanseri etiyolojisi.....	7
2.2. Bcl-2 protein ailesi	8
2.3. Navitoclax'ın Antikanser Etkisi	10
2.4. HSP27'nin Terapötik Önemi	13
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	17
3.1. Materyal.....	17
3.1.1. Kullanılan aletler ve cihazlar	17
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	18
3.1.3 Hücre Hattı	18
3.2 Yöntem	19
3.2.1 Hücre Kültürü.....	19
3.2.2 Sitotoksik Etki Araştırılması	22
3.2.3 Hücre Canlılık testi.....	22
3.2.4 RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	25
3.2.5 RNA ve cDNA'nın Spektrofotometrik Analizi.....	26
3.2.6 RT-qPCR Yöntemi ile Gen Ekspresyon Düzeylerinin Analizi	27
3.2.7 Protein ekstraksiyonu	29
3.2.8 ELISA	30
4. BULGULAR	31
4.1. Canlılık Testi	31

4.2. Kombinasyonel Etki Değeri	32
4.3 Kombinasyon uygulamalarının yanıt yüzey yöntemi analizi	37
4.4 Gen ifade düzeyleri.....	47
4.5 Protein seviyeleri	49
5. SONUÇ ve TARTIŞMA	52
KAYNAKÇA	62

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Navitoclax ve J2'nin uygulanan doğru orantılı konsantrasyon aralıkları.....	24
Tablo 3.2. Navitoclax ve J2'nin uygulanan ters orantılı konsantrasyon aralıkları	24
Tablo 3.3. cDNA Sentezi için Reaksiyon İçeriği.....	26
Tablo 3.4. Nükleik Asit Saflık Değerlendirmesinde Kullanılan Oranlar.....	27
Tablo 3.5. Hedef genlere ait primer dizileri.....	28
Tablo 3.6. RT-qPCR sıcaklık döngüsü	29
Tablo 4.1. 24. Saat A549 hücre hattı üzerine Navitoclax, J2 ve doğru orantılı kombinasyon uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri	33
Tablo 4.2. 48. Saat A549 hücre hattı üzerine Navitoclax, J2 ve doğru orantılı kombinasyon uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri	34
Tablo 4.3. 24. Saat HGF-1 hücre hattı üzerine Navitoclax, J2 ve doğru orantılı kombinasyon uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri	35
Tablo 4.4. 48. Saat HGF-1 hücre hattı üzerine Navitoclax, J2 ve doğru orantılı kombinasyon uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri	36
Tablo 4.5. A549 hücre hattında Bax, Casp-3 ve Bcl-2 protein seviyeleri	51
Tablo 4.6. HGF-1 hücre hattında Bax, Casp-3 ve Bcl-2 protein seviyeleri.....	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Ülkemizde tüm yaş gruplarındaki ve cinsiyetlerdeki en sık görülen bazı kanser türlerinin yüzdelik dağılımları (WHO).....	4
Şekil 2.2. Cinsiyet başına yaşa göre standartlandırılmış insidans ve ölüm oranları (WHO)	5
Şekil 2.3. Navitoclax'ın moleküler yapısı.....	10
Şekil 2.4. BCL-2 aracılı mitokondriyal apoptoz yolağının şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.5. Isı şok proteinlerinin apoptoz ve hücre sağkalım yollarındaki düzenleyici rolü..	15
Şekil 2.6. HSP27 İnhibitörü J2 molekülü.....	16
Şekil 3.1. A549 Hücre hattının mikroskopik görüntüsü.....	20
Şekil 3.2. İn vitro hücre kültürü çalışmalarında steril koşullar altında hücre ekimi ve deneysel uygulama sürecinin gerçekleştirilmesi	22
Şekil 3.3. İn vitro hücre kültürü deneylerinde kullanılan kontrol ve ilaç uygulama gruplarının hazırlanması.....	30
Şekil 4.1. A549 hücre hattında doğru orantılı ve ters orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonlarının 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücre canlılığı üzerindeki etkileri	31
Şekil 4.2. A549 hücre hattında doğru orantılı ve ters orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonrasında hücre canlılığı üzerindeki etkileri	32
Şekil 4.3. HGF-1 hücre hattında doğru orantılı ve ters orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonlarının 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	32
Şekil 4.4. HGF-1 hücre hattında doğru orantılı ve ters orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonrasında hücre canlılığı üzerindeki etkileri.....	32
Şekil 4.5. A549 hücre hattında 24 saatlik Navitoclax, J2 ve kombinasyon tedavilerine ait doz-etki eğrileri temelinde kombinasyon indeks (CI) değerlerinin değerlendirilmesi.....	33
Şekil 4.6. A549 hücre hattında 48 saatlik Navitoclax, J2 ve kombinasyon tedavilerine ait doz-etki eğrileri temelinde kombinasyon indeks (CI) değerlerinin değerlendirilmesi.....	34
Şekil 4.7. HGF-1 hücre hattında 24 saatlik Navitoclax, J2 ve kombinasyon tedavilerine ait doz-etki eğrileri temelinde kombinasyon indeks (CI) değerlerinin değerlendirilmesi.....	35
Şekil 4.8. HGF-1 hücre hattında 48 saatlik Navitoclax, J2 ve kombinasyon tedavilerine ait doz-etki eğrileri temelinde kombinasyon indeks (CI) değerlerinin değerlendirilmesi.....	36
Şekil 4.9. A549 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı kombinasyonlarının 24 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.....	37
Şekil 4.10. A549 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin ters orantılı kombinasyonlarının 24 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.....	38
Şekil 4.11. A549 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı kombinasyonlarının 48 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri	38
Şekil 4.12. A549 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin ters orantılı kombinasyonlarının 48 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.....	38

Şekil 4.13. HGF-1 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı kombinasyonlarının 24 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.....	39
Şekil 4.14. HGF-1 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin ters orantılı kombinasyonlarının 24 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.....	39
Şekil 4.15. HGF-1 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı kombinasyonlarının 48 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.....	40
Şekil 4.16. HGF-1 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin ters orantılı kombinasyonlarının 48 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.....	40
Şekil 4.17. A549 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı kombinasyonlarının 24 ve 48 saatlik uygulamalarına ait contour plot grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.....	41
Şekil 4.18. A549 hücre hattında 24 saatlik doğru orantılı kombinasyon doz seviyelerine bağlı hücre canlılığı değişimini gösteren quadratic dose-response eğrisi	41
Şekil 4.19. A549 hücre hattında 48 saatlik doğru orantılı kombinasyon doz seviyelerine bağlı hücre canlılığı değişimini gösteren quadratic dose-response eğrisi	42
Şekil 4.20. A549 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin ters orantılı kombinasyonlarının 24 ve 48 saatlik uygulamalarına ait contour plot grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.....	42
Şekil 4.21. HGF-1 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı kombinasyonlarının 24 ve 48 saatlik uygulamalarına ait contour plot grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.....	43
Şekil 4.22. HGF-1 hücre hattında 24 saatlik doğru orantılı kombinasyon doz seviyelerine bağlı hücre canlılığı değişimini gösteren quadratic dose-response eğrisi	44
Şekil 4.23. HGF-1 hücre hattında 48 saatlik doğru orantılı kombinasyon doz seviyelerine bağlı hücre canlılığı değişimini gösteren quadratic dose-response eğrisi	43
Şekil 4.24. HGF-1 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin ters orantılı kombinasyonlarının 24 ve 48 saatlik uygulamalarına ait contour plot grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.....	44
Şekil 4.25. A549 hücre hattında 24 ve 48 saatlik doğru orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonunun Bliss sinerji analizi.....	45
Şekil 4.26. A549 hücre hattında 24 ve 48 saatlik ters orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonunun Bliss sinerji analizi	45
Şekil 4.27. HGF-1 hücre hattında 24 ve 48 saatlik doğru orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonunun Bliss sinerji analizi.....	46
Şekil 4.28. HGF-1 hücre hattında 24 ve 48 saatlik ters orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonunun Bliss sinerji analizi	46
Şekil 4.29. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında <i>BCL-2</i> gen ifadesi üzerindeki etkileri.....	47
Şekil 4.30. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında <i>BAX</i> gen ifadesi üzerindeki etkileri	47

Şekil 4.31. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında <i>APAF-1</i> gen ifadesi üzerindeki etkileri	48
Şekil 4.32. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında <i>CTNMB1</i> gen ifadesi üzerindeki etkileri.....	48
Şekil 4.33. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında <i>CASP-9</i> gen ifadesi üzerindeki etkileri.....	49
Şekil 4.34. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında bax protein miktarı üzerindeki etkileri	49
Şekil 4.35. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında cas3 protein miktarı üzerindeki etkileri	50
Şekil 4.36. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında bcl2 protein miktarı üzerindeki etkileri	50

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Celsius
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
dk	Dakika
ml	Mililitre
AIF	Apoptoz İndükleyici Faktör
cDNA	Komplementer DNA
CI	Kombinasyon İndeksi
EGFR	Epidermal Büyüme Faktör Reseptörü
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FBS	Fetal Bovine Serum
KHAK	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK	Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
MEM	Minimum Essential Medium
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-qPCR	Ters Transkriptaz Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
RSM	Response Surface Methodology
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

1.1. Araştırmanın Amacı

Akciğer kanseri, yüksek mortalite oranı ve tedaviye direnç geliştirme eğilimi nedeniyle günümüzde önemli bir sağlık problemi olmaya devam etmektedir. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri olgularında HSP27'nin ifade düzeyinin arttığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Navitoclax, KHDAK'da ifade düzeyi arttığı bilinen Bcl2 protein ailesinin spesifik bir inhibitörüdür. Bcl2 protein ailesi üyelerinin kanser hücrelerini apoptosisten kurtarmaya çalışmasına HSP27 şaperon proteininin katkısının bulunduğu bilinmektedir.

Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızın temel amacı; klinik geliştirme süreci devam eden BCL-2 inhibitörü Navitoclax ile preklinik aşamada güçlü bir HSP27 inhibitörü olarak tanımlanan J2 molekülünün, Küçük hücreli dışı akciğer kanseri modeli olarak kullanılan A549 hücre hattı üzerindeki kombinasyon etkilerinin in vitro koşullarda araştırılmasıdır. Bu kapsamda, her iki ajanın birlikte uygulanmasının hücre canlılığı, proliferasyon ve özellikle apoptoz mekanizmaları üzerindeki etkilerinin ortaya konulması hedeflenmiştir. Ayrıca, Navitoclax ve J2 kombinasyonunun sinerjik etki oluşturup oluşturmadığının belirlenmesi ve bu etkinin moleküler düzeyde açıklanması amaçlanmıştır; bu doğrultuda apoptoz ile ilişkili gen ve protein belirteçler üzerinden detaylı analizler gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın, KHDAK tedavisinde kombinasyon temelli yaklaşımlara katkı sağlayabilecek potansiyel mekanizmaların anlaşılmasına ışık tutması beklenmektedir.

1.2. Araştırmanın Önemi

Küçük hücreli dışı akciğer kanserinde mevcut tedavi yaklaşımlarına rağmen hastalarda istenilen terapötik başarıya her zaman ulaşılamamakta, bu durum yeni ve daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Özellikle kanser hücrelerinde apoptoz mekanizmalarının baskılanması, tümör hücrelerinin hayatta kalmasına katkı sağlayan temel faktörlerden biri olarak öne çıkmaktadır. Bu tür yeni tedavi kombinasyonlarının keşfi, akciğer kanseri gibi tedavi edilmesi güç hastalıklar için daha iyi hedeflenmiş ve etkili tedavi alternatiflerinin

geliştirilmesine yol açabilecek, böylece hem tedavi başarısını artıracak hem de tedaviye karşı gelişebilecek direnç mekanizmalarının önüne geçebilecektir.

1.3. Varsayımlar

- Navitoclax ve J2 kombinasyonunun etkisinin, uygulanan dozların birbirleriyle olan oranına ve inkübasyon süresine bağlı olarak değişiklik göstereceği; özellikle uygun doz kombinasyonlarında tekli uygulamalardan elde edilen etkilerin toplamından daha yüksek bir hücre ölümü meydana geleceği düşünülmektedir. Bu kapsamda doğru orantılı ve ters orantılı kombinasyon uygulamalarının farklı hücresel yanıtlar oluşturacağı, bazı kombinasyon noktalarında sinerjistik etkinin belirginleşeceği, bazı yüksek doz uygulamalarında ise gözlenen canlılık azalmasının gerçek bir sinerjiden ziyade ajanların bireysel toksik etkilerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.
- Kombinasyonun A549 kanser hücreleri üzerindeki etkisinin sağlıklı HGF-1 hücrelerine kıyasla daha belirgin olacağı ve bu durumun tedavi açısından seçici bir antiproliferatif etkiye işaret edeceği düşünülmektedir. Kanser hücrelerinde Bcl-2 ve HSP27 aracılı hayatta kalma mekanizmalarının daha aktif olması nedeniyle bu hücrelerin, iki farklı moleküler mekanizmanın eş zamanlı olarak baskılanmasına daha duyarlı olacağı; buna karşılık sağlıklı hücrelerin belirli doz aralıklarında canlılıklarını daha yüksek oranda koruyacağı öngörülmektedir.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

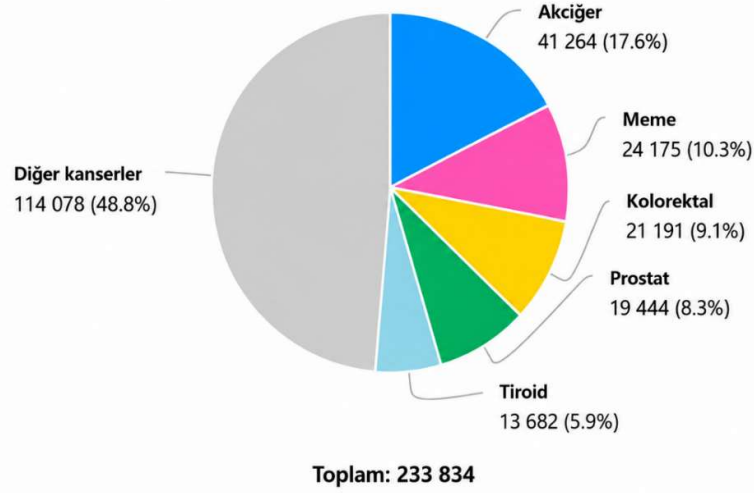
2.1. Akciğer Kanseri

Akciğer kanseri günümüzde kanserle ilgili ölümlerin başlıca sebepleri arasında yer almakta ve bu hastalığa bağlı ölüm sayılarının ilerleyen senelerde artış göstereceği beklenmektedir (Sung H., 2020). Akciğer kanserine ait tümörlerin sınıflandırması ve tanımlanması yıllar içerisinde değişiklik göstermiş olup bu hastalığın etiolojisinin belirlenmesi tıp alanında önemli katkılar sağlamıştır (Cruz C vd., 2011). Bronş kanseri olarak da bilinen bu hastalık, hücre döngüsünü düzenleyen genetik ve moleküler mekanizmaların bozulması sonucunda hücrelerin normal büyüme, farklılaşma ve programlı hücre ölümü süreçlerinden kaçınarak sürekli bölünmesi, birikmesi ve çevre dokulara yayılmasıyla karakterize edilen tümör olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.1.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

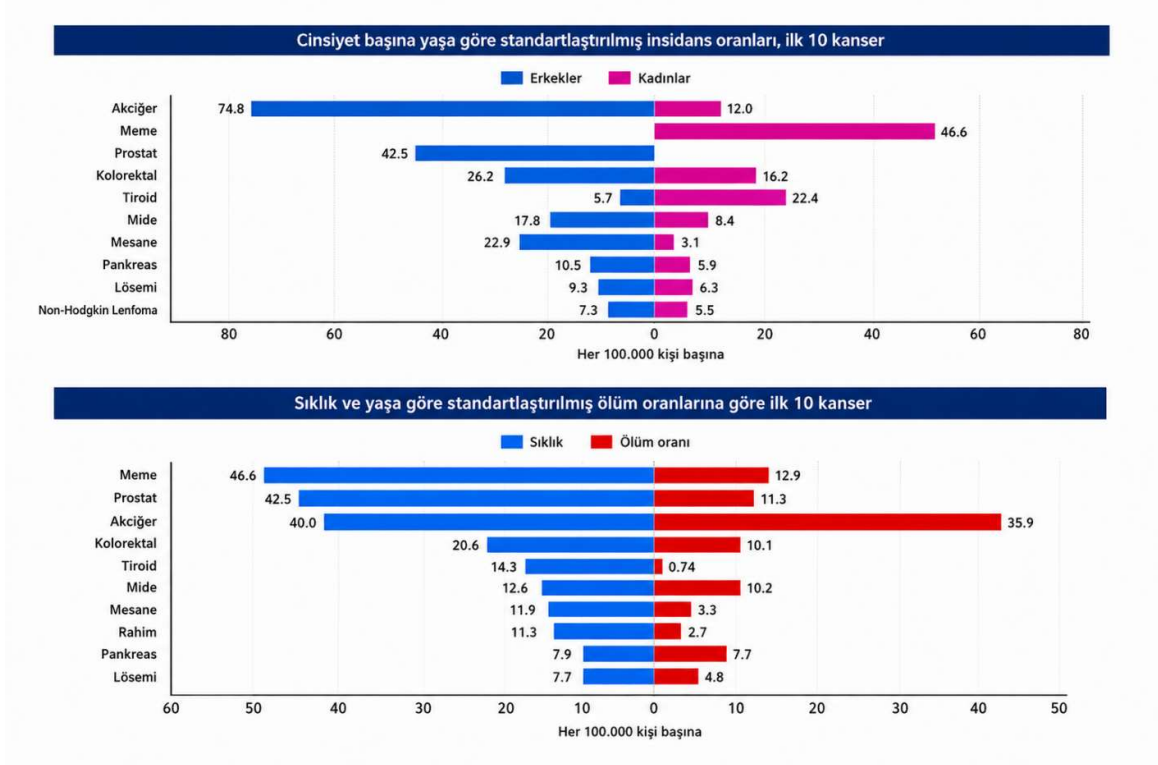
Akciğer kanseri, 20. yüzyılın ortalarından itibaren tütün ve tütün ürünlerinin kullanımındaki artışın etkisiyle görülme sıklığı giderek artan, erken tanı ve tedavi yöntemlerine rağmen, yüksek mortalite oranları ve tedavi sürecindeki zorluklar sebebiyle ciddi sağlık kayıplarıyla sonuçlanan kanser türlerinden biri olarak öne çıkmaktadır (Jemal A vd., 2011). Dünya sağlık örgütü verilerine göre 2022 senesinde akciğer kanseri yaklaşık 2,5 milyon yeni vaka ile dünya genelinde en sık tanı konulan kanser türü olmuş ve tüm kanser vakalarının %12,4'ünü oluşturmuş olup kolorektal kanser (%9,6), prostat kanseri (%7,3) ve mide kanseri (%4,9)'ni geride bırakmış genellikle düşük sağkalım oranları ve kötü prognoz ile karakterize edilen bir hastalıktır (Bray F vd., 2024). Akciğer kanseri, dünya genelinde cinsiyet ve coğrafi bölgelere göre farklı epidemiyolojik özellikler sergilemektedir (Huang vd., 2022). Son yıllarda akciğer kanserinin erkeklerde insidans ve mortalite açısından en sık görülen kanser türü olduğu, kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci sırada yer aldığı görülmektedir. Aynı yıl içerisinde yaşa göre standardize edilmiş insidans oranı erkeklerde 100.000'de 32,1; kadınlarda ise 16,2 olarak hesaplanmış olup dünya genelinde yaklaşık 2,2 milyon yeni vaka ve 1,8 milyon ölüm rapor edilmiştir (Ferlay J vd., 2024).

2020'de her iki cinsiyet, her yaştan yeni vaka sayısı



Şekil 2.1. Ülkemizde tüm yaş gruplarındaki ve cinsiyetlerdeki en sık görülen bazı kanser türlerinin yüzdelik dağılımları (WHO)

Dünya genelinde uluslararası kanser araştırmaları ajansı verilerine göre akciğer kanseri 185 ülkede görülmekte olup bu ülkeler arasında başta Çin, Amerika Birleşik Devletleri, Japonya, Hindistan ve Doğu Avrupa ülkeleri yer almaktadır. Asya ülkelerinde, özellikle Doğu Asya bölgesinde, son yıllarda akciğer kanseri insidansının önemli ölçüde arttığı bildirilmektedir (Forman D vd., 2014). Dünya genelinde en yüksek yeni akciğer kanseri vaka sayısına sahip ülke Çin olup, hastalık insidansının hem erkeklerde hem de kadınlarda hızla arttığı bildirilmektedir. Afrika kıtası ise diğer bölgelere kıyasla daha düşük akciğer kanseri oranlarına sahip olmasına rağmen, son yıllarda vaka sayılarında kademeli bir artış gözlenmektedir (Ervik M vd., 2024). Ülkemizde ise bu durum özellikle erkek nüfusta sigara kullanımına bağlı olarak yüksek risk oluşturmuş ve yakın gelecekte bu oranın artması beklenmektedir. Şekil 2.1’de Ülkemizde tüm yaş gruplarındaki ve cinsiyetlerdeki en yüksek mortaliteye sahip kanser türlerinin oranları verilmiştir.



Şekil 2.2. Cinsiyet başına yaşa göre standartlandırılmış insidans ve ölüm oranları (WHO)

Erkeklerde akciğer kanseri insidans oranı 100.000 kişi başına 74,8 olarak belirlenirken, kadınlarda bu oran 12,0 olarak saptanmıştır. Bu durum, akciğer kanserinin erkeklerde kadınlara kıyasla belirgin şekilde daha yüksek oranlarda görüldüğünü göstermektedir. Bu bulgular akciğer kanserinin yüksek ölüm oranları ve kötü prognozu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Meme ve prostat kanserleri yüksek insidans oranlarına sahip olmalarına rağmen mortalite oranlarının akciğer kanserine kıyasla daha düşük olduğu dikkat çekmektedir. Ayrıca kolorektal kanserin hem insidans hem de mortalite açısından önemli bir yük oluşturduğu görülmektedir (WHO).

2.1.2. Akciğer Kanseri Çeşitleri

Akciğer kanseri olgularının büyük bölümü sigara kullanımı ile ilişkilendirilmekte olup, hastalığın gelişiminde tütün ürünleri önemli risk faktörleri arasında yer almaktadır. Erkeklerde görülen vakaların yaklaşık %80'i ve kadınlarda görülen vakaların %90'ı sigara kullanımıyla bağlantılı olan akciğer kanseri histolojik özelliklerine göre küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK), küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve karsinoid tümörler olarak sınıflandırılmaktadır (Rothschild SI vd., 2015). Tüm akciğer kanseri olgularının yaklaşık %80–85'ini küçük hücreli dışı akciğer kanserleri oluşturmakta olup bu grup adenokarsinom, skuamöz hücreli karsinom ve büyük hücreli karsinom alt tiplerini kapsamaktadır. KHAK ise vakaların yaklaşık %15'ini oluşturmaya rağmen hızlı proliferasyon kapasitesi ve erken metastatik yayılım özelliği nedeniyle kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir (Travis WD vd., 2015).

İleri evre KHDAK olgularında 5 yıllık sağ kalım oranı %6,1 olmak üzere oldukça düşük bir düzeydedir. Buna rağmen hastalığın lokalize ya da bölgesel düzeyde sınırlı olduğu 5 yıllık sağ kalım oranlarının belirgin bir şekilde yükseldiği ve %61,4 ve %34,5 olduğu rapor edilmiştir. Son yıllarda adenokarsinom insidansında artış görülürken, skuamöz hücreli karsinom ve küçük hücreli akciğer kanseri olgularında azalma olduğu bildirilmektedir.

Günümüzde en yaygın görülen akciğer kanseri alt tipi adenokarsinom olarak kabul edilmektedir (Lewis DR vd., 2014). 20.yüzyıl dönemine ait veriler incelendiğinde, akciğer kanseri histolojik alt tiplerinin dağılımında değişiklik olduğu görülmektedir. Epidermoid karsinom sıklığında azalma gözlenirken, adenokarsinom oranlarında belirgin artış saptanmıştır. Küçük hücreli kanser oranlarının ise büyük ölçüde benzer kaldığı bildirilmiştir (Köktürk N vd., 2004). Tedavi başarısını artırmak ve ilaç direnci gelişimini sınırlamak amacıyla KHDAK'de farklı kemoterapötik ajanların birlikte kullanımı tercih edilebilmektedir. Bu doğrultuda Cisplatin veya Carboplatin gibi platin temelli ilaçların Paclitaxel ya da Pemetrexed ile kombine edilmesi, klinik uygulamalarda öne çıkan tedavi yaklaşımları arasında yer almaktadır. Bu durum, KHDAK tedavisinde tek bir mekanizmaya odaklanmak yerine birden fazla biyolojik sürecin birlikte hedeflenmesinin tedavi yanıtını güçlendirebilecek önemli bir yaklaşım olduğunu ortaya çıkarmaktadır (Sandler A vd., 2006).

2.1.3. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Akciğer dokusunda meydana gelen genetik ve epigenetik değişiklikler, hastalığın oluşum ve ilerleme sürecinde önemli rol oynamaktadır (Alberg AJ vd., 2013). Sigara tüketim süresi ve günlük kullanım miktarındaki artışın, hastalık gelişim riski ile doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir (Wataru M vd., 1984). Tütün ürünleri kullanımı, akciğer kanseri oluşumunda en önemli önlenabilir risk etkenlerinden biri olarak değerlendirilmektedir. Sigara dumanında yer alan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), N-nitrozaminler ve benzen gibi karsinogenik bileşiklerin DNA hasarına neden olarak tümör gelişim sürecini başlatabildiği bilinmektedir.

Akciğer kanseri gelişiminde çevresel faktörlerin yanı sıra genetik yatkınlığın da etkili olduğu bilinmektedir. Kanseri oluşumu, hücre genomunda meydana gelen genetik değişikliklerin birikimi sonucunda gelişmektedir. Özellikle onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerde oluşan hasarlar, hücresel proliferasyonun kontrolsüz hale gelmesine neden olmaktadır. Bu değişiklikler; hücre döngüsü, apoptoz ve diferansiyasyon gibi temel biyolojik süreçleri etkileyerek tümör gelişimine katkıda bulunmaktadır (Corn PG vd., 2002). Genetik faktörler; bireyin sigara maruziyetine karşı duyarlılığı, belirli akciğer kanseri alt tiplerinin ortaya çıkışı ve biyolojik tedavilere verilen yanıt üzerinde rol oynayabilmektedir (Spitz MR vd., 2007). Erken yaşta ortaya çıkan ailesel akciğer kanseri vakalarının, kalıtsal duyarlılık ile ilişkili moleküler ve genetik mekanizmalar açısından önemli bir belirteç olabileceği düşünülmektedir (Cassidy A vd., 2008).

Akciğer kanseri olgularının önemli bir bölümü 65 yaş ve üzerindeki bireylerde görülmekte olup, tanı anındaki ortalama yaşın 70'in üzerinde olduğu bildirilmektedir. Özellikle olgularının %31,1'i 65–74 yaş, %29'u 75–84 yaş ve %8,3'ü ise 85 yaş ve üzerindeki bireylerde rastlanılmaktadır (Wingo PA vd., 2003). Bu yaş grubundaki hasta sayısının 2050 yılına kadar belirgin şekilde artarak yaklaşık dört katına ulaşacağı öngörülmektedir (Blanchard EM vd., 2010). Bu yaklaşımlar arasında erken evre hastalarda cerrahi tedavi, ileri evre olgularda ise tek ajan kemoterapi uygulamaları yer almaktadır (Gridelli C vd., 2007).

Kanser oluşumunda etkili fiziksel faktörler arasında radyasyon, yüksek sıcaklık ve mekanik etkiler yer almaktadır. Özellikle iyonize radyasyon türleri (X ışınları, gama ışınları, ultraviyole ışınlar ve nükleer emisyonlar), biyolojik makromoleküller üzerinde doğrudan hasar oluşturabilecek enerjiye sahiptir (Heynick L.N vd., 2003).

2.2. Bcl-2 Protein Ailesi

Bcl-2 protein ailesi üyeleri, apoptozun düzenlenmesinde görev alan temel moleküler yapılardır. Bu aile, pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerden oluşmakta olup hücre yaşamı ile hücre ölümü arasındaki dengeyi kontrol etmektedir. Başlatıcı uyarana bağlı olarak apoptozun aktivasyonunu sağlayan farklı hücre içi sinyal iletim yolları bulunmaktadır. Bu süreçte Bcl-2 ailesine ait proteinler başta olmak üzere mitokondriler, sitokrom c ve kaspazlar, apoptotik sinyal iletim mekanizmalarının temel ve kritik bileşenleri olarak görev yapmaktadır. Özellikle anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerinin artmış ekspresyonu, tümör hücrelerinin hayatta kalmasını destekleyerek kanser gelişimi ve progresyonunda rol oynamaktadır. Bcl-2'nin tedavi direncindeki temel rolü, mitokondriyal apoptoz yolunu baskılamasıdır. Bcl-2, Bax ve Bak gibi proapoptotik proteinlerin etkinliğini sınırlandırarak mitokondri dış zarının geçirgenleşmesini önler. Bcl-2 ailesine ait antiapoptotik proteinlerin inhibe edilmesinin, tedaviye dirençli tümör hücrelerinde apoptotik sürecin yeniden etkinleşmesine katkı sağlamaktadır (Carneiro BA vd., 2020).

Bcl-2 ailesi proteinleri, son yirmi yıl içinde domain yapıları ve fonksiyonlarına göre sınıflandırılmıştır. Kısa korunmuş sekans bölgeleri olan BCL-2 homoloji (BH) motifleri ile karakterize edilen bu proteinler, BCL-2 ve BCL-XL ile temsil edilen anti-apoptotik/pro-survival proteinler, BAX ve BAK ile temsil edilen pro-apoptotik proteinler ve BAD ile BID tarafından temsil edilen yalnızca BH3 domeni içeren pro-apoptotik proteinlerden oluşan üç ana gruba ayrılmaktadır (Campbell KJ vd., 2018).

Pro-apoptotik BAX/BAK alt ailesi üyeleri dört BH domeni (BH1–BH4) kapsamaktadır. İnaktif durumda bu proteinlerin yapısı, BCL-2 pro-survival proteinleri ile yüksek benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, BAX ve BAK apoptoz sürecinde belirgin konformasyonel değişiklikler geçirerek aktif hale geçmektedir. Bu proteinler, farklı derecelerde olmak üzere BCL-2-benzeri pro-survival proteinlerle etkileşime girerek bu proteinler tarafından inhibe edilebilmektedir (Suzuki M vd., 2000).

BH3-only olarak adlandırılan pro-apoptotik protein grubu (BIM, PUMA, BID, BAD, BIK, BMF, NOXA ve HRK), hem kendi aralarında hem de daha uzak ilişkili proteinlerle yalnızca BH3 domeini üzerinden benzerlik göstermektedir. Bu proteinler genellikle serbest halde belirgin bir üç boyutlu yapı sergilemezken, BCL-2 ailesinin pro-survival üyeleri ile etkileşime

girdiklerinde α -helikal konformasyon kazanmaktadır. Bu genel yapısal özelliğin istisnası BID proteindir; BID, başlangıçta inaktif bir öncül protein olarak sentezlenmekte ve kaspaz-8 aracılı proteolitik kesim sonucunda aktif tBID (truncated BID) formuna dönüşmektedir.

BCL-2, ilk kez foliküler B-hücreli lenfomada proto-onkogen olarak tanımlanmıştır. Bu hücrelerde *BCL-2* geninin, 18. ve 14. kromozomlar arasındaki translokasyonun kırılma noktasında bulunduğu ve immüoglobulin ağır zincir intron enhancer bölgesinin kontrolü altına girdiği gösterilmiştir. Bu durumun *BCL-2* ekspresyonunu artırarak hücre ölümünün baskılanmasında rol oynadığı ifade edilmektedir (Tsujimoto Y vd., 1985).

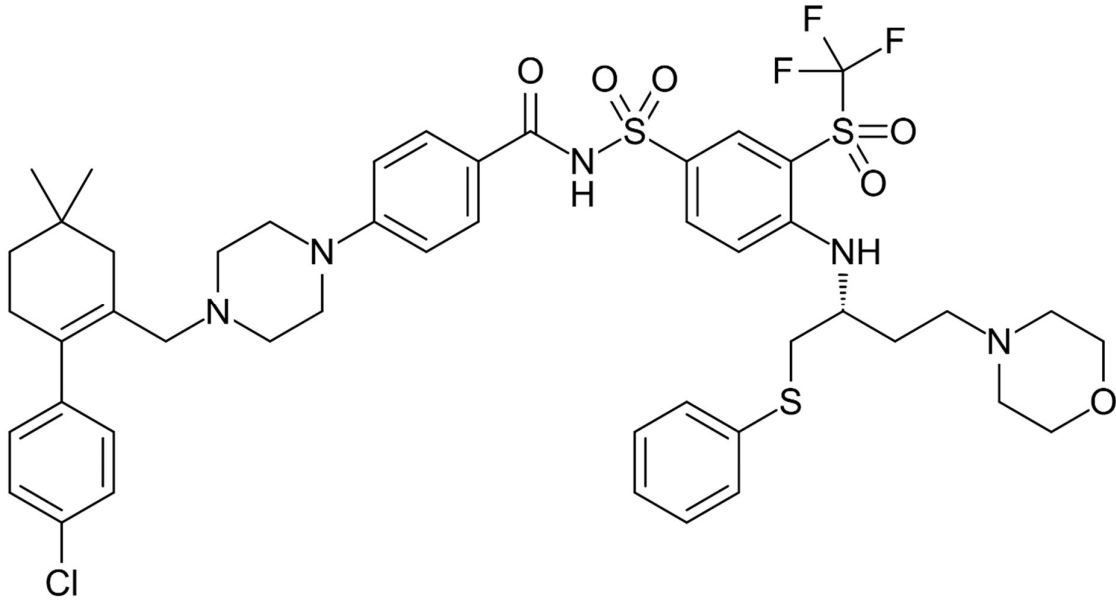
Yaklaşık 230 kb uzunluğunda olan *BCL2* geni, başta mitokondri iç membranı olmak üzere daha sınırlı düzeyde hücre membranlarında da bulunan 24–26 kDa ağırlığında bir proteinin sentezlenmesini sağlar. Bu proteinin ve aynı ailede yer alan diğer anti-apoptotik üyelerin fazla eksprese edilmesi, tümör hücrelerinin apoptozu başlatabilecek stres koşullarına karşı daha dirençli hale gelmesine katkıda bulunur (Tan TT vd., 2008).

Tümör hücrelerinde *BCL-2* protein ekspresyon düzeylerinin normal hücrelere kıyasla daha yüksek olması, bu proteini hedefleyen inhibitörlerin sağlıklı hücreler üzerindeki etkisinin görece daha sınırlı olmasına yol açmaktadır. Bu nedenle, anti-apoptotik *BCL-2* aktivitesinin baskılanması yoluyla tümör hücrelerinde apoptozu karşı gelişen direnç mekanizmasının ortadan kaldırılması, tümör patogeneze dayalı yeni bir tedavi stratejisi olarak değerlendirilmektedir (Luna-Vargas MPA vd., 2016).

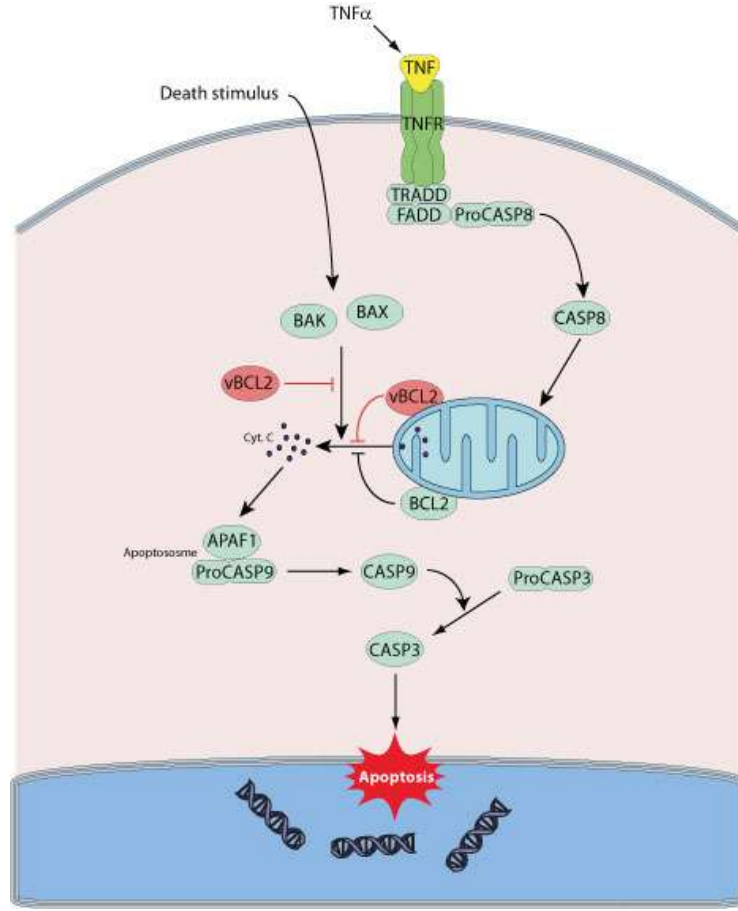
Çeşitli çalışmalar, *BCL2*'nin aşırı üretiminin akciğer tümörlerinde kemoterapötik ajanlara karşı direnç mekanizmasında rol oynadığını göstermektedir. Antikanser ilaç geliştirme çalışmalarında birçok Bcl-2 ailesi inhibitörü değerlendirilmiş ve navitoclax bu grupta öne çıkan ajanlardan biri olmuştur. Yapılan çalışmalarda, navitoclax'ın antiapoptotik proteinlerin BH3 bölgesine bağlanan moleküllerle olan etkileşimini engelleyerek tümör hücrelerinde apoptozu başlattığı ortaya çıkarılmıştır (Han, Z vd., 2019).

2.3. Navitoclax'ın Antikanser Etkisi

Navitoclax (ABT-263) (Şekil 2.3), anti-apoptotik BCL-2 ailesi proteinlerini hedefleyen küçük moleküllu bir inhibitördür. Bcl-2 ekspresyonunun artması, tümör hücrelerinde apoptozdan kaçışa ve kemoterapiye direnç gelişimine zemin hazırlayabilmektedir. Navitoclax, BH3 bağlanma bölgesi üzerinden Bcl-2'nin anti-apoptotik fonksiyonunu engelleyerek kanser hücrelerinin apoptoza daha duyarlı hale gelmesini sağlayabilir. Ancak apoptotik eşik yalnızca Bcl-2 düzeyiyle ilişkili değildir; hücresel stres yanıt sistemleri de bu sürecin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Rudin CM vd., 2012).



Şekil 2.3. Navitoclax'ın moleküler yapısı



Şekil 2. 4. BCL-2 aracılı mitokondriyal apoptoz yolağının şematik gösterimi.

Navitoclax'ın anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri üzerindeki baskılayıcı etkisi, tümör hücrelerinde sağkalımı destekleyen moleküler dengenin bozulmasına neden olabilmektedir. Bu durum, kanser hücrelerinin hücre ölümünden kaçınma kapasitesini azaltarak apoptotik süreçlerin yeniden etkinleşmesine zemin hazırlamaktadır. Apoptoz ise hücrenin kontrollü, düzenli ve fizyolojik bir mekanizma aracılığıyla ortadan kaldırıldığı programlanmış hücre ölümü süreci olarak tanımlanmaktadır.

Apoptoz sürecinde hücreler, belirli moleküler sinyaller aracılığıyla kontrollü bir değişim sürecine girer. Bu sürecin erken dönemlerinde kaspaz adı verilen enzimler aktive olur. Sistein proteaz yapısındaki kaspazlar, hücre içinde başlangıçta inaktif öncül formlar halinde bulunur ve apoptotik sürecin ilerlemesinde temel görev üstlenir. Aktive olan kaspazlar, hücredeki

önemli proteinleri parçalayarak apoptoza özgü biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olur (Portt L vd., 2011).

Kaspazlar, hücrenin yapısal bütünlüğünü sağlayan hücre iskeleti proteinleri, nükleer proteinler ve DNA onarım enzimleri gibi temel bileşenleri hedef alarak parçalayabilir. Ayrıca nükleazlar ve proteazlar gibi diğer yıkıcı enzimlerin aktivasyonunda da rol oynayabilirler (Galluzzi L vd., 2010). Bu mekanizma genel olarak ekstrinsik yolak, yani ölüm reseptörü yolu ve intrinsik yolak, yani mitokondriyal yol olmak üzere iki temel başlık altında incelenmektedir.

Ekstrinsik ve intrinsik yolaklar, apoptozun yürütücü evresini aktive ederek kaspaz-3 üzerinden hücre ölüm sürecini başlatır. Bu süreç DNA parçalanması, hücre iskeleti ve nükleer proteinlerin yıkımı, apoptotik cisimciklerin oluşumu ve fagositoz ile sonuçlanır (Martinvalet D vd., 2005).

Ligandın TNFR1 reseptöre bağlanmasının ardından hücre içinde kaspazlara bağlı sinyal kaskadı hızla aktive olmaktadır. Reseptörde bulunan ölüm domaini, Casp-8 ve Casp-10'un da içinde yer aldığı apoptotik proteinlerin ilgili bölgeye yönlendirilmesini sağlar. Mitokondri, intrinsik apoptotik yolun düzenlenmesinde merkezi bir rol üstlenmektedir. İntrinsik apoptotik süreçte mitokondriler; Smac/DIABLO, apoptoz indükleyici faktör ve sitokrom c gibi hücre ölümünü destekleyen proteinlerin kaynağı olarak görev yapmaktadır (Brenner C vd., 2006).

Hücrel stres, serbest radikal hasarı veya büyüme faktörü eksikliği gibi durumlarda Bcl-2 ailesine ait pro-apoptotik proteinler aktive olmaktadır. Bu süreç, mitokondri membran geçirgenliğinin artmasına ve mitokondriden sitokrom c ile AIF gibi apoptozu destekleyen proteinlerin sitoplazmaya salınmasına neden olur. Sitokrom c'nin hücre içine salınması ise apoptozom kompleksinin oluşumunu başlatarak intrinsik apoptotik yolun ilerlemesine katkı sağlar. Apoptozom kompleksinin oluşmasıyla birlikte Casp-9 aktive olur ve bu aktivasyon, devamında Casp-3'ün devreye girmesini sağlayarak apoptotik sürecin ilerlemesine yol açar.

Mitokondri, yalnızca intrinsik yolakta değil, ekstrinsik apoptotik yolun ilerleyişinde de etkili olabilmektedir. Ölüm reseptörlerinin uyarılmasıyla Casp-8 aktive olur ve bu kaspaz, pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyelerinden Bid'in aktivasyonunu sağlayarak mitokondri aracılı apoptotik süreci destekler (Brunelle JK vd., 2009).

Apoptozun farklı yolakları, sürecin ilerleyen aşamalarında yürütücü kaspazların aktive olduğu ortak bir basamakta birleşmektedir. Bu aşamada Casp-3, Casp-6 ve Casp-7 temel yürütücü kaspazlar olarak görev alır. Aktive olan bu kaspazlar, sitoplazmik endonükleazların devreye girmesini sağlar; hücre iskeleti proteinleri ve PARP gibi önemli hücrel yapıları parçalayarak

apoptotik hücrelerde karakteristik morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşmasına katkıda bulunur.

2.4. HSP27'nin Terapötik Önemi

HSP27, küçük molekül ağırlıklı ısı şoku proteinleri grubunda yer alan ve yaklaşık 12–43 kDa aralığında bulunan bir proteindir. HSP27, başlangıçta ısı şoku yanıtı ile ilişkili bir protein olarak tanımlanmış; ilerleyen çalışmalarda ise hasar gören proteinlerin yeniden katlanmasına destek olan bir şaperon görevi üstlendiği belirtilmiştir (Rogalla T vd., 1999).

HSP'ler, kanser gelişiminde rol alan onkoproteinlerin katlanmasını ve stabilitesini düzenleyerek farklı onkojenik yollarla ilişki kurar. Bu nedenle HSP hedefli yaklaşımlar, tümör progresyonunda etkili olan çeşitli proteinlerin ve yolların birlikte baskılanması bakımından avantaj sağlamaktadır (Xia Y vd., 2012).

HSP27'nin sadece ısı şokunda değil, oksidatif ve kimyasal stres gibi farklı stres koşullarında da hücreye yanıt katıldığı bildirilmiştir (Moran L vd., 1978). Oksidatif stres sırasında HSP27, glutasyon düzeyini artırıp hücre içi demir miktarını azaltarak ROS oluşumunun kontrol altında tutulmasına yardımcı olur (Mehlen P vd., 1997).

Kimyasal stres durumunda HSP27, apoptozla ilişkili farklı yollar üzerinde etkili olarak hücre ölümünün azalmasına katkı sağlayabilir. Bu etki hem mitokondriye bağlı süreçlerde hem de mitokondriden bağımsız mekanizmalarda görülebilmektedir. Özellikle kaspaz bağımlı apoptozu baskılaması, HSP27'nin programlanmış hücre ölümüne karşı koruyucu rolünü göstermektedir (Concannon ve ark., 2001). Bu nedenle HSP27'nin anti-apoptotik özelliği, doksorubisin ve gemsitabin gibi bazı kemoterapi ilaçlarına verilen hücreye yanıtı etkileyebilir. Bunun yanında HSP27'nin stres koşullarında aktin hücre iskeletinin düzenlenmesinde de görev aldığı, aktin polimerizasyonunu desteklediği ve aktin uçlarını kapatıcı bir protein gibi davranabildiği belirtilmektedir.

Isı şok proteinleri (HSP'ler), hücreye stres koşullarında protein katlanmasını stabilize ederek ve apoptotik sinyalleri baskılayarak hücre sağkalımını destekleyebilmektedir (Garrido C vd., 2006). Küçük ısı şok proteinleri ailesinin önemli bir üyesi olan HSP27 (HSPB1), sitokrom c'nin sitozole salınımını engelleyerek ve kaspaz aktivasyonunu baskılayarak mitokondriyal apoptozu inhibe edebilmektedir (Concannon CG vd., 2001).

Ayrıca HSP27'nin, Bax translokasyonunu engelleyerek ve apoptotik sinyallemeyi aşağı akımda bloke ederek tedaviye direnç gelişimine katkı sağladığı bildirilmiştir (Bruey JM vd., 2000). Bu

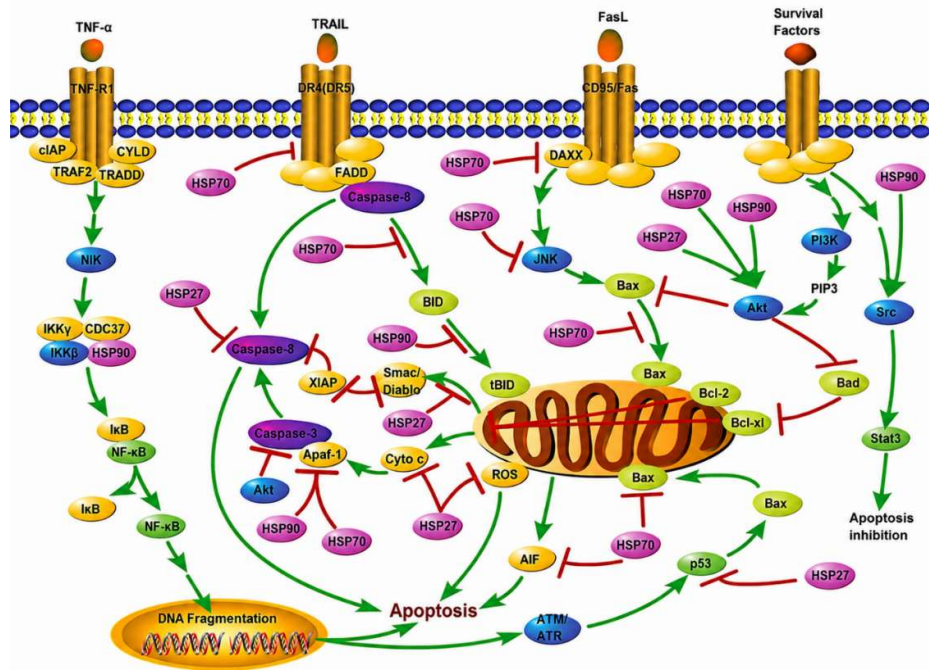
nedenle navitoclax ile hedeflenen mitokondriyal apoptotik yolun, HSP27 ekspresyon düzeyi veya fosforilasyon durumu tarafından fonksiyonel olarak etkilenebileceği düşünülmektedir (Parcellier A vd., 2003).

Stres yanıtıyla ilişkili HSP'ler arasında en fazla incelenen proteinler arasında yer alan HSP90 ve HSP70'tir. Bu proteinlerin ekspresyonu ya da aktivitesi kanser hücrelerinde normalin üzerinde seyretmekte, ayrıca farklı hücre ölümü uyaranlarına maruz kalındığında bu düzeylerin daha da artmaktadır. HSP90, HSP70 ve HSP27 güçlü anti-apoptotik özellik göstererek apoptozda görev alan temel moleküllerle etkileşir ve hücre ölümünü çeşitli aşamalarda baskılayabilir (Joly AL vd., 2010).

Preklinik düzeyde yapılan çalışmalar, HSP'lerin yüksek ekspresyonunun tümör büyümesini ve yayılım kapasitesini artırmasının yanı sıra kemoterapiye direnç gelişiminde de rol oynayabileceğini göstermiştir. Bu kapsamda HSP90, HSP70 ve/veya HSP27'nin inhibisyonu, kanser tedavisinde alternatif bir hedefleme yaklaşımı olarak öne çıkmaktadır. HSP70'in azaltılması, özellikle kanserleşmiş/transforme hücrelerde belirgin bir sitotoksik etki oluştururken, normal hücrelerde veya primer hücrelerde benzer bir etki görülmemektedir (Schmitt E vd., 2003).

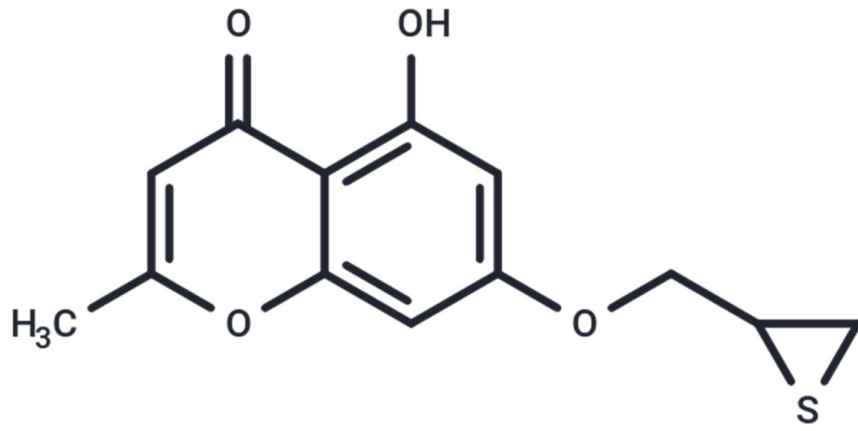
HSP70, apoptoz mekanizmasında ölüm reseptörlerinden başlayan sinyal iletiminden hücre ölümünü gerçekleştiren son basamaklara kadar birçok noktada etkili olabilmektedir. Bu süreçte mitokondriye bağlı apoptotik olayların öncesinde ve sonrasında rol oynayabilir. Ayrıca HSP70'in Bid bağımlı apoptotik yolakla da ilişkili olduğu belirtilmektedir. HSP70, TNF- α 'nın neden olduğu hücre ölümünü azaltırken, Bid geninin homozigot olarak çıkarıldığı MEF hücrelerinde bu koruyucu etkinin görülmediği bildirilmiştir. Bununla birlikte HSP70, aktif Casp-8'in Bid'i parçalamasını da engelleyebilir (Hui-qing X vd., 2008). Bir diğer önemli ısı şoku proteini olan HSP90, kanser hücrelerinde birçok onkoproteinin yapısal olarak korunmasında ve hücre sağkalımının sürdürülmesinde görev almaktadır. HSP90, ATP kullanarak görev yapan bir moleküler şaperon olup insan hücrelerinde başlıca HSP90 α ve HSP90 β izoformlarıyla temsil edilmektedir. Bu protein yapısal olarak iki alt birimden oluşan homodimer bir düzen gösterir. HSP90'ın fonksiyonel yapısı üç temel bölge üzerinden açıklanır. N-terminal kısım ATP bağlanması ve hidroliziyle ilişkiliyken, orta bölge ko-şaperonlar ve istemci proteinlerle etkileşimde görev alır. C-terminal bölüm ise HSP90'ın dimerleşmesini sağlayan bölge olarak tanımlanmaktadır (Sreedhar AS vd., 2004). Bu proteinin istemci

proteinlerinin önemli bir kısmı, kanserle ilişkili sinyal yollarında merkezi rol oynayan onkoproteinlerden oluşur (Hanahan D vd., 2011).



Şekil 2.5. Isı şok proteinlerinin apoptoz ve hücre sağkalım yollarındaki düzenleyici rolü

HSP27'yi hedefleyen ve kimyasal olarak 5-hidroksi-2-metil-7-(tiiran-2-ilmetoksi) kromen-4-on adıyla tanımlanan J2 inhibitörüdür. HSP27'nin şaperon işlevini azaltarak kanser hücrelerinin stres altında hayatta kalma kapasitesini sınırlayabilir. Bu yönüyle J2, kemoterapi ve radyoterapiye karşı gelişen direncin azaltılmasında umut vadeden bir aday olarak görülmektedir. J2 bileşiği, HSP27'nin oligomerizasyonunu bozarak fonksiyonel aktivitesini inhibe eden ve apoptotik sinyallemeyi güçlendirdiği bildirilen bir inhibitördür. HSP27'nin farmakolojik inhibisyonunun, pro-apoptotik proteinlerin serbestleşmesini kolaylaştırdığı ve kaspaz aktivasyonunu artırdığı deneysel modellerde gösterilmiştir. Bu nedenle navitoclax ile mitokondriyal apoptotik yolun farmakolojik olarak aktive edilmesi ve eş zamanlı olarak J2 aracılığıyla HSP27'nin baskılanması, anti-apoptotik direnç mekanizmalarının çift yönlü kırılmasına olanak sağlayabilecek rasyonel bir kombinasyon stratejisi olarak değerlendirilmektedir (Tse C vd., 2008).



Şekil 2.6. HSP27 İnhibitörü J2 molekülü

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında yürütülen tüm deneysel uygulamalar, Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü bünyesinde yer alan Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda ve Temel Bilimler Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Deneysel süreçler, ilgili laboratuvarların teknik altyapı olanakları ve standart çalışma protokolleri doğrultusunda yürütülmüş olup, tüm analizler kontrollü koşullar altında uygulanmıştır. Kullanılan yöntemler literatürle uyumlu şekilde seçilmiş ve elde edilen verilerin doğruluğunu sağlamak amacıyla gerekli tekrarlar yapılmıştır.

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan aletler ve cihazlar

Biyogüvenlik kabin	: Bil-ser B2 Class II
Buzdolabı	: Arçelik
CO ₂ inkübatörü	: Nüve EC 160
Derin dondurucu (-80 °C)	: Haer Medical
ELISA	: Epoch Biotek
ELISA yıkama	: ELx50, BioTek
Güç kaynağı	: Thermo EC 300 XL
Hassas terazi	: Shimadzu ATX224
Jel görüntüleme cihazı	: ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad)
Kabin	: Bil-ser B2 Class II
Kar makinesi	: Scotsman AF-20
Magnetik karıştırıcı	: Heidolph MR Hei-Standart
Mikrodalga fırın	: Arzum
Mikroskop	: Nikon Eclipse Ti2-U Inverted
Mini spin	: IKA mini G
Otoklav	: Zealway GR110DR
Otomatik pipet	: Socorex
PCR cihazı	: Bio-Rad C1000 Touch
pH metre	: Radiometer meterlab PHM 210
Real-time PCR cihazı	: Qiagen Rotor Gene 6flex

Saf su cihazı	: Nüve
Santrifüj	: Hettich Santrifüj 220, Hettich 220R, Beckman
Su banyosu	: Memmert
Şarjlı otomatik pipet	: Isolab
Yatay Elektroforez tankı	: Thermo Owl Easycast B2-BP
Vorteks	: Heidolph Reaxtop

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Aquaguard-1	: Vivacell Bioscience
Aquaguard-2	: Vivacell Bioscience
Bradford Reagent	: Sigma
BAX ELISA kit	: Cusabio
BCL-2 ELISA kit	: Cusabio
CASP3 ELISA kit	: Cusabio
cDNA sentez kiti	: iScript™ cDNA Kit, Biorad
Cell Proliferation Kit (MTT)	: Biological Industries
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	: Capricorn scientific
Fetal Bovine Serum	: Biological Industries
Minimum Essential Medium	: Biowest
L-Glutamin	: Serena
Penisilin-Streptomisin	: HyClone
RNA izolasyon Kiti	: Thermo Scientific
RT-qPCR Kit	: SYBR Green PCR Master Mix, Qiagen
Tris base	: Sigma
Tripsin-EDTA	: Serana

3.1.3 Hücre Hattı

Çalışmada kullanılan A549 (insan akciğer adenokarsinomu hücre hattı) ve HGF-1 (İnsan gingival fibroblast hücre hattı) ATCC'den ticari olarak tedarik edilmiştir.

RNA izolasyonu ve cDNA sentezi (Katalog No: 4368814) işlemleri, üretici firmanın sağladığı protokoller doğrultusunda Thermo Scientific (ABD) ürünleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Navitoclax (ABT-263) ve J2 (S3404) Selleckchem'den satın alınmıştır. Her iki bileşik de DMSO'da çözülmüş ve stok solüsyonlar -80°C'de saklanmıştır.

İnsan BAX (Katalog numarası: BTLAB-E4813Hu), CASP-3 (Katalog numarası: BTLAB-E4804Hu), BCL-2 (Katalog numarası: BTLAB-E4811Hu) ve HER2 (Katalog numarası: BTLAB-E4809Hu) ELISA kitleri Bioassay Technology Laboratory (BT Lab, Shanghai, China) firmasından satın alınmıştır.

Diğer tüm kimyasal reaktifler Merck ve Sigma Aldrich'ten temin edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Hücre Kültürü

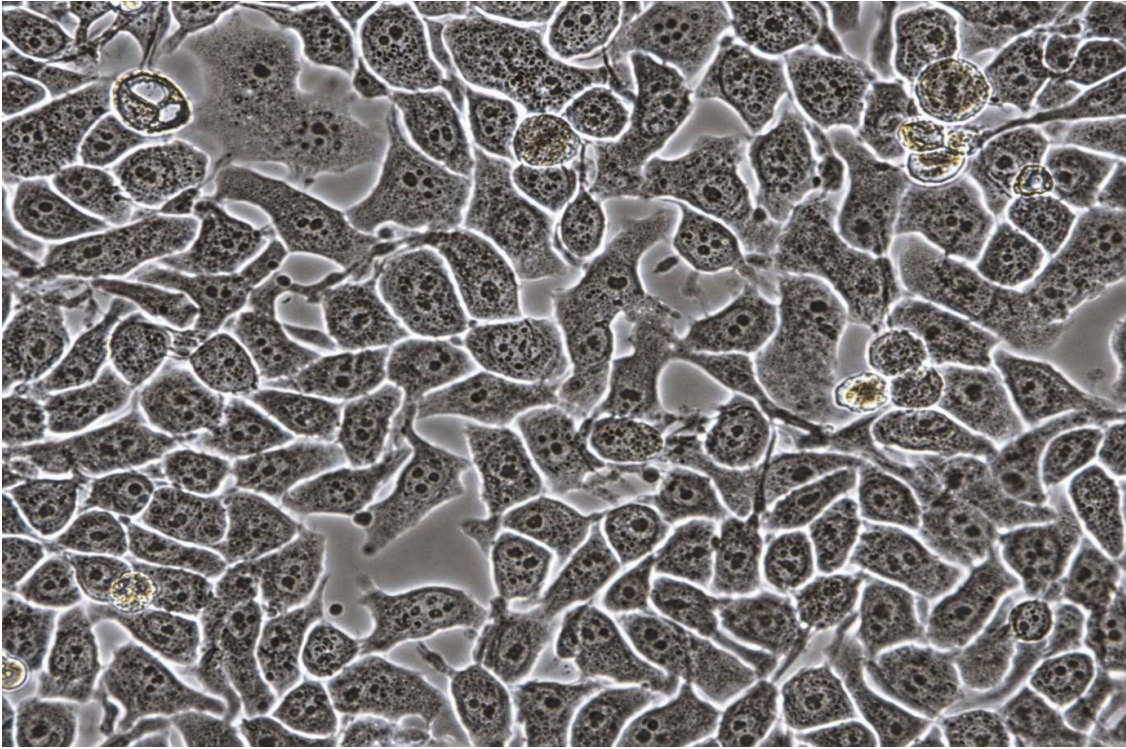
Hücre kültürü çalışmaları küçük hücreli dışı akciğer kanseri A549 (Adenokarsinom hücre hattı) ve HGF-1 hücre hattı %5 FBS (fetal sıgır serumu), %1 glutamin, %1 sodyum pirüvat ve %1 penisilin streptomisin içeren Minimum Essential Medium (MEM) içerisinde gerekli fizyolojik koşulları sağlamak üzere 37°C 'de %5 CO₂ oranında inkübe edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarının tamamı, kontaminasyon riskini en aza indirmek amacıyla aseptik tekniklere uygun olarak yürütülmüş olup inkübatör ortamında mikrobiyal kontaminasyonu önlemek amacıyla steril hava dolaşımı sağlanmış, ayrıca iç ortamın dış atmosfer ile etkileşimini en aza indirmek amacıyla izole edici cam bariyer sistemi kullanılmıştır. Kabinin sterilizasyonunu sağlamak amacıyla kullanım öncesi ve sonrasında ultraviyole (UV) ışık kaynağı yaklaşık 15 dakika süreyle uygulanmış ve her kullanımda %70'lik etanol ile uygun şekilde temizlenerek kontaminasyon riskinin önüne geçilmiştir.

Hücrelerin, uygun besiyeri ve inkübasyon şartlarında kontrollü bir şekilde gelişim ve çoğalma gösterdiği gözlenmiş ve hücreler 75 cm² T-flask yüzeyinde yaklaşık %90 konfluens düzeyine ulaştığında, hücre yoğunluğunu kontrol altına almak amacıyla pasajlanmıştır. T-flask içerisindeki mevcut besiyeri uzaklaştırılmış, ardından hücrelerin ayrılması için 5 ml (%0.25 tripsin, %0.02 EDTA) içeren Tripsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve 7 dakika süreyle inkübatörde bekletilmiştir. Inkübasyon süresi sonunda tripsin aktivitesinin inhibe edilmesi için elde edilen hücre süspansiyonu %10 Fetal Bovine Serum, L-glutamin ve penisilin-streptomisin içeren MEM (Minimum Essential Medium) besiyerine aktarılmıştır.

Hücre süspansiyonu 800 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek hücrelerin çökmesi sağlanmış bu işlem sonrası oluşan hücre pelletinin üzerindeki süpernatant uzaklaştırılmıştır. Hücrelerin yoğunluğuna göre 2 ya da 3'e bölünmesine karar verilmiştir. %1 L-glutamin, %1 Pen-Strep ve %10 FBS içeren MEM 20 ml falcon tüpüne eklenerek serolojik pipet ile homojen hale gelinceye kadar pipetaj yapılmıştır. Hücre süspansiyonu 75 cm² T-flasklara eşit hacimlerde dağıtılmış ve %90 konfluens düzeyine ulaşınca kadar düzenli aralıklarla besiyeri değişimi yapılmıştır. Hücreler yeterli sayıya ulaştıklarında çalışmalarda kullanılmıştır.

Yeterli konfluens ve proliferasyon düzeyine ulaşan hücreler, ileri deneysel uygulamalarda kullanılmak üzere sıvı azot koşullarında stoklanmıştır. Hücre dondurma işleminde T-flasklarda pasajlanan hücreler 800 ×g'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüş ve süpernatant aspire edilmiştir. Stoklanacak kriyo tüp sayısına bağlı olarak, her bir tüp için 900 µL Fetal Bovine Serum üzerine 100 µL DMSO eklenerek 1 mL'lik kriyoprezervasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre stokları hızlı bir şekilde -80°C'de muhafaza altına alınmış ve sonraki kullanımlar için saklanmıştır.



Şekil 3.1. A549 Hücre hattının mikroskopik görüntüsü

Tez çalışması kapsamında dondurulmuş hücreler ihtiyaç olması durumunda yeniden kültüre alınmıştır. Hücreler kullanım öncesinde -80°C'den çıkarılarak çözündürülmüş Aseptik koşullar sağlanarak falcon tüpüne transfer edilen hücreler, 15 ml MEM içerisinde 800 xg'de 5 dakika santrifüj edilerek DMSO'nun sitotoksik etkilerinden uzaklaştırılmıştır. Hücre çökeltisi içerisine %1 L-glutamin, %1 Pen-Strep ve %10 FBS ihtiva eden 8 ml MEM eklenerek pipetaj yapılmış, bu işlemin ardından elde edilen hücre süspansiyonu 75 cm² T-flasklara aktarılmış ve uygun inkübasyon koşullarında inkübe edilmiştir.

Hücreler yeterli proliferasyon düzeyine ulaştıktan sonra deneysel çalışmalarda uygulanmak üzere, mevcut besiyerinin uzaklaştırılmasının ardından hücrelerin T-flask yüzeyinden ayrılması amacıyla 5 ml %0,25 Tripsin-%0,02 EDTA çözeltisi uygulanmış 7 dakika inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda %10 FBS (Fetal Bovine Serum), %1 L-glutamin, %1 penisilin streptomisin bulunan MEM (Minimum Essential Medium) steril falcon tüpü içerisine 10 ml konulmuş ve inkübatörden çıkarılan tripsin-EDTA (%0.25 Tripsin,%0.02 EDTA) bulunan hücreler falcon tüpü içerisine serolojik pipet ile aktararak santrifüj yapılmıştır.

Santrifüj işlemini takiben oluşan hücre peleti 5 ml MEM ile süspanse edilmiş, pipetaj yapılarak homojen bir hücre süspansiyonu hazırlanmış olup elde edilen süspansiyondan 10 µL alınarak kontrollü bir şekilde thoma lamına aktarılmış ve Invert mikroskopta incelenerek hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Hücre sayısı, sayım yapılan karede belirlenen hücre sayısının besiyeri miktarı ve 10⁴ katsayısı ile çarpılması yoluyla hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. İn vitro hücre kültürü çalışmalarında steril koşullar altında hücre ekimi ve deneysel uygulama sürecinin gerçekleştirilmesi

3.2.2 Sitotoksik Etki Araştırılması

BCL-2 inhibitörü olan Navitoclax (ABT-263) vial içerisinde bulunan 10 mg'lık formuna 1,026 mL DMSO ilave edilerek çözündürülmüş ve homojenizasyon amacıyla vortekslenmiştir. 1 mg miktarındaki HSP27 inhibitörü J2 (Kat. No: PC-63191), 378 µL DMSO ile çözündürülerek 0,01 M konsantrasyonda ana stok çözeltisi hazırlanmıştır.

3.2.3 Hücre Canlılık testi

A549 (Akciğer kanseri hücre hattı) ve HGF-1 (Human Gingival Fibroblast) hücreleri, her bir kuyucukta 2×10^4 hücre olacak biçimde yoğunlukları ayarlanarak, 96 kuyucuklu hücre kültürüne uygun (TC-treated) plakalara %1 L-glutamin, %1 penisilin streptomisin bulunan

MEM (Minimum Essential Medium) bulunan besiyeri içerisinde 200 µL hacimde ekilmiştir. Ekimi yapılan hücreler %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş koşullar altında 37 °C sıcaklıkta 24 saat süreyle inkübe edilmiştir.

Konsantrasyon ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkilerin incelenmesi amacıyla, A549(Akciğer kanseri hücre hattı) ve HGF-1 (Human Gingival Fibroblast) hücre hatlarında BCL-2 ‘nin inhibitörü olan Navitoclax ve HSP27’nin inhibitörü olan J2 molekülü’nün bireysel, kombine ve tersine kombine olacak şekilde konsantrasyon etkilerinin analiz edilmesi ile ilgili bir çalışma yapılmıştır. Navitoclax ve J2 molekülünün konsantrasyona ve zamana bağlı değişimlerini incelemek üzere 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde Navitoclax için (40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 µM), J2 molekülü için (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.156 µM) çeşitli konsantrasyonlar üçlü tekrarlar şeklinde 96 kuyucuklu TC-treated plaklar içerisinde gerçekleştirilmiştir. Birinci plaka A549 hücre hattına ait olup, Navitoclax, J2, Navitoclax–J2 kombinasyonu ve ters kombinasyon uygulamalarını içerecek şekilde tekrarlı olarak tasarlanmıştır. İkinci plaka ise HGF-1 hücre hattı için aynı deneysel düzeni yansıtacak biçimde hazırlanmıştır. Tanımlanan zaman aralıklarının sonunda, hücre canlılığının tespit edilebilmesi için tüm kuyucuklara 100 µL MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) eklenmiş ve %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş koşullar altında 37 °C sıcaklıkta 2,5 saat inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda izopropanol ile hazırlanan solvent kullanılarak formazan kristalleri çözündürülmüş ve hücre canlılığı 570 nm’de ELISA mikropilaya okuyucusu kullanılarak değerlendirilmiştir.

Tablo3.1. Navitoclax ve J2'nin uygulanan doğru orantılı konsantrasyon aralıkları

Konsantrasyon	Navitoclax (μM)	J2 (μM)	Kombinasyon
1	40	10	40 + 10
2	20	5	20 + 5
3	10	2,5	10 + 2.5
4	5	1,25	5 + 1.25
5	2,5	0,625	2,5 + 0,625
6	1,25	0,3125	1,25 + 0,3125
7	0,625	0,156	0,625 + 0,156

Doğru orantılı kombinasyonların yanı sıra, ajanların farklı doz dağılımlarındaki etkilerini değerlendirmek amacıyla ters orantılı kombinasyonlar da hazırlanmış ve uygulanan konsantrasyon aralıkları Tablo 3.2'de sunulmuştur.

Tablo 3.2. Navitoclax ve J2'nin uygulanan ters orantılı konsantrasyon aralıkları

Konsantrasyon	Navitoclax (μM)	J2 (μM)	Kombinasyon
1	40	10	40 + 0,156
2	20	5	20 + 0,3125
3	10	2,5	10 + 0,625
4	5	1,25	5 + 1,25
5	2,5	0,625	2,5 + 2,5
6	1,25	0,3125	1,25 + 5
7	0,625	0,156	0,625 + 10

Konsantrasyon ve zamana bağlı deneysel verilerin hücre canlılık analizi sonucunda elde edilen IC_{50} değerleri CompuSyn programı üzerinden hesaplanmıştır. IC_{50} değeri en iyi sinerjik etkiyi 24 saatlik süre içerisinde 2,5 μM konsantrasyonda göstermiştir. Gerçekleştirilen analiz doğrultusunda, sonraki hücre kültürü çalışmaları bu veriler temel alınarak sürdürülmüştür.

3.2.4 RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

A549 ve HGF-1 hücre hatlarında, belirlenen konsantrasyon ve inkübasyon sürelerinin ilgili genlerin ekspresyon düzeyleri üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Yürütülen çalışma steril kabin içerisinde TC-treated petrilere de dahil olmak üzere her bir deney grubu için petrilere 3×10^6 hücre ekilmiş hücrelerin yüzeye tutunması amacıyla uygun inkübasyon koşulları altında 24 saat bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda belirlenen konsantrasyonlarda faz 3 çalışmaları gerçekleştirilen Navitoclax ile j2 molekülü ve bunların kombinasyonu petrideki hücrelere uygulanmış ardından hücreler aynı koşullar altında inkübasyona devam ettirilmiştir. İnkübasyon süresinin tamamlanmasının ardından hücrelerden RNA saflaştırılması, Thermo Scientific RNA izolasyon kiti kullanılarak standart prosedürlere uygun olacak biçimde gerçekleştirilmiştir.

- Petri kaplarında kùltive edilen hücreler steril cell scraper ile buzun üzerinde yüzeyden ayrılmış, besiyeri ile falcon tüplerine transfer edilerek maksimum xg'de 10 dakika boyunca santrifüj yapılarak hücre peleti elde edilmiştir.
- Süpernatant santrifüj işlemi sonrası aspire edilerek uzaklaştırılmış ve hücre sedimenti PBS ile yıkanarak eppendorf içerisine alınmıştır.
- Eppendorf tüplerine alınan numuneler 500 xg' de 5 dakika santrifüj edilmiş santrifüj işleminin ardından süpernatant atılarak 600 µL lizis tamponu ile 300 µL proteinaz K eklenerek her numune vortekslenmiş bir şekilde işleme devam edilmiştir.
- Numuneler 14.000 xg'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant yeni bir tüpe transfer edilmiş, ardından 360 µL saf etanol ilavesiyle 12.000 rpm'de yeniden santrifüj edilmiştir.
- Süpernatanttan 700 µL alınarak QIAshredder kolona aktarılmış ve 12.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek numunenin kolonda tutulması sağlanmıştır. Santrifüj ardından oluşan süpernatant uzaklaştırılmış, kalan süpernatanttan 600 µL alınarak aynı koşullarda yeniden santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.
- Her bir kolona 700 µL wash buffer eklenerek 1 dakika 12.000 rpm' de santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır.

- Her bir kolona 600 µL wash buffer 2 eklenerek 1 dakika 12.000 rpm’de santrifüj yapılarak süpernatant atılmıştır.
- Tüm kolonlar boş bir şekilde 1 dakika boyunca maksimum xg’de santrifüj edilmiştir.
- Maksimum santrifüj işleminin ardından eppendorf içerisine 100 µL nükleaz içermeyen ultra safsu eklenilmiş 12.000 rpm’de santrifüj yapılarak RNA elue edilmiştir.

RNA saflaştırma işlemini takiben, gen ekspresyon analizlerinde kullanılmak üzere iScript cDNA Synthesis kiti kullanılarak ters transkripsiyon yoluyla cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA numuneleri, RT-qPCR analizlerinde kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edilmiştir.

Tablo 3.3. cDNA Sentezi için Reaksiyon İçeriği

Döngü Adı	Sıcaklık	Süre
Primer bağlanması	25 °C	5 dk
Ters transkripsiyon	46 °C	20 dk
RT inaktivasyonu	95 °C	1 dk

3.2.5 RNA ve cDNA’nın Spektrofotometrik Analizi

cDNA numunelerinin konsantrasyon ve saflık düzeyleri gen ekspresyon ve analizlerinin güvenilirliği açısından tespit edilmiştir. cDNA numunelerinin konsantrasyon ve saflık tayini, farklı dalga boylarında ölçülen absorban değerleri esas alınarak yapılmış olup, 260 nm nükleik asit miktarını, 280 nm protein kontaminasyonunu ve 320 nm ise nükleik asitlere ait olmayıp partiküllerin varlığını yansıtmaktadır. Nükleik asit örneklerinin konsantrasyon ve saflık analizleri, ELISA mikropate okuyucu cihazına entegre edilen Take3 mikro hacim plakası aracılığıyla belirlenmiştir. Elde edilen değerlerin literatürde kabul edilen aralıklar içerisinde

olması, örneklerin yüksek saflıkta olduğunu ve RT-qPCR gibi ileri moleküler analizlerde kullanılmaya uygun olduğunu göstermiştir.

Tablo 3.4. Nükleik Asit Saflık Değerlendirmesinde Kullanılan Oranlar

Nükleik asit	A260/A280 Oranı	Değerlendirme
RNA	≥ 2.0	Yüksek saflık
RNA	<1.8	Protein kontaminasyonu
DNA	≈ 1.8	Yüksek saflık
DNA	<1.7	Protein kontaminasyonu

3.2.6 RT-qPCR Yöntemi ile Gen Ekspresyon Düzeylerinin Analizi

Tez çalışması kapsamında A549 ve HGF-1 hücre hattının IC_{50} değerinde navitoclax ve J2 molekülleri için ters orantılı kombinasyonda 0,625 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 dozunda, konsantrasyonda gösterdiği belirlenmiş bu faktörler belirtilen hücre hatlarında kültüre alınarak belirlenen konsantrasyonlarda RNA saflaştırması yapılmış ardından ters transkripsiyonla cDNA sentezlenmiştir. Bu araştırmada hücrel apoptotik süreçlerin ve sinyal yollarının değerlendirilmesi amacıyla BAX, BCL2, CASP9, CTNNB1 ve APAF-1 genlerinin ekspresyon düzeyleri analiz edilmiştir. RT-qPCR analizlerinde elde edilen verilerin normalize edilmesinde referans gen olarak ACTB tercih edilmiştir.

Primerlerin hedef DNA dizisine özgül bağlanması ve PCR'nin verimli gerçekleşmesi için temel tasarım kurallarına uyulmuştur. Primerlerin uzunluğu 18-25 baz çifti olacak şekilde seçilmiş, GC içeriğinin %40 ile %60 arasında olmasına özen gösterilmiştir. Forward ve reverse erime sıcaklıklarının birbirine yakın olması önem taşımakta olup, annealing sıcaklığı bu değerlere göre optimize edilmiştir. Düşük annealing sıcaklıklarında primerlerin non-spesifik bağlanma eğilimi artarak hedef dışı amplifikasyon ürünlerinin oluşmasına sebep olurken, yüksek

annealing sıcaklıklarında primer-şablon etkileşiminin azalması amplifikasyon etkinliğini sınırlamaktadır. Genellikle annealing sıcaklığı, primerlerin T_m değerinden 3–5°C daha düşük olacak biçimde seçilmiştir.

Reaksiyon veriminin düşmemesi adına primerler arasında primer-dimer yapılarının oluşmamasına dikkat edilmiş böylece yanlış ürün oluşmasının önüne geçilmiştir. RT-qPCR çalışmalarında, amplicon uzunluğunun genellikle 100–300 baz çifti aralığında olmasının reaksiyon etkinliğini arttırmıştır. Primer dizileri, Homo sapiens'e ait gen sekansları referans alınarak NCBI GenBank veri tabanından elde edilen bilgiler doğrultusunda oluşturulmuş ayrıca tez çalışmasında kullanılan primerler Metabion firmasından temin edilmiştir

Tablo 3.5. Hedef genlere ait primer dizileri

Gen	Forward Primer	Reverse Primer	Erişim numarası
BAX	AGCAGATCATGAAGACAGGG	GAAGTTGCCGTCAGAAAACA	NM_138764
CASP-9	CTGTTTCAGGCCCCATATGAT	CCACTGGGGTAAGGTTTCT	NM_001229.5
BCL2	TATCTGGGCCACAAGTGAAG	ATTCGACGTTTTGCCTGAAG	NM_000657
CTNNB1	CTGAGGAGCAGCTTCAGTC	CAGAGAAGGAGCTGTGGTAG	NM_001098209.2
ACTB	CACCATGGATGATGATATCGC	GAATCCTTCTGACCCATGCC	NM_001101
APAF1	TCTTCCAGTGTAAGGACAGT	AACCGTGTGCAAAGATTCTG	NM_001160.3

Çalışmada kullanılan genler için uygun annealing sıcaklığının belirlenmesi amacıyla gradient PCR yöntemi uygulanmış, farklı sıcaklık değerlerinde elde edilen amplifikasyon sonuçları analiz edilerek en yüksek özgülük ve verimli sıcaklık değeri belirlenmiştir. Bu sıcaklık değerleri uygulanarak RT-qPCR değerlendirmesi yapılmıştır. RT-qPCR analizinin sonucunda BAX, BCL-2, ACTB primerlerinin annealing sıcaklığı 56°C, CAS9, APAF-1 ve CTNNB1 için 45°C belirlenmiştir.

Tablo 3.6. RT-qPCR sıcaklık döngüsü

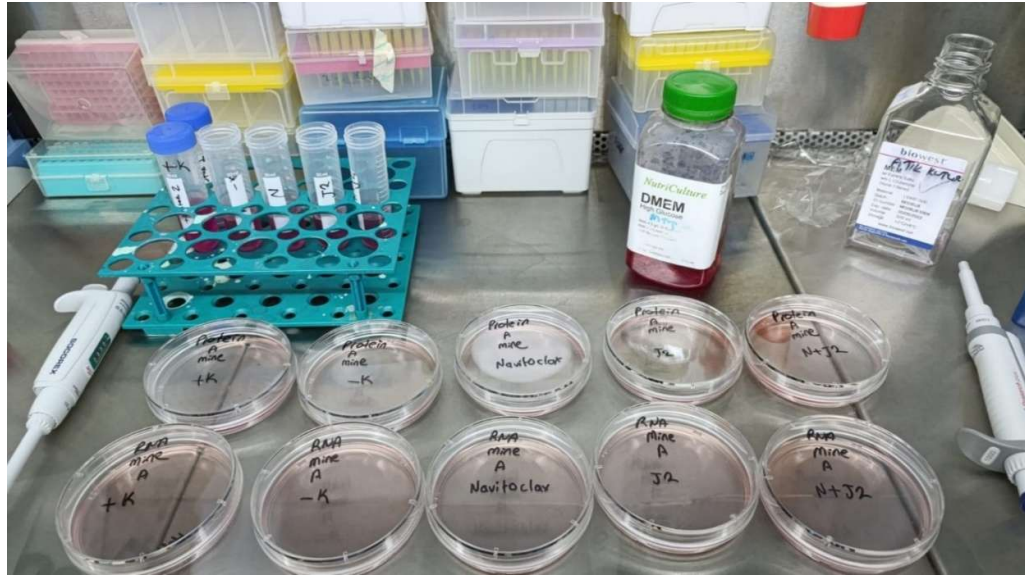
Döngü adı	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95 °C	1 dk	1
Denatürasyon	95 °C	20 sn	-
Bağlanma	45-50°C	30 sn	34
Uzama	72°C	45 sn	-
Bekleme	4 °C	∞	10

3.2.7 Protein ekstraksiyonu

Çalışma kapsamında, belirtilen hücre hatlarında sinerjik etkinin en belirgin olduğu konsantrasyonlarda BAX, BCL-2 ve CASP3 proteinlerinin miktarları değerlendirilmiştir. Steril çalışma ortamında TC-treated petri kaplarına kontrol grupları da dahil edilerek her bir deney grubu için 3×10^6 hücre inokülasyonu gerçekleştirilmiş; Hücreler uygun inkübasyon koşullarında inkübe edildikten sonra belirlenen konsantrasyonda ilaç uygulanmış 24 saatin sonunda protein ekstraksiyonu belirtilen protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

- TC-treated petri kaplarında aseptik şartlar altında steril cell scraper kullanılarak protein bütünlüğünün korunması için buz üzerinde yüzeyden dikkatlice ayrılmış; ardından elde edilen hücre süspansiyonu maksimum xg’de 10 dakika santrifüj yapılarak hücre sedimenti elde edilmiştir.
- Santrifüj sonrası üst faz (süpernatant) uzaklaştırılmış, hücre çökteltisi PBS ile yıkandıktan sonra Eppendorf tüplerine transfer edilmiş ve 500 xg’de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

- Santrifüj sonrası PBS uzaklaştırılmış ve hücre pelletine 1000 µL T-PER (Tissue Protein Extraction Reagent) tamponu eklenmiştir. Hücre lizisinin etkin şekilde gerçekleşmesi amacıyla örnekler pipetaj yapılmış ardından steril şırınga ile 10 defa çek-bırak işlemine tâbi tutulmuştur.
- Lizis işleminin ardından örnekler 14.000 xg'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst fazda bulunan süpernatant kısmı toplam protein fraksiyonu olarak ayrılmıştır.
- Elde edilen protein numuneleri Eppendorf tüplerinde aliketlenerek protein analizlerinde kullanılmak üzere uygun koşullarda saklanmıştır.



Şekil 3.3. İn vitro hücre kültürü deneylerinde kullanılan kontrol ve ilaç uygulama gruplarının hazırlanması.

3.2.8 ELISA

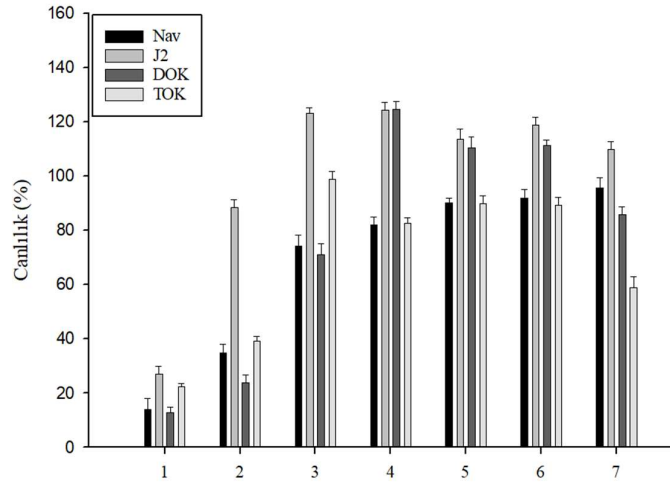
Protein ekstraksiyonu sonrasında elde edilen süpernatant fraksiyonları, toplam protein içeriğinin belirlenmesi amacıyla Bradford protein tayini yöntemiyle kantitatif olarak analiz edilmiş ardından elde edilen sonuçlara göre örnekler standardize edilerek Bax, Bcl-2 ve Casp-3 protein düzeylerinin belirlenmesi amacıyla ELISA analizi uygulanmıştır. Hazırlanan örnekler, üretici firma protokolüne uygun olarak Bax, Bcl-2 ve Casp-3'e özgü BT Lab firmasına ait ELISA kitleri kullanılarak analiz edilmiştir. Standartlar ve örnekler ilgili kuyucuklara ilave

edilmiş, inkübasyon ve yıkama basamakları tamamlandıktan sonra substrat çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyon stop solüsyonu ile sonlandırılmış ve absorbans değerleri microplate reader cihazı kullanılarak 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Elde edilen OD değerleri standart eğri üzerinden değerlendirilerek protein düzeyleri belirlenmiştir.

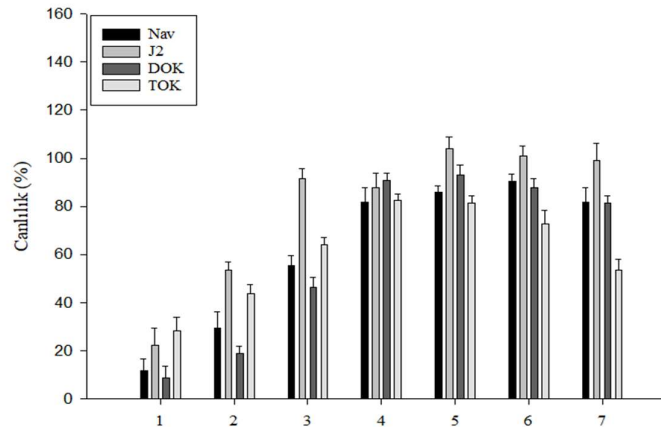
4. BULGULAR

4.1. Canlılık Testi

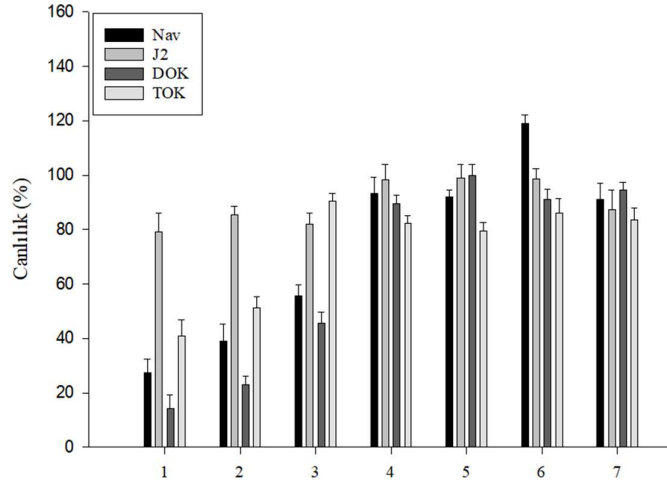
Navitoclax ve J2'nin ayrı ayrı kombinasyon ve tek başına uygulaması, A549 ve HGF-1 hücre hattı üzerinde, 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresi içerisinde MTT canlılık testi yapılarak gerçekleştirilmiştir. 570 nm'de absorbans elde edilen veriler ile "hücre canlılık yüzdeleri" hesaplanmış ve bu hesaplamalar sonucunda Şekil 4.1, Şekil 4.2 Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te yer alan grafiklerdeki bulgular elde edilmiştir.



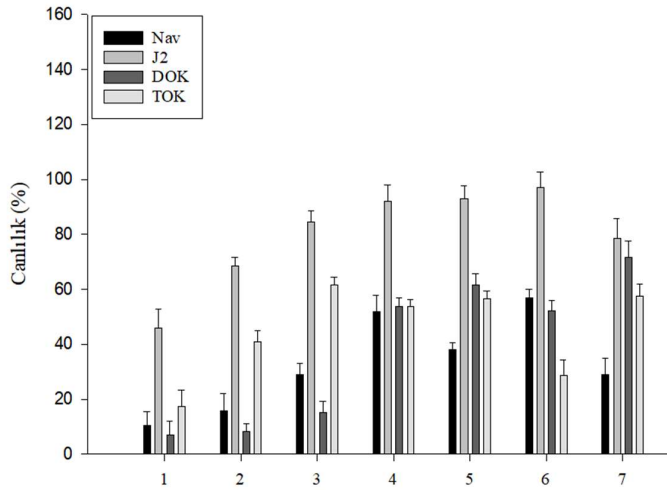
Şekil 4.1. A549 hücre hattında doğru orantılı ve ters orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonlarının 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücre canlılığı üzerindeki etkileri



Şekil 4.2. A549 hücre hattında doğru orantılı ve ters orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonrasında hücre canlılığı üzerindeki etkileri



Şekil 4.3. HGF-1 hücre hattında doğru orantılı ve ters orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonlarının 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücre canlılığı üzerindeki etkileri



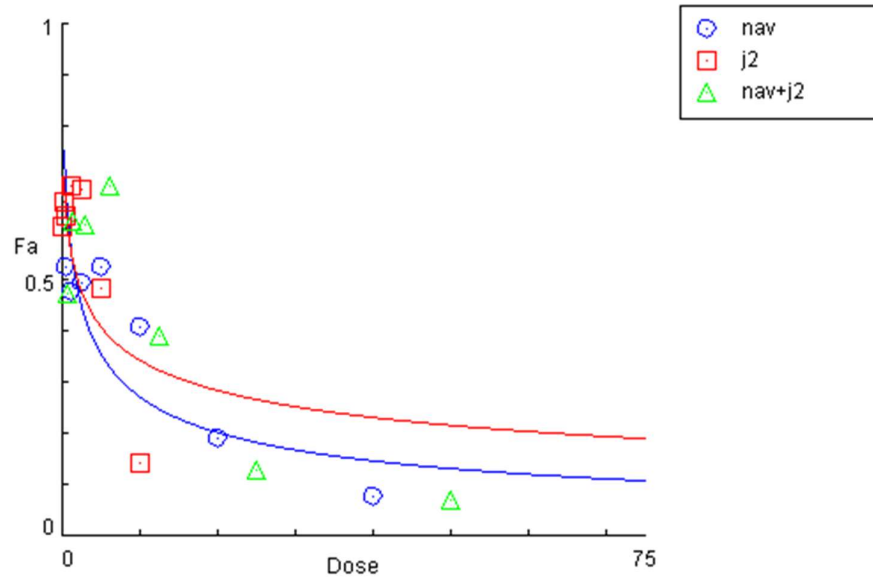
Şekil 4.4. HGF-1 hücre hattında doğru orantılı ve ters orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonlarının 48 saatlik inkübasyon sonrasında hücre canlılığı üzerindeki etkileri

4.2. Kombinasyonel Etki Değeri

A549 ve HGF-1 hücre hatlarına uygulanan Navitoclax, J2 ve bu ajanların kombinasyonlarına ait 24. ve 48. saat absorbans değerleri kullanılarak CompuSyn programı ile kombinasyon etki indeksi (CI) belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.1, Bkz. Tablo 4.2, Bkz. Tablo 4.3, Bkz. Tablo 4.4)

Tablo 4.1. 24. Saat A549 hücre hattı üzerine Navitoclax, J2 ve doğru orantılı kombinasyon uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri

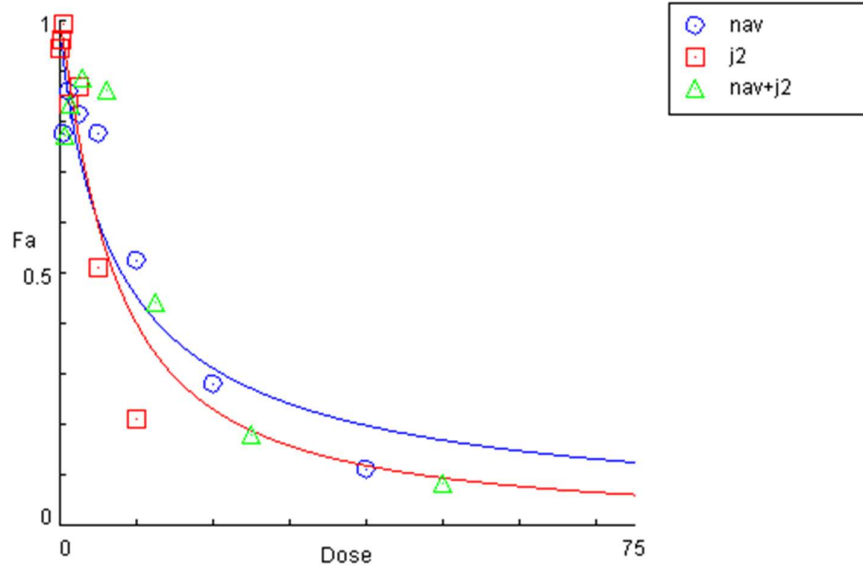
N+J2 (μ M)	CI	Etki
40 + 10	0,239	Güçlü sinerjik etki
20 + 5	0,413	Sinerjik etki
10 + 2.5	3,057	Antagonistik etki
5 + 1.25	16,471	Çok güçlü antagonistik etki
2,5 + 0,625	4,249	Antagonistik etki
1,25 + 0,3125	2,196	Antagonistik etki
0,625 + 0,156	0,359	Güçlü sinerjik etki



Şekil 4.5. A549 hücre hattında 24 saatlik Navitoclax, J2 ve kombinasyon tedavilerine ait doz-etki eğrileri temelinde kombinasyon indeks (CI) değerlerinin değerlendirilmesi

Tablo 4.2. 48. Saat A549 hücre hattı üzerine Navitoclax, J2 ve doğru orantılı kombinasyon uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri

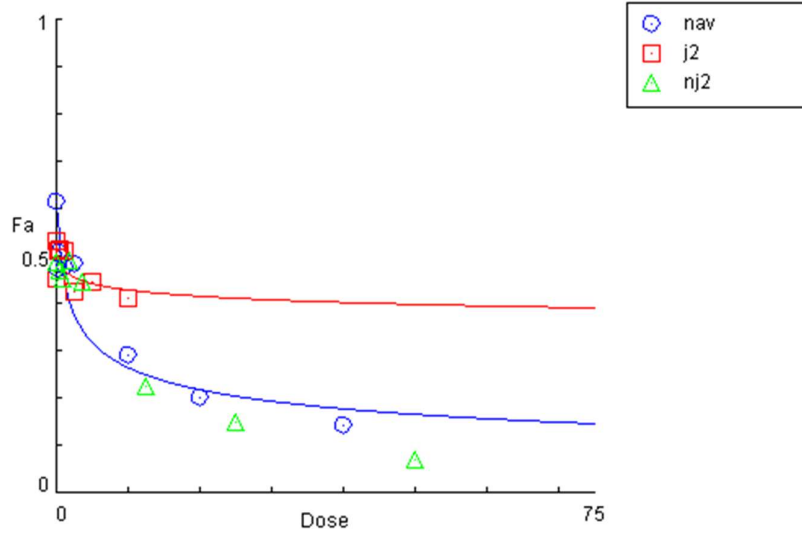
N+J2 (μM)	CI	Etki
40 + 10	0.487	Sinerjik etki
20 + 5	0.622	Sinerjik etki
10 + 2.5	1.237	Antagonistik etki
5 + 1.25	6.143	Antagonistik etki
2,5 + 0,625	3.848	Antagonistik etki
1,25 + 0,3125	1.191	Antagonistik etki
0,625 + 0,156	0.381	Güçlü sinerjik etki



Şekil 4.6. A549 hücre hattında 48 saatlik Navitoclax, J2 ve kombinasyon tedavilerine ait doz-etki eğrileri temelinde kombinasyon indeks (CI) değerlerinin değerlendirilmesi

Tablo 4.3. 24. Saat HGF-1 hücre hattı üzerine Navitoclax, J2 ve doğru orantılı kombinasyon uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri

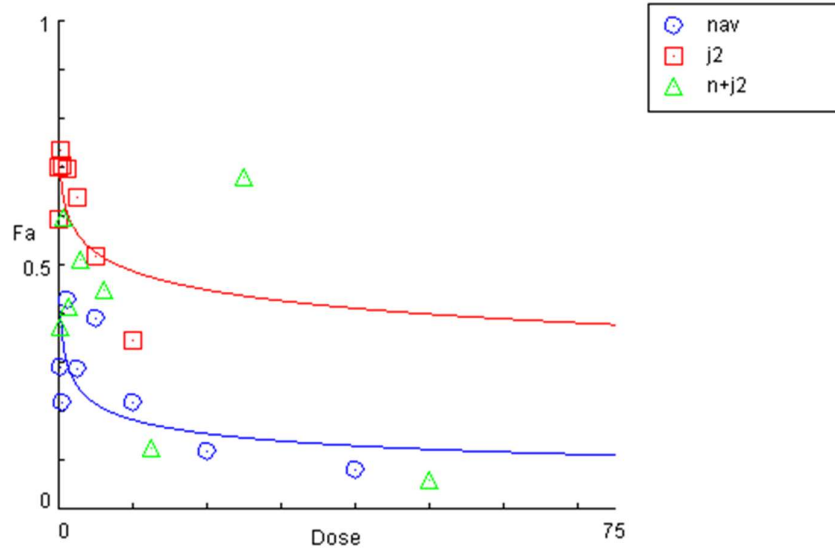
N+J2 (μ M)	CI	Etki
40 + 10	0.058	Çok güçlü sinerjik etki
20 + 5	0.285	Güçlü sinerjik etki
10 + 2.5	0.569	Sinerjik etki
5 + 1.25	2.499	Antagonistik etki
2,5 + 0,625	3.528	Antagonistik etki
1,25 + 0,3125	0.713	Sinerjik etki
0,625+0,156	0.492	Güçlü sinerjik etki



Şekil 4.7. HGF-1 hücre hattında 24 saatlik Navitoclax, J2 ve kombinasyon tedavilerine ait doz-etki eğrileri temelinde kombinasyon indeks (CI) değerlerinin değerlendirilmesi

Tablo 4.4. 48. Saat HGF-1 hücre hattı üzerine Navitoclax, J2 ve doğru orantılı kombinasyon uygulaması sonucu hesaplanan CI değerleri

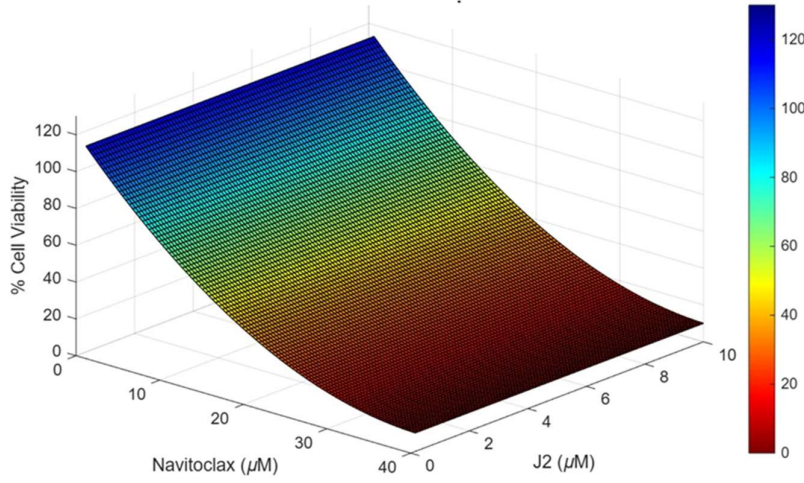
N+J2 (μ M)	CI	Etki
40 + 10	0.050	Çok güçlü sinerjik etki
20 + 5	0,308	Sinerjik etki
10 + 2.5	0.224	Güçlü sinerjik etki
5 + 1.25	40,56	Çok güçlü antagonistik etki
2,5 + 0,625	48.80	Çok güçlü antagonistik etki
1,25 + 0,3125	6.223	Antagonistik etki
0,625 + 0,156	39.16	Çok güçlü antagonistik etki



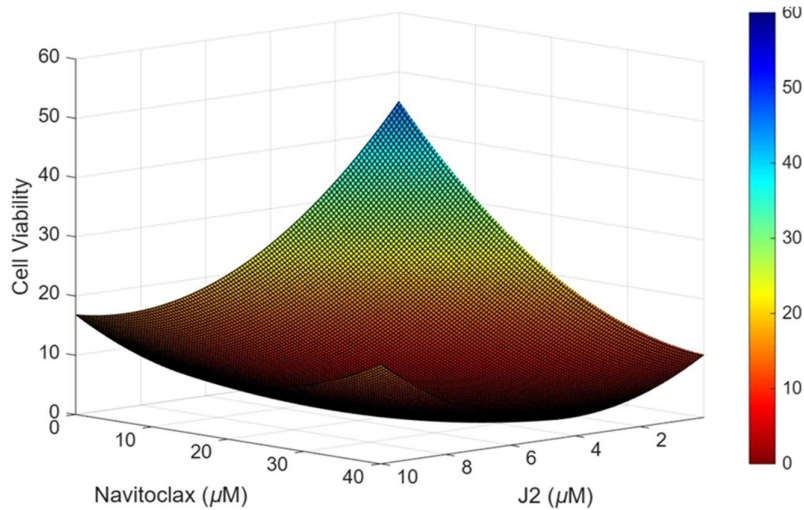
Şekil 4.8. HGF-1 hücre hattında 48 saatlik Navitoclax, J2 ve kombinasyon tedavilerine ait doz-etki eğrileri temelinde kombinasyon indeks (CI) değerlerinin değerlendirilmesi

4.3 Kombinasyon uygulamalarının yanıt yüzey yöntemi analizi

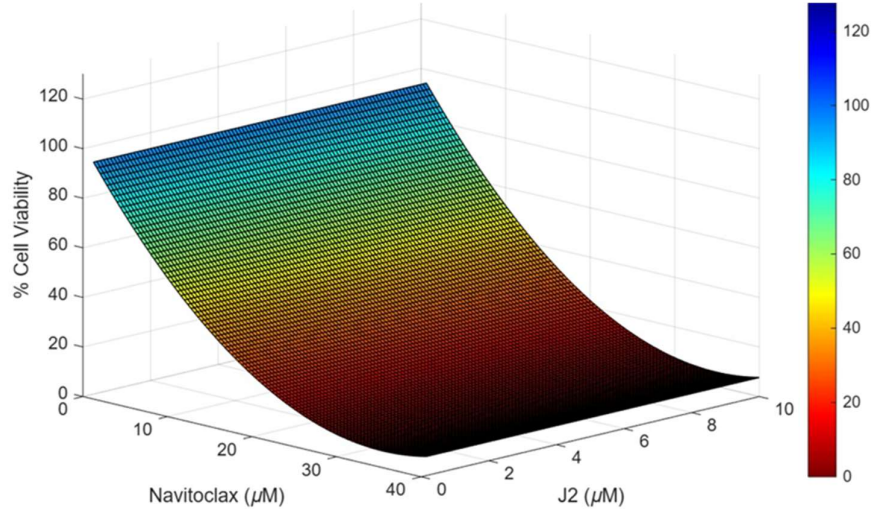
A549 ve HGF-1 hücre hatlarında Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı ve ters orantılı kombinasyon uygulamalarına bağlı hücre canlılığı değişimleri, 24 ve 48 saatlik inkübasyon sürelerinde response surface methodology (YYY) ile değerlendirilmiştir. Oluşturulan quadratic response surface modelleri ile doz seviyesi ve inkübasyon süresinin hücre canlılığı üzerindeki etkileri analiz edilmiş olup, elde edilen response surface ve contour plot grafikleri Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da gösterilmiştir.



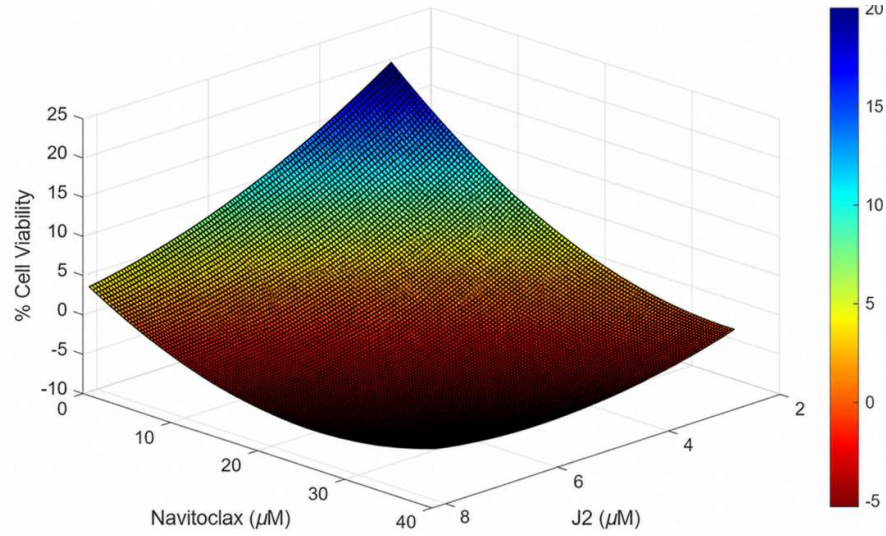
Şekil 4.9. A549 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı kombinasyonlarının 24 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.



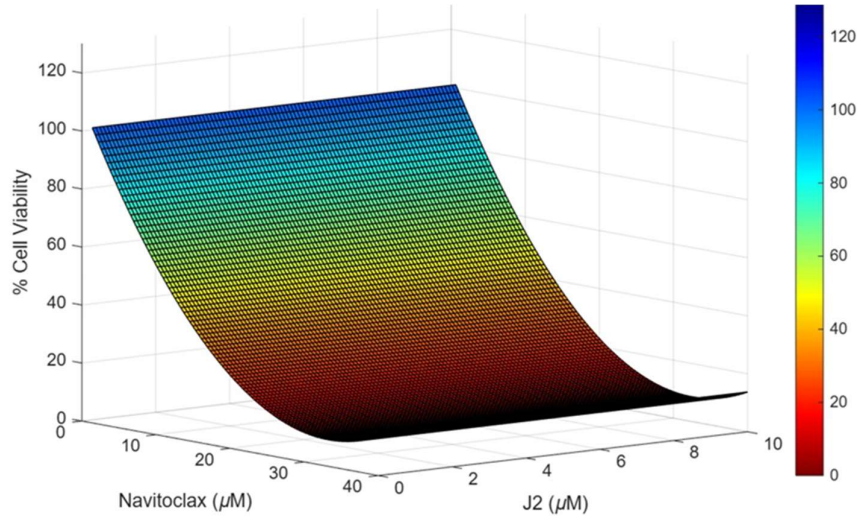
Şekil 4.10. A549 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin ters orantılı kombinasyonlarının 24 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.



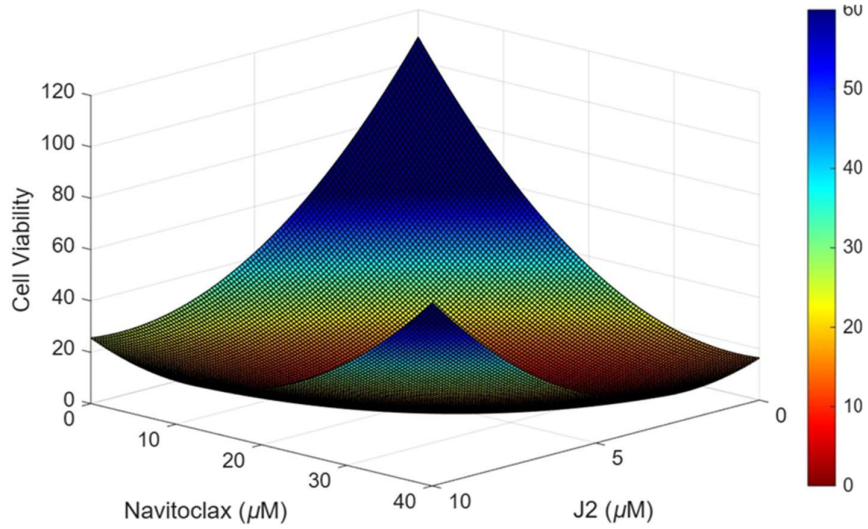
Şekil 4.11. A549 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı kombinasyonlarının 48 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri



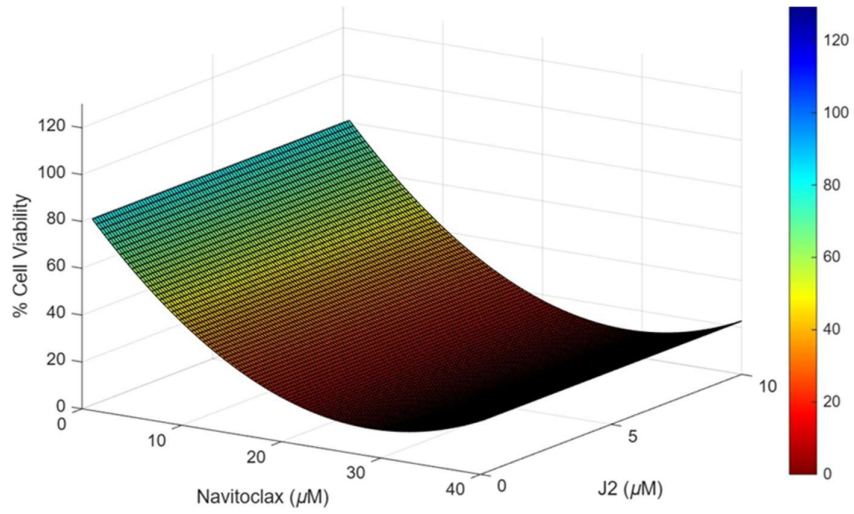
Şekil 4.12. A549 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin ters orantılı kombinasyonlarının 48 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.



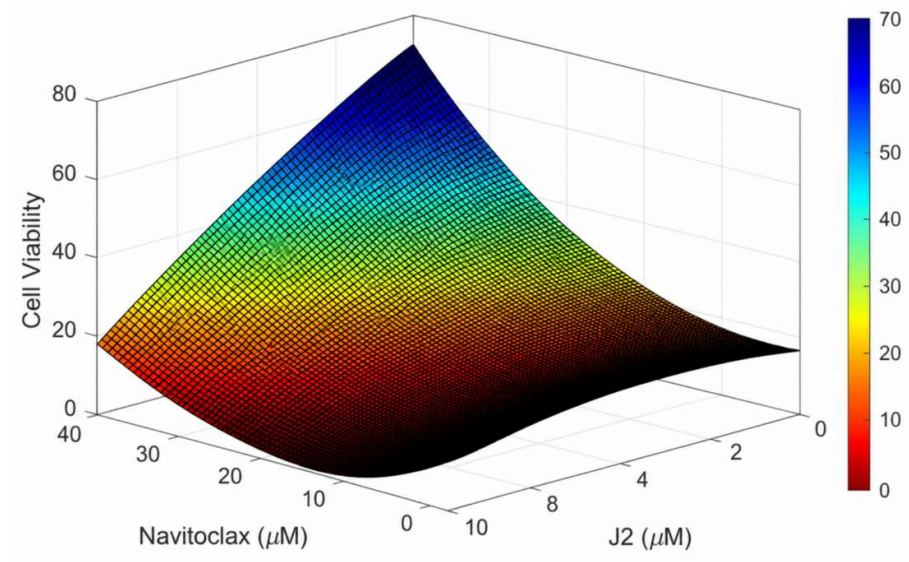
Şekil 4.13. HGF-1 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı kombinasyonlarının 24 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.



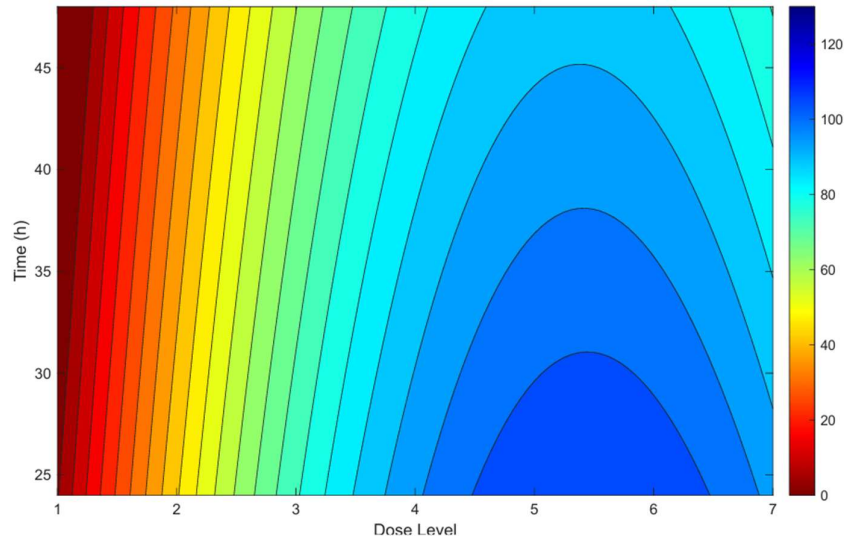
Şekil 4.14. HGF-1 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin ters orantılı kombinasyonlarının 24 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.



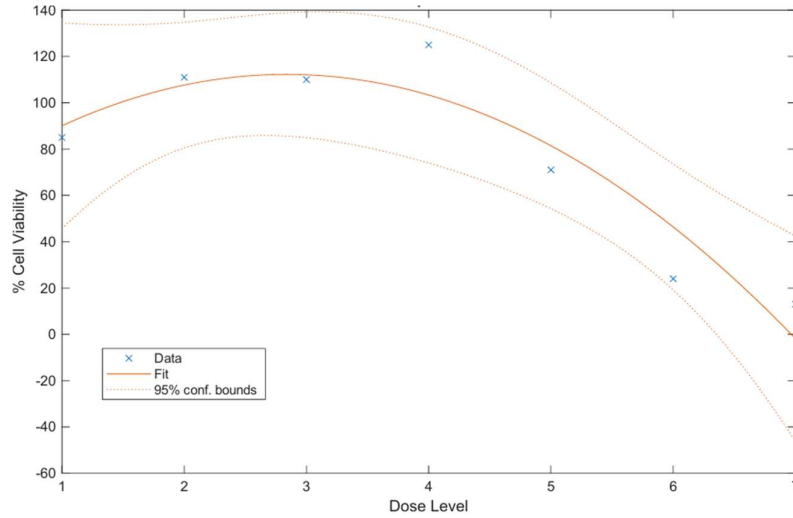
Şekil 4.15. HGF-1 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı kombinasyonlarının 48 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.



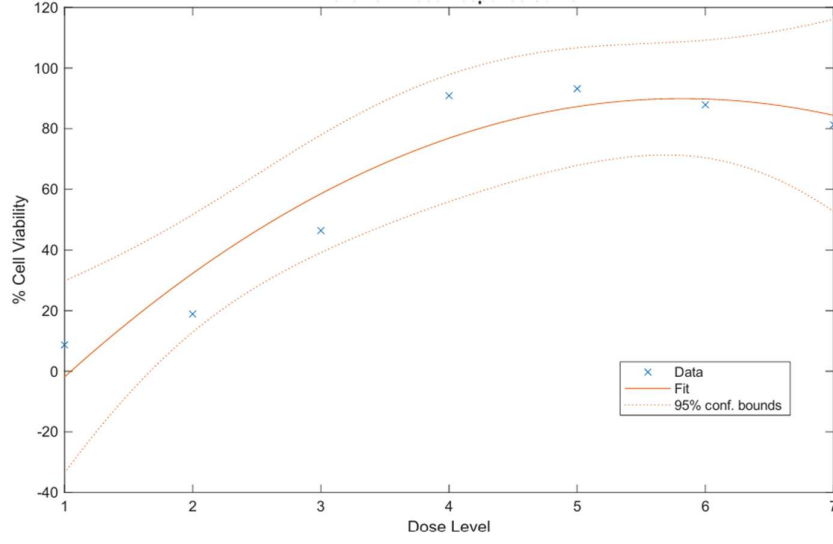
Şekil 4.16. HGF-1 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin ters orantılı kombinasyonlarının 48 saatlik uygulamalarına ait response surface grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.



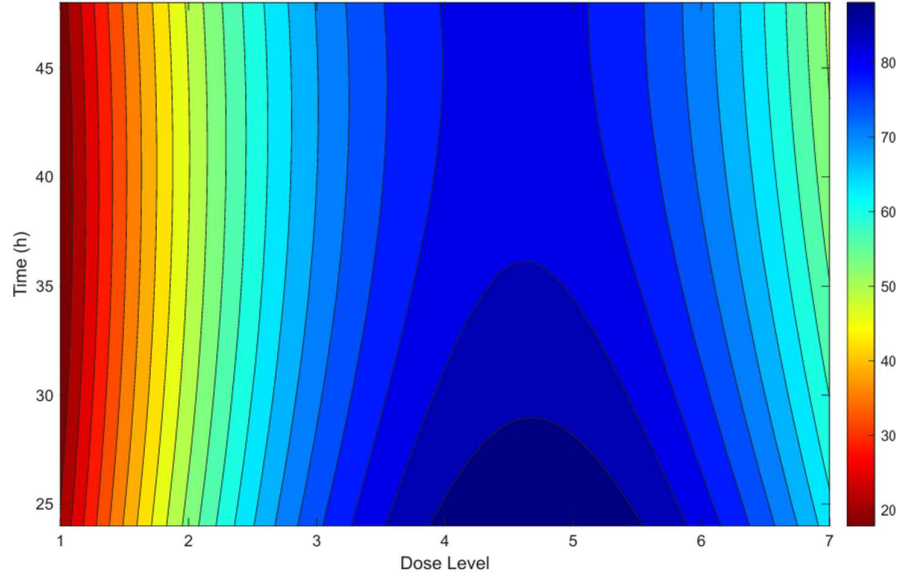
Şekil 4.17. A549 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı kombinasyonlarının 24 ve 48 saatlik uygulamalarına ait contour plot grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.



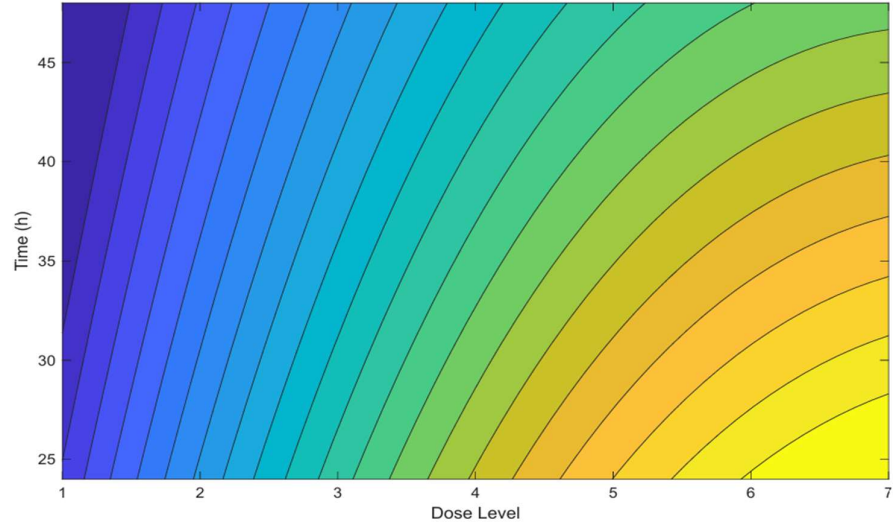
Şekil 4.18. A549 hücre hattında 24 saatlik doğru orantılı kombinasyon doz seviyelerine bağlı hücre canlılığı değişimini gösteren quadratic dose-response eğrisi



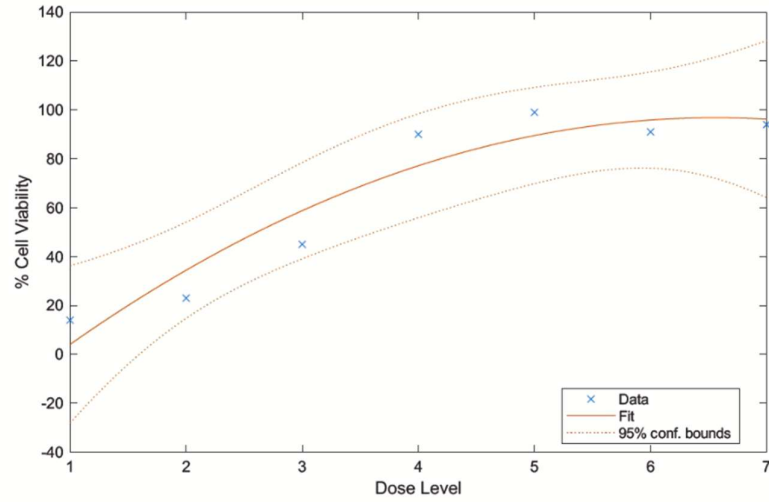
Şekil 4.19. A549 hücre hattında 48 saatlik doğru orantılı kombinasyon doz seviyelerine bağlı hücre canlılığı değişimini gösteren quadratic dose-response eğrisi



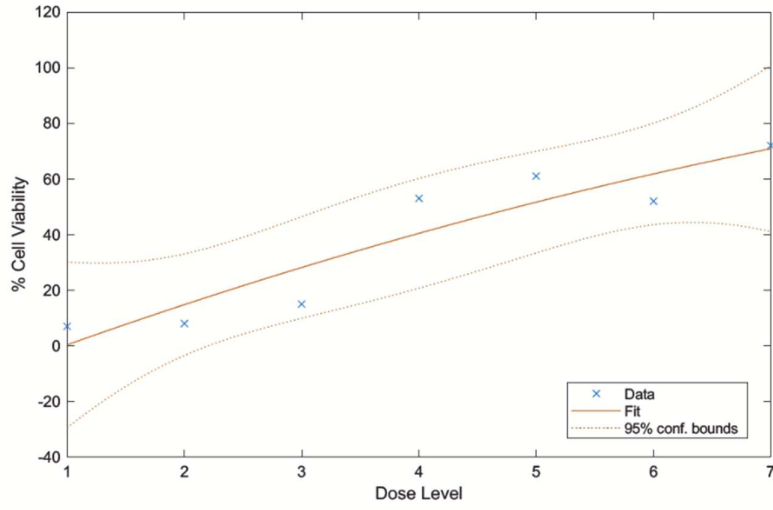
Şekil 4.20. A549 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin ters orantılı kombinasyonlarının 24 ve 48 saatlik uygulamalarına ait contour plot grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir



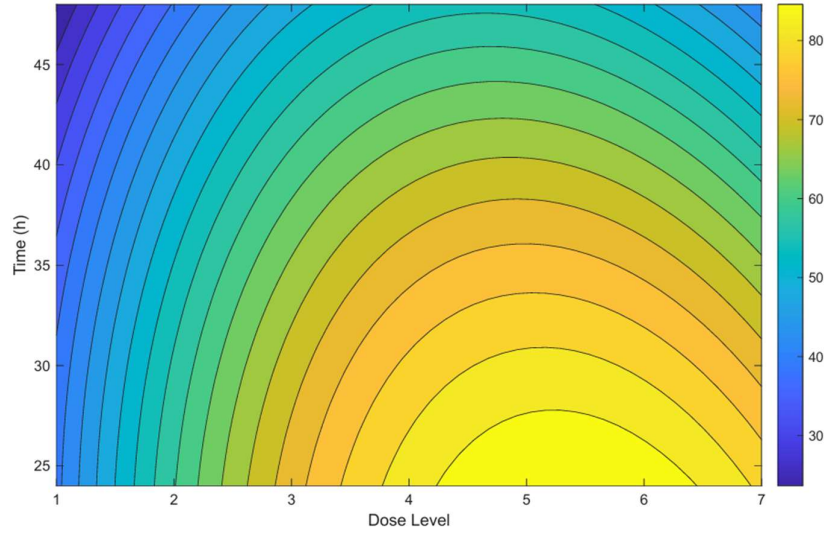
Şekil 4.21. HGF-1 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı kombinasyonlarının 24 ve 48 saatlik uygulamalarına ait contour plot grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.



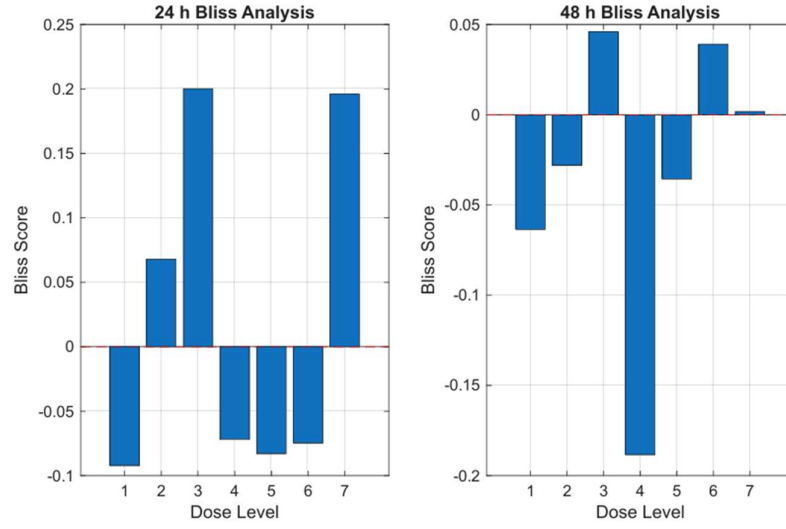
Şekil 4.22. HGF-1 hücre hattında 48 saatlik doğru orantılı kombinasyon doz seviyelerine bağlı hücre canlılığı değişimini gösteren quadratic dose-response eğrisi



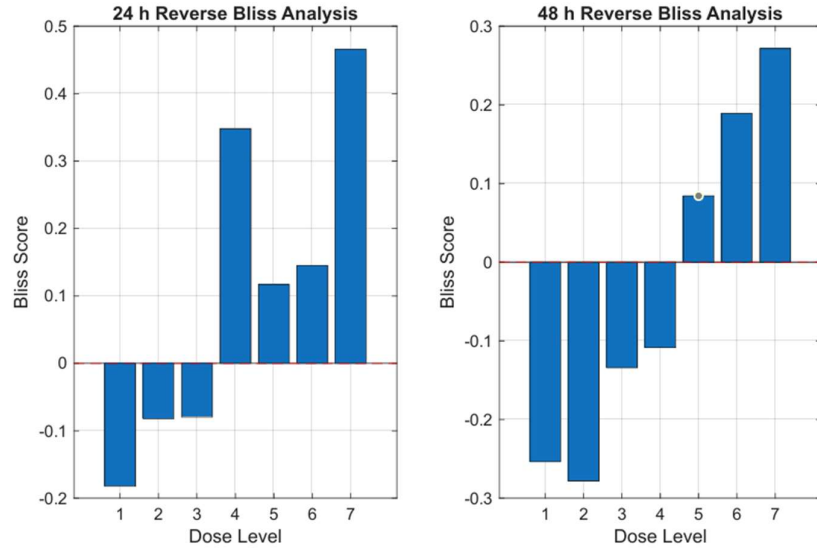
Şekil 4.23. HGF-1 hücre hattında 24 saatlik doğru orantılı kombinasyon doz seviyelerine bağlı hücre canlılığı değişimini gösteren quadratic dose-response eğrisi



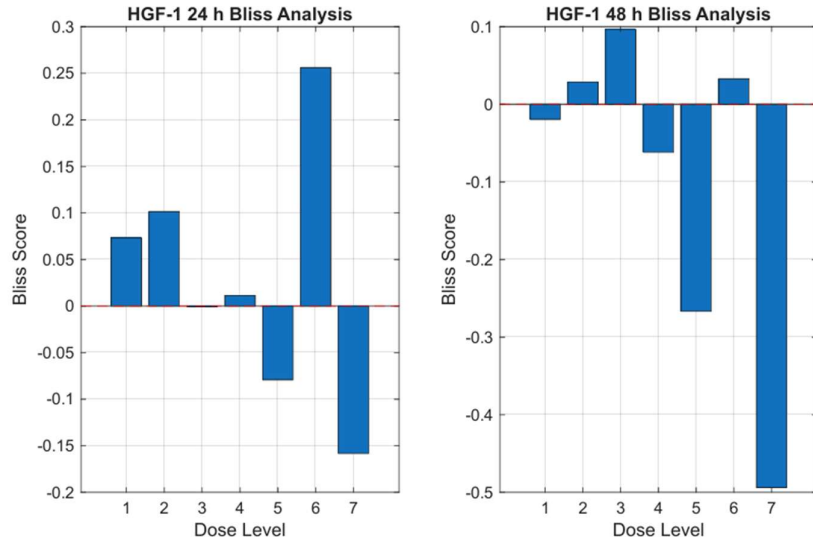
Şekil 4.24. HGF-1 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin ters orantılı kombinasyonlarının 24 ve 48 saatlik uygulamalarına ait contour plot grafiği. Doz seviyesi ve inkübasyon süresine bağlı hücre canlılığı değişimleri gösterilmiştir.



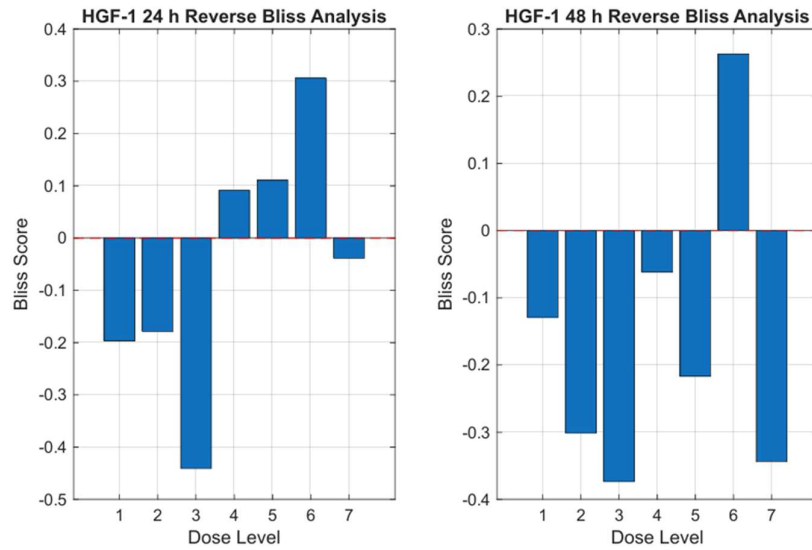
Şekil 4.25. A549 hücre hattında 24 ve 48 saatlik doğru orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonunun Bliss sinerji analizi



Şekil 4.26. A549 hücre hattında 24 ve 48 saatlik ters orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonunun Bliss sinerji analizi



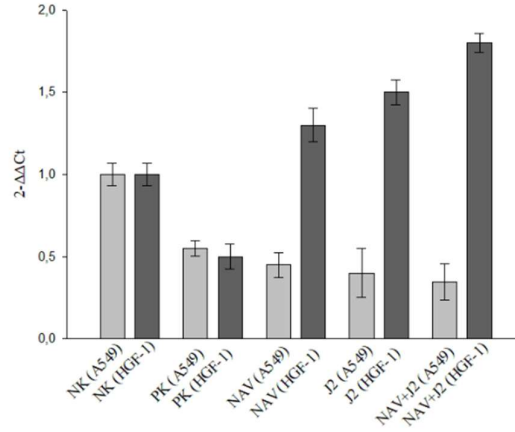
Şekil 4. 27. HGF-1 hücre hattında 24 ve 48 saatlik doğru orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonunun Bliss sinerji analizi



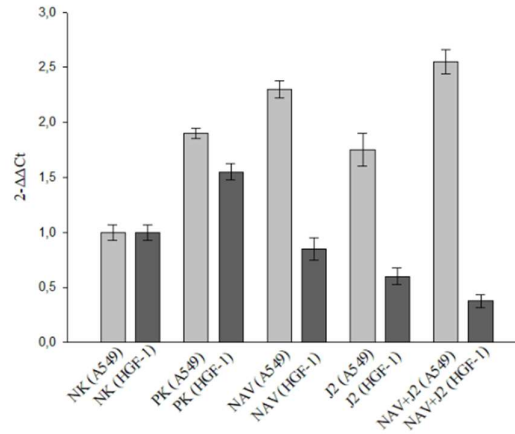
Şekil 4. 28. HGF-1 hücre hattında 24 ve 48 saatlik ters orantılı Navitoclax–J2 kombinasyonunun Bliss sinerji analizi

4.4 Gen ifade düzeyleri

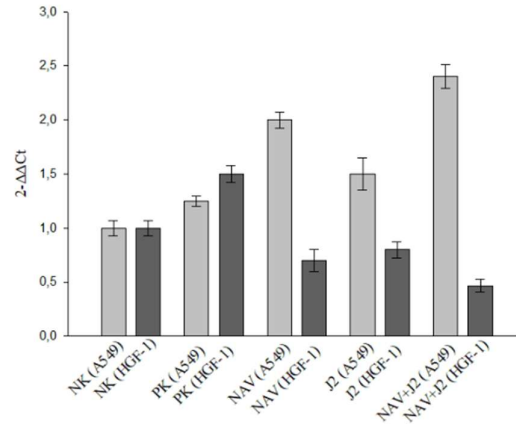
Çalışmada en yüksek sinerjik etkiye sahip CI değerinin elde edildiği A549 ve HGF-1 hücre hattında *BAX*, *BCL2*, *CASP9*, *CTNNB1* ve *APAF-1* gen ifade düzeyleri analiz edilmiştir. Referans gen olarak *ACTB* (β -aktin) kullanılmıştır. Elde edilen bulgulara ait grafikler Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32 ve Şekil 4.33'te verilmiştir.



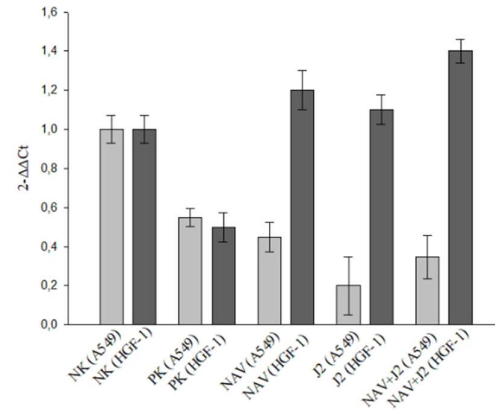
Şekil 4.29. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında *BCL-2* gen ifadesi üzerindeki etkileri



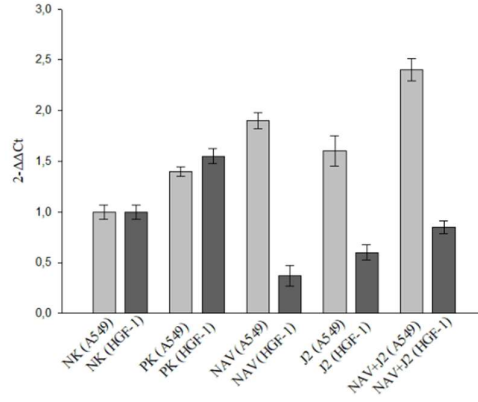
Şekil 4.30. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında *BAX* gen ifadesi üzerindeki etkileri



Şekil 4.31. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında *APAF-1* gen ifadesi üzerindeki etkileri



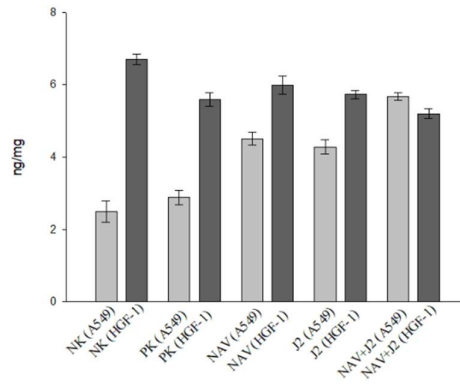
Şekil 4.32. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında *CTNNB1* gen ifadesi üzerindeki etkileri



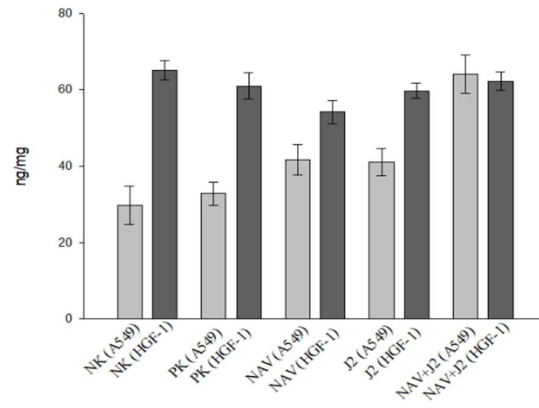
Şekil 4.33. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında *CASP-9* gen ifadesi üzerindeki etkileri

4.5 Protein seviyeleri

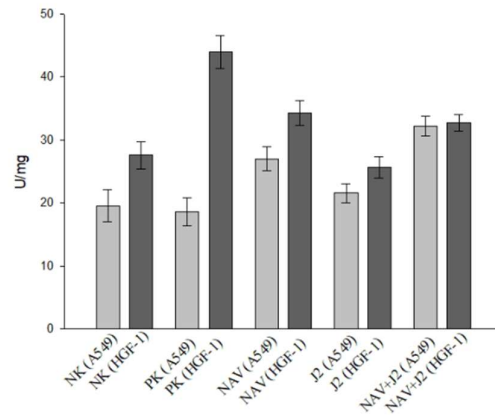
Çalışmada en güçlü sinerjik CI değerinin elde edildiği A549 ve HGF-1 hücre hattında Casp-3, Bcl-2 ve Bax protein düzeylerine olan etkiler belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara ait grafikler Şekil 4.34, Şekil 4.35 ve Şekil 4.36’da sunulmuştur.



Şekil 4.34. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında bax protein miktarı üzerindeki etkileri



Şekil 4.35. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında cas3 protein miktarı üzerindeki etkileri



Şekil 4.36. Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarının A549 ve HGF-1 hücre hatlarında bcl2 protein miktarı üzerindeki etkileri

Tablo 4.5. A549 hücre hattında Bax, Casp-3 ve Bcl2 protein seviyeleri

	Bax (ng/mg)	Casp-3 (ng/mg)	Bcl-2 (U/mg)
Kontrol	2,4	0,2	19,5
Navitoclax	4,5	0,417	27
J2	4,2	0,410	21,5
Doğru orantılı kombinasyon	5,6	0,6	32,1

A549 hücre hattında belirlenen protein düzeylerinin ardından, uygulamaların sağlıklı hücreler üzerindeki etkisini karşılaştırmak amacıyla HGF-1 hücre hattına ait Bax, Casp-3 ve Bcl-2 protein seviyeleri de değerlendirilmiş ve sonuçlar Tablo 4.6’da sunulmuştur.

Tablo 4.6. HGF-1 hücre hattında Bax, Casp-3 ve Bcl-2 protein seviyeleri

	Bax (ng/mg)	Casp-3 (ng/mg)	Bcl-2 (U/mg)
Kontrol	6,7	0,65	27,5
Navitoclax	5,9	0,54	34,2
J2	5,7	0,59	25,6
Doğru orantılı kombinasyon	5,2	0,62	32,7

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında BCL-2 inhibitörü Navitoclax ile HSP27 inhibitörü olan J2 molekülünün, küçük hücreli dışı akciğer kanseri modeli olarak kullanılan A549 hücre hattı ve sağlıklı fibroblast hücre hattı olan HGF-1 hücreleri üzerindeki doz-zaman ilişkili etkileri ortaya konulmuştur. Ayrıca Navitoclax ve J2 kombinasyonunun hücresel etkileri de değerlendirilmiştir.

MTT analizi kapsamında elde edilen hücre canlılığı sonuçları, 24. ve 48. saat olmak üzere iki farklı zaman noktasında değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme, Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı ve ters orantılı kombinasyon uygulamaları üzerinden ayrı ayrı yapılmıştır. MTT analizi, belirli konsantrasyon noktalarında hücre canlılığına ilişkin doğrudan ölçüm verileri sunarken; YYY analizi, bu doz-yanıt ilişkisinin daha geniş ve sürekli bir yüzey üzerinde incelenmesine olanak sağlamıştır. Bu nedenle YYY, MTT ile elde edilen noktasal verilerin desteklenmesi ve uygulanmayan ara konsantrasyonlardaki olası hücresel yanıtların tahmin edilmesi amacıyla kullanılmıştır. İlaçlar arasındaki etkileşim karakterinin değerlendirilmesinde ise Bliss analizi esas alınmıştır.

24 saatlik doğru orantılı kombinasyon uygulamasında A549 hücrelerinde, hücre canlılığında en belirgin azalma 40 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonunda gözlenmiş ve bu konsantrasyonda hücre canlılığı %12,88 olarak belirlenmiştir. Bunu sırasıyla 20 μ M Navitoclax + 5 μ M J2 kombinasyonunda %23,77 ve 10 μ M Navitoclax + 2,5 μ M J2 kombinasyonunda %71,08 hücre canlılığı değerleri izlemiştir. Ayrıca 0,625 μ M Navitoclax + 0,156 μ M J2 kombinasyonunda hücre canlılığı %85,84 olarak saptanmıştır.

24 saatlik ters orantılı kombinasyon uygulamasında ise en düşük hücre canlılığı 40 μ M Navitoclax + 0,156 μ M J2 kombinasyonunda %22,44 olarak tespit edilmiştir. Bu değeri 20 μ M Navitoclax + 0,3125 μ M J2 kombinasyonunda %39,08 ve 0,625 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonunda %58,98 hücre canlılığı oranları takip etmiştir. Ayrıca 5 μ M Navitoclax + 1,25 μ M J2 kombinasyonunda hücre canlılığı %82,75 olarak belirlenmiştir.

48 saatlik doğru orantılı kombinasyon uygulamasında A549 hücrelerinde, 24 saate kıyasla hücre canlılığındaki azalmanın daha belirgin hale geldiği görülmüştür. Bu grupta en düşük hücre canlılığı 40 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonunda %8,7 olarak belirlenmiştir. Bunu sırasıyla 20 μ M Navitoclax + 5 μ M J2 kombinasyonunda %18,9 ve 10 μ M Navitoclax +

2,5 μ M J2 kombinasyonunda %46,4 hücre canlılığı değerleri izlemiştir. Ayrıca 0,625 μ M Navitoclax + 0,156 μ M J2 kombinasyonunda hücre canlılığı %81,3 olarak saptanmıştır.

48 saatlik ters orantılı kombinasyon uygulamasında A549 hücrelerinde en düşük hücre canlılığı 40 μ M Navitoclax + 0,156 μ M J2 kombinasyonunda %28,2 olarak belirlenmiştir. Bu değeri 20 μ M Navitoclax + 0,3125 μ M J2 kombinasyonunda %43,6, 0,625 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonunda %53,6 ve 10 μ M Navitoclax + 0,625 μ M J2 kombinasyonunda %64,1 hücre canlılığı oranları takip etmiştir.

24 saatlik doğru orantılı kombinasyon uygulamasında HGF-1 hücrelerinde en düşük hücre canlılığı 40 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonunda gözlenmiş ve bu dozda hücre canlılığı %14,2 olarak belirlenmiştir. Bunu sırasıyla 20 μ M Navitoclax + 5 μ M J2 kombinasyonunda %23,09 ve 10 μ M Navitoclax + 2,5 μ M J2 kombinasyonunda %45,5 hücre canlılığı değerleri izlemiştir. Daha düşük doz kombinasyonlarında ise hücre canlılığının daha yüksek düzeylerde korunduğu görülmüş; 5 μ M Navitoclax + 1,25 μ M J2 kombinasyonunda %89,5, 2,5 μ M Navitoclax + 0,625 μ M J2 kombinasyonunda ise %98,9 hücre canlılığı saptanmıştır.

24 saatlik ters orantılı kombinasyon uygulamasında HGF-1 hücrelerinde en düşük canlılık değeri 40 μ M Navitoclax + 0,156 μ M J2 kombinasyonunda %40,96 olarak tespit edilmiştir. Bu değeri 20 μ M Navitoclax + 0,3125 μ M J2 kombinasyonunda %51,24 hücre canlılığı takip etmiştir. Buna karşılık 10 μ M Navitoclax + 0,625 μ M J2 kombinasyonunda hücre canlılığı %90,38, 1,25 μ M Navitoclax + 5 μ M J2 kombinasyonunda %86,03 ve 0,625 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonunda %83,42 olarak belirlenmiştir.

48 saatlik doğru orantılı kombinasyon uygulamasında HGF-1 hücrelerinde en düşük hücre canlılığı 40 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonunda %7,07 olarak belirlenmiştir. Bunu sırasıyla 20 μ M Navitoclax + 5 μ M J2 kombinasyonunda %8,15, 10 μ M Navitoclax + 2,5 μ M J2 kombinasyonunda %15,2 ve 1,25 μ M Navitoclax + 0,3125 μ M J2 kombinasyonunda %52,03 hücre canlılığı değerleri izlemiştir.

48 saatlik ters orantılı kombinasyon uygulamasında HGF-1 hücrelerinde en düşük hücre canlılığı 40 μ M Navitoclax + 0,156 μ M J2 kombinasyonunda %17,5 olarak saptanmıştır. Bunu

1,25 μ M Navitoclax + 5 μ M J2 kombinasyonunda %28,7, 20 μ M Navitoclax + 0,3125 μ M J2 kombinasyonunda %41 ve 5 μ M Navitoclax + 1,25 μ M J2 kombinasyonunda %53,8 hücre canlılığı değerleri takip etmiştir.

Kombinasyon etkisinin değerlendirilmesinde CompuSyn programı kullanılmıştır. CompuSyn analizi, Chou–Talalay yaklaşımına dayalı olarak kombinasyon indeksini hesaplayan ve özellikle sabit doz oranına sahip kombinasyonlarda ilaç etkileşimini değerlendirmeye olanak sağlayan bir yöntemdir. Bu nedenle çalışmada CompuSyn analizi, doğru orantılı kombinasyonların yorumlanmasında kullanılmıştır. Bu kapsamda CompuSyn analizi ile Navitoclax ve J2 kombinasyonlarının etkileşim karakteri CI değerleri üzerinden değerlendirilmiştir. CI değerinin 1'in altında olması sinerjistik etkiyi, 1'e yakın olması additif etkiyi, 1'in üzerinde olması ise antagonistik etkiyi göstermektedir. Bu kapsamda, her kombinasyon grubunda en düşük CI değerleri dikkate alınarak sinerjistik etki düzeyi yorumlanmıştır.

A549 hücre hattında 24 saatlik doğru orantılı kombinasyon uygulamasında en düşük CI değeri 40 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonunda belirlenmiş olup CI değeri 0,239 olarak hesaplanmıştır. Bu değer güçlü sinerjistik etkiyi göstermektedir. Bunu sırasıyla 0,625 μ M Navitoclax + 0,156 μ M J2 kombinasyonu 0,359 CI değeri ile ve 20 μ M Navitoclax + 5 μ M J2 kombinasyonu 0,413 CI değeri ile takip etmiştir. 48 saatlik doğru orantılı kombinasyon uygulamasında ise en düşük CI değeri 0,625 μ M Navitoclax + 0,156 μ M J2 kombinasyonunda 0,381 olarak belirlenmiş ve güçlü sinerjistik etki olarak değerlendirilmiştir. Bunu 40 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonu 0,487 CI değeri ile ve 20 μ M Navitoclax + 5 μ M J2 kombinasyonu 0,622 CI değeri ile izlemiştir.

HGF-1 sağlıklı hücre hattında 24 saatlik doğru orantılı kombinasyon uygulamasında en düşük CI değeri 40 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonunda 0,058 olarak hesaplanmış ve çok güçlü sinerjistik etki olarak değerlendirilmiştir. Bunu 20 μ M Navitoclax + 5 μ M J2 kombinasyonu 0,285 CI değeri ile ve 0,625 μ M Navitoclax + 0,156 μ M J2 kombinasyonu 0,492 CI değeri ile takip etmiştir. 48 saatlik doğru orantılı kombinasyon uygulamasında en düşük CI değeri 40 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonunda 0,050 olarak belirlenmiş ve çok güçlü sinerjistik etki olarak değerlendirilmiştir. Bunu 10 μ M Navitoclax + 2,5 μ M J2 kombinasyonu 0,224 CI değeri ile takip etmiştir. Tabloda 20 μ M Navitoclax + 5 μ M J2 kombinasyonu için verilen CI değeri kontrol edilmelidir; değer 0,308 ise bu kombinasyon da sinerjistik etki

gösteren üçüncü en düşük CI değeri olarak değerlendirilebilir. Buna göre HGF-1 hücrelerinde 48 saatlik doğru orantılı kombinasyonlarda sinerjistik etkinin özellikle yüksek ve orta doz kombinasyonlarında belirginleştiği görülmektedir.

Bliss analizi, MTT ile belirlenen hücre canlılığı azalmasının yalnızca sitotoksik etkiye bağlı olup olmadığını değil, iki ajanın birlikte kullanımında beklenen bağımsız etkinin üzerinde bir yanıt oluşup oluşmadığını değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır. Bu nedenle Bliss sonuçları, MTT verileriyle birlikte yorumlanmış; sinerjik ve antagonistik etki gösteren kombinasyonlar doz oranları ve hücre hattına bağlı yanıt farklılıkları dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Bliss analizi, her bir kombinasyon noktasını kendi içinde değerlendirerek iki ajanın birlikte oluşturduğu etkinin beklenen bağımsız yanıtıtan sapıp sapmadığını göstermesi açısından bu çalışma için tamamlayıcı bir yaklaşım sağlamıştır. Özellikle ters orantılı kombinasyonlarda doz oranı sabit olmadığı için Bliss analizi, her doz çiftinin ayrı ayrı yorumlanmasına olanak tanımış ve bu yönüyle CompuSyn analizinin sınırlı kaldığı noktayı desteklemiştir. Bu yaklaşım sayesinde, MTT analizinde düşük hücre canlılığı oluşturan her kombinasyonun gerçek anlamda sinerjistik kabul edilemeyeceği; bazı yüksek doz kombinasyonlarında gözlenen etkinin daha çok doz kaynaklı sitotoksositeyle ilişkili olabileceği görülmüştür.

A549 hücre hattında bliss analizi doğrultusunda 24 saatlik doğru orantılı kombinasyon uygulamasında en belirgin sinerjistik etki yaklaşık 10 μ M Navitoclax + 2,5 μ M J2 kombinasyonunda gözlenmiş olup, bunu 0,625 μ M Navitoclax + 0,156 μ M J2 ve 20 μ M Navitoclax + 5 μ M J2 kombinasyonları izlemiştir. Buna karşılık 40 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonunda CompuSyn analizinin sinerjistik etki göstermesine rağmen Bliss analizinde aynı yönde bir yanıtın desteklenmemesi, bu dozda MTT ile gözlenen belirgin canlılık azalmasının gerçek bir kombinasyon avantajından ziyade yüksek konsantrasyon kaynaklı sitotoksositeyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde 10 μ M Navitoclax + 2,5 μ M J2 kombinasyonunun Bliss analizinde sinerjik yönde değerlendirilmesine karşın CompuSyn analizinde aynı düzeyde desteklenmemesi, bu dozda bağımsız etki beklentisine göre bir artış olsa da sabit doz-oran modelinde güçlü bir kombinasyon indeksi oluşmadığını göstermektedir. 24 saatlik ters orantılı kombinasyon uygulamasında ise sinerjistik etkinin özellikle düşük Navitoclax ve yüksek J2 içeren dozlarda belirginleştiği görülmüştür. Bu kapsamda 0,625 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonu en dikkat çekici sinerjistik yanıtı oluşturmuştur. Ayrıca 5 μ M Navitoclax + 1,25 μ M J2, 2,5 μ M Navitoclax + 2,5 μ M J2 ve 1,25

μM Navitoclax + 5 μM J2 kombinasyonları da sinerjistik etki göstermiştir. Buna karşılık yüksek Navitoclax ve düşük J2 içeren ilk dozlarda antagonistik etki izlenmiştir.

A549 hücrelerinde 48 saatlik doğru orantılı kombinasyon uygulamasında ise CompuSyn ve Bliss sonuçları arasındaki uyumun 24 saate kıyasla daha sınırlı olduğu görülmüştür. CompuSyn analizinde 0,625 μM Navitoclax + 0,156 μM J2, 40 μM Navitoclax + 10 μM J2 ve 20 μM Navitoclax + 5 μM J2 kombinasyonlarında CI değerlerinin 1'in altında bulunması, bu dozların sabit doz-oran modeli açısından sinerjistik etki oluşturduğunu göstermektedir. Ancak Bliss analizinde sinerjik yanıtın daha çok 10 μM Navitoclax + 2,5 μM J2 ve 1,25 μM Navitoclax + 0,3125 μM J2 kombinasyonlarında belirginleşmesi, 48 saatlik uygulamada bağımsız etki beklentisine göre öne çıkan dozların CompuSyn ile belirlenen dozlarla tam olarak örtüşmediğini ortaya koymaktadır. Özellikle MTT analizinde hücre canlılığını en fazla azaltan yüksek doz kombinasyonlarının Bliss analizinde belirgin sinerjik yanıt oluşturmaması, bu etkinin sinerjistik etkileşimden çok doz ve süreye bağlı sitotoksik baskılanma ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. A549 hücre hattında 48 saatlik ters orantılı kombinasyon uygulamasında da benzer bir eğilim gözlenmiştir. Yüksek Navitoclax ve düşük J2 içeren kombinasyonlarda antagonistik etki baskınken, J2 konsantrasyonunun yükseldiği ve Navitoclax konsantrasyonunun azaldığı dozlarda sinerjistik etki ortaya çıkmıştır. Özellikle 0,625 μM Navitoclax + 10 μM J2 kombinasyonu 48 saatlik uygulamada da sinerjistik etki göstermiştir.

HGF-1 hücre hattında 24 saatlik ters orantılı kombinasyon uygulamasında, A549 hücrelerinde en belirgin sinerjik etki gösteren 0,625 μM Navitoclax + 10 μM J2 kombinasyonunun HGF-1 hücrelerinde sinerjistik bir yanıt oluşturmaması önemlidir. Bu dozda HGF-1 hücre canlılığının daha yüksek düzeyde korunması kombinasyonun kanser hücresine karşı daha seçici bir antiproliferatif etki gösterebileceğini düşündürmektedir. 48 saatlik ters orantılı kombinasyon uygulamasında ise genel olarak antagonistik etkinin daha baskın olduğu görülmüştür. A549 hücrelerinde sinerjistik yanıt oluşturan bazı ters orantılı dozların HGF-1 hücrelerinde antagonistik yönde etki göstermesi, ilaç etkileşiminin hücre hattına bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.

YYY analizi doğrultusunda doğru orantılı kombinasyon uygulaması değerlendirildiğinde, hücre canlılığı üzerindeki değişimin ağırlıklı olarak Navitoclax konsantrasyonuna bağlı olarak şekillendiği görülmüştür. Bu kombinasyon düzeninde J2 konsantrasyonunun Navitoclax ile birlikte azalması veya artması, hücre canlılığı üzerinde bağımsız ve belirgin bir etki oluşturacak

düzeyde ayırt edilememiştir. Özellikle doz-yanıt yüzeyinde canlılık azalmasının yüksek Navitoclax konsantrasyonlarının bulunduğu bölgelerde yoğunlaşması, doğru orantılı kombinasyonlarda antiproliferatif etkinin temel belirleyicisinin Navitoclax olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle J2'nin doğru orantılı kombinasyon içindeki katkısı sınırlı düzeyde değerlendirilmiştir.

A549 hücre hattında Navitoclax ve J2'nin doğru orantılı kombinasyonlarına ait YYY contour plot grafiği değerlendirildiğinde, en düşük hücre canlılığının doz seviyesi 1'e karşılık gelen 40 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonunda ortaya çıktığı görülmektedir. Grafikte en yoğun düşük canlılık bölgesi yaklaşık 47. saat civarında belirginleşmekte olup, bu zaman noktasında hücre ölümünün en yüksek düzeye ulaştığı değerlendirilebilir. Ters orantılı YYY analizine göre en düşük hücre canlılığı, yaklaşık 24–25. saat aralığında ve 40 μ M Navitoclax + 0,156 μ M J2 kombinasyonuna karşılık gelen 1. doz seviyesinde gözlenmiştir. Grafikte düşük canlılık bölgesinin bu alanda yoğunlaşması, etkinin özellikle yüksek Navitoclax konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu göstermektedir. J2'nin yüksek olduğu düşük Navitoclax dozlarında ise hücre canlılığı üzerindeki baskılayıcı etkinin daha sınırlı kaldığı görülmektedir.

HGF-1 hücre hattında doğru orantılı YYY analizine göre en düşük hücre canlılığı, yaklaşık 45. saat aralığında ve 40 μ M Navitoclax + 10 μ M J2 kombinasyonuna karşılık gelen 1. doz seviyesinde görülmektedir. Grafikte canlılığın düşük olduğu alanın yüksek doz bölgesinde yoğunlaşması, doğru orantılı kombinasyonda HGF-1 sağlıklı hücrelerinin de özellikle yüksek Navitoclax + yüksek J2 dozlarında etkilendiğini göstermiştir.

HGF-1 hücre hattında ters orantılı YYY analizine göre en düşük hücre canlılığı, yaklaşık 47–48. saat aralığında ve 40 μ M Navitoclax + 0,156 μ M J2 kombinasyonuna karşılık gelen 1. doz seviyesinde görülmektedir. Buna karşılık sağlıklı hücre canlılığının en iyi korunduğu bölge yaklaşık 24–26. saat aralığında, 2,5 μ M Navitoclax + 2,5 μ M J2 ile 1,25 μ M Navitoclax + 5 μ M J2 doz seviyeleri arasında yoğunlaşmaktadır. Bu durum, ters orantılı kombinasyonda HGF-1 hücrelerinin yüksek Navitoclax içeren dozlarda daha fazla etkilendiğini, Navitoclax azaldıkça sağlıklı hücre canlılığının daha iyi korunduğunu göstermektedir.

Navitoclax + J2 kombinasyonu sonrasında *BCL2* gen ifade düzeyi A549 hücrelerinde negatif kontrole göre yaklaşık %65 oranında azalmıştır. Bu azalma, kombinasyon uygulamasının A549 kanser hücrelerinde anti-apoptotik *BCL2* yanıtını baskılayarak apoptotik süreci

destekleyebileceğini düşündürmektedir. Buna karşılık HGF-1 hücrelerinde *BCL2* gen ifade düzeyi yaklaşık %80 oranında artmıştır. A549 hücre hattında *BCL-2* ekspresyon düzeylerinde gözlenen baskılanma, Navitoclax ve J2 uygulamalarının anti-apoptotik mekanizmaları baskıladığını göstermektedir. *BCL-2* ailesi proteinlerinin mitokondri aracılı apoptozda sitokrom c salınımını düzenlediği bilinmekte olup, *BCL-2* düzeyindeki azalmanın BAX/BAK aracılı apoptotik sinyali kolaylaştırabileceği düşünülmektedir. Özellikle kombinasyon grubunda belirlenen düşük *BCL-2* seviyeleri, intrinsik apoptotik yolun aktivasyonu ile ilişkili olabileceği ortaya çıkmıştır. Buna karşılık HGF-1 hücre hattında *BCL-2* düzeylerinin daha yüksek seyretmesi, sağlıklı hücrelerde apoptotik yanıtın daha sınırlı düzeyde gerçekleştiğini düşündürmektedir (Sun C vd., 2007).

BAX gen ifade düzeyi negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, A549 hücrelerinde Navitoclax uygulamasında yaklaşık %20, Navitoclax + J2 kombinasyonunda ise yaklaşık %30–35 oranında artış gözlenmiştir. J2 uygulamasında ise *BAX* ekspresyonu negatif kontrole yakın düzeyde kalmış veya hafif azalma göstermiştir. Bu sonuçlar, özellikle Navitoclax + J2 kombinasyonunun A549 hücrelerinde pro-apoptotik *BAX* yanıtını güçlendirebileceğini düşündürmektedir. HGF-1 hücrelerinde ise Navitoclax, J2 ve kombinasyon uygulamalarında *BAX* gen ifade düzeyinin negatif kontrole göre azaldığı görülmektedir. Kombinasyon grubunda yaklaşık %70–75 düzeyinde izlenen azalma, sağlıklı hücre hattında pro-apoptotik yanıtın baskılandığını ve ters kombinasyonun A549 hücrelerinde daha belirgin apoptotik etki oluşturabileceğini göstermektedir (Leonardi E vd., 1992).

APAF-1 gen ifade düzeyi negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, A549 hücrelerinde Navitoclax, J2 ve Navitoclax + J2 uygulamalarında artış göstermiştir. En belirgin artış Navitoclax + J2 kombinasyonunda izlenmiş olup, *APAF-1* ekspresyonu negatif kontrole göre yaklaşık %90–95 oranında yükselmiştir. A549 hücre hattında *APAF-1* ekspresyon düzeylerinde saptanan artış, Navitoclax ve J2 uygulamalarının mitokondri ilişkili apoptotik yolak üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Özellikle kombinasyon grubunda gözlenen yüksek *APAF-1* ekspresyonu, sitokrom c aracılı apoptozom oluşumunun ve devamında kaspaz bağımlı apoptotik sürecin aktive edildiğini desteklemektedir. HGF-1 hücre hattında ise *APAF-1* ekspresyonunun daha düşük düzeyde gözlenmesi, kombinasyon uygulamasının kanser hücrelerinde daha seçici bir apoptotik etki oluşturduğunu göstermektedir (Manabe N vd., 2004).

CTNNB1 gen ifade düzeyi negatif kontrol ile karşılaştırıldığında, A549 hücrelerinde Navitoclax, J2 ve Navitoclax + J2 uygulamalarında azalma göstermiştir. Bu azalma Navitoclax grubunda yaklaşık %15–20, J2 grubunda yaklaşık %60–65 ve kombinasyon grubunda yaklaşık %35–40 düzeyindedir. A549 hücre hattında β -katenin ekspresyon düzeylerinde gözlenen azalma, Navitoclax ve J2 uygulamalarının proliferasyon ile ilişkili sinyal mekanizmalarını baskıladığını göstermektedir. Özellikle kombinasyon grubunda saptanan düşük β -katenin seviyeleri, Wnt/ β -katenin sinyal yolunun inhibisyonu ile ilişkili olup hücresel proliferasyonun baskılanmasını desteklemektedir. Buna karşılık HGF-1 hücre hattında β -katenin ekspresyonunun daha yüksek düzeyde seyretmesi, sağlıklı hücrelerde proliferatif sinyal mekanizmalarının daha sınırlı düzeyde etkilendiğini göstermektedir (Bi X vd., 2014).

CASP-9 gen ifade düzeyi pozitif kontrol ile karşılaştırıldığında, A549 hücrelerinde Navitoclax, J2 ve Navitoclax + J2 uygulamalarında artış göstermiştir. En belirgin artış kombinasyon grubunda izlenmiş olup, *CASP-9* ekspresyonu pozitif kontrole göre yaklaşık %70–75 oranında yükselmiştir. *CASP-9* ekspresyonunda saptanan yükseliş, Navitoclax ve J2 uygulamalarının intrinsik apoptotik yolak üzerinde aktive edici etki oluşturduğunu göstermektedir. Özellikle A549 hücre hattında kombinasyon grubunda saptanan yüksek *CASP-9* düzeyleri, mitokondri kaynaklı apoptotik sinyalleme gücünü ve kaspaz aracılı hücre ölüm mekanizmalarının uyarıldığını desteklemektedir. Buna karşın HGF-1 hücre hattında ekspresyon seviyelerinin azalma eğilimi göstermesi, kombinasyon uygulamasının apoptotik yanıtı kanser hücrelerinde daha belirgin şekilde oluşturduğunu ortaya koymaktadır (Grebenova D vd., 2003).

Navitoclax ve J2 uygulamalarının A549 hücre hattında mitokondri aracılı intrinsik apoptotik mekanizmayı aktive ettiğini göstermektedir. Pro-apoptotik sinyal proteinleri ile ilişkili gen ekspresyonlarının desteklenmesi ve anti-apoptotik regülasyonda görev alan mekanizmaların baskılanması, apoptosom oluşumu ile ilişkili kaspaz kaskadının uyarıldığını ortaya koymaktadır. Ayrıca β -katenin ilişkili proliferatif sinyal yollarının baskılanması, hücresel proliferasyon ve tümör progresyonuna yönelik moleküler mekanizmaların inhibe edildiğini desteklemektedir.

HGF-1 hücre hattında ise apoptotik ve proliferatif yollarla ilişkili moleküler değişimlerin daha minimal düzeyde tespit edilmesi, kombinasyon uygulamasının biyolojik etkilerinin kanser hücrelerinde daha seçici olarak ortaya çıktığını göstermektedir.

ELISA analizlerinden elde edilen Bax verileri, Navitoclax ve J2 uygulamalarının A549 hücre hattında pro-apoptotik moleküler yanıtı güçlendirdiğini göstermektedir. Kombinasyon grubunda saptanan yüksek Bax protein düzeyleri, mitokondri kaynaklı apoptotik sinyalleme aktif olduğunu desteklemektedir. HGF-1 hücre hattında ise protein düzeylerindeki değişimlerin daha düşük düzeyde seyretmesi, uygulamanın apoptotik etkisinin kanser hücrelerinde daha belirgin olduğunu göstermektedir (Stark AM vd., 2007).

Navitoclax ve j2 kombinasyonunun Casp-3 aktivasyonu üzerindeki rolü, Navitoclax ve J2 uygulamalarının A549 hücrelerinde apoptotik mekanizmayı aktive ettiğini göstermektedir. Özellikle kombinasyon grubunda belirlenen yüksek Casp-3 düzeyleri, kaspaz bağımlı hücre ölümünün uyarıldığını desteklemektedir. HGF-1 hücre hattında ise protein düzeylerindeki değişimlerin azalma göstermesi, uygulamanın apoptotik etkisinin kanser hücrelerinde daha belirgin olduğunu göstermektedir (Kaufmann SH vd., 1993).

Bcl-2 ELISA incelendiğinde kombinasyon grubunda gözlenen yüksek protein düzeyleri, anti-apoptotik aktivitenin sürdüğünü doğrudan göstermemekle birlikte apoptotik uyaranlara maruz kalan hücrelerde Bcl-2 proteininin ekspresyonunun korunabildiği ancak fosforilasyon, asetilasyon, ubiquitinasyon, proteolitik parçalanma ve konformasyonel değişiklikler gibi post-translasyonel modifikasyonlar sonucunda fonksiyonel aktivitesinin baskılanabildiği bildirilmektedir. Özellikle Navitoclax'ın BH3-mimetik yapısı sayesinde Bcl-2 proteinine bağlanarak pro-apoptotik proteinler üzerindeki inhibitör etkisini ortadan kaldırdığı bilinmektedir. Bu nedenle toplam Bcl-2 protein düzeyi yüksek saptanmasına rağmen, mitokondriyal apoptotik sinyalleme devam edebildiği düşünülmektedir. Nitekim A549 hücre hattında Bax ve Casp-3 düzeylerinde gözlenen artışlar, kombinasyon uygulamasının intrinsik apoptotik yolak aktivasyonunu desteklediğini ortaya koymaktadır (Ruvolo PP vd., 1999).

Elde edilen bulgular doğrultusunda, kombinasyon uygulamalarının hedefe yönelik kanser tedavileri açısından dikkat çekici avantajlar sağlayabileceğini göstermiştir. Özellikle düşük dozlarda gözlenen sinerjistik etkiler, daha etkili ve düşük toksisiteli tedavi stratejilerinin geliştirilebileceğini düşündürmektedir. YYY analizleri kombinasyonların doz ve zamana bağlı etkilerini ortaya koyarak optimum etki bölgelerinin belirlenmesine katkı sağlarken, gen ekspresyon düzeylerinde gözlenen değişimler de kombinasyon uygulamalarının hücresel mekanizmalar üzerinde etkili olduğunu desteklemiştir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler,

oluşturulan hipotezleri destekler nitelikte olup, ileri in vitro çalışmalar ile bu etkilerin daha ayrıntılı olarak araştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKÇA

Alberg AJ, Brock M V., Ford JG, et al. Epidemiology of Lung Cancer: Diagnosis and Management of Lung Cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians EvidenceBased Clinical Practice Guidelines. Chest [Internet]. 2013 May 1 [cited 2023 May 13];143(5):e1S-e29S.

Bi X, Xia X, Mou T, Jiang B, Fan D, Wang P, Liu Y, Hou Y and Zhao Y: Anti-tumor activity of three ginsenoside derivatives in lung cancer is associated with Wnt/ β -catenin signaling inhibition. Eur J Pharmacol 742: 145-152, 2014

Blanchard EM, Arnaoutakis K, Hesketh PJ. Lung cancer in octogenarians. J Thorac Oncol. 2010; 5(6):909–916. [PubMed: 20521358]

Bray, F.; Laversanne, M.; Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Soerjomataram, I.; Jemal, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J. Clin. 2024, 74, 229–263. [CrossRef]

Brenner C, Grimm S (2006) The permeability transition pore complex in cancer cell death. Oncogene 25(34):4744–4756

Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, et al. Hsp27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. Nat Cell Biol. 2000; 2:645-652.

Brunelle JK, Letai A (2009) Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. J Cell Sci 122(Pt 4):437–441

Campbell KJ, Tait SWG. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. Open Biol (2018) 8(5):180002. doi: 10.1098/rsob.180002

Carneiro BA, El-Deiry WS. Targeting apoptosis in cancer therapy. Nat Rev Clin Oncol (2020) 17(7):395–417. doi: 10.1038/s41571-020-0341-y

Cassidy A, Myles JP, van Tongeren M, et al. The LLP risk model: an individual risk prediction model for lung cancer. *Br J Cancer*. 2008; 98(2):270–276. [PubMed: 18087271]

Concannon CG, Orrenius S, Samali A. Hsp27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. *J Biol Chem*. 2001; 276:43896-43902.

Concannon, C. G., Orrenius, S., & Samali, A (2001). Hsp27 inhibits cytochrome c-mediated caspase activation by sequestering both pro-caspase-3 and cytochrome c. *Gene Expression*, 9(4–5), 195–201.

Corn PG., El-Deiry WS (2002). Derangement of growth and differentiation control in onkogenesis. *Bioessays* 1: 83-90.

Cruz, C.S.; Tanoue, L.T.; Matthay, R.A. Lung cancer: Epidemiology, etiology, and prevention. *Clin. Chest Med*. 2011, 32, 605–644. [CrossRef]

Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Ferlay J, Miranda-Filho A, Bray F. Global Cancer Observatory: Cancer Over Time. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2024. <https://gco.iarc.who.int/overtime>. Accessed September 10, 2024.

Ferlay J, Ervik M, Lam F, Laversanne M, Colombet M, Mery L, Pineros ~ M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F. Global Cancer Observatory: Cancer Today (version 1.1). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2024. <https://gco.iarc.fr/today>. Accessed December 10, 2024.

Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Pineros ~ M, Steliarova-Foucher E, Swaminathan R, Ferlay J, eds. Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X. IARC Scientific Publication No. 164. Lyon: International Agency for Research on Cancer. 2014. <https://ci5.iarc.who.int>.

Galluzzi L, Morselli E, Kepp O et al (2010) Mitochondrial gateways to cancer. *Mol Asp Med* 31(1):1–20

Garrido C, Brunet M, Didelot C, et al. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle*. 2006; 5:2592-2601.

Grebenova, D. et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. *J Photoch Photobio B* 69, 71–85 (2003).

Gridelli C, Langer C, Maione P, et al. Lung cancer in the elderly. *J Clin Oncol*. 2007; 25(14): 1898–1907. [PubMed: 17488989]

Han, Z., Liang, J., Li, Y., and he, J (2019). Drugs and clinical approaches targeting the antiapoptotic protein: a review. *Biomed. Res. Int*. 2019, 1212369. Doi:10. 1155/2019/1212369

Hanahan D and Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-674, 2011.

Heynick L.N. Johnston S.A. Mason P.A (2003). Radio Frequency Electromagnetic Fields: Cancer, Mutagenesis, and Genotoxicity. *Bioelectromagnetics* S6: 74-100.

Hui-qing X, Jian-da Z, Xin-min N, Yan-zhong Z, Cheng-qun L, Quan-yong H, Yi X, Pokharel PB, Shao-hua W and Dan X: HSP70 inhibits burn serum-induced apoptosis of cardio- myocytes via mitochondrial and membrane death receptor pathways. *J Burn Care Res* 29: 512-518, 2008.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.

J. Huang, Y. Deng, M.S. Tin, V. Lok, C.H. Ngai, L. Zhang, D.E. Lucero-Prisno 3rd, W. Xu, Z.J. Zheng, E. Elcarte, M. Withers, M.C.S. Wong, Distribution, risk factors, and temporal trends for lung cancer incidence and mortality: a global analysis, *Chest* 161 (4) (2022) 1101–1111, <https://doi.org/10.1016/j.chest.2021.12.655>.

Joly AL, Wettstein G, Mignot G, Ghiringhelli F and Garrido C: Dual role of heat-shock proteins as regulator of apoptosis and innate immunity. *J Innate Immun* 2: 238-247, 2010.

Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE, Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1993;53(17):3976–3985.

Köktürk N, Yeğin D, Çiftçi TU, Mullaoğlu SB, Öztürk C. Akciğer Kanserlerinde Epidemiyolojik Özellikler Yıllar içinde Değişim Gösteriyor mu? *Toraks Dergisi*, 2004;5:137-42.

Leonardi E. et al. Pcn and Ki67 Expression in Breast-Carcinoma - Correlations with Clinical and Biological Variables. *J Clin Pathol* 45, 416–419 (1992).

Lewis DR, Check DP, Caporaso NE, Travis WD, Devesa SS. US lung cancer trends by histologic type. *Cancer* 2014;120(18):2883-92. <https://doi.org/10.1002/cncr.28749>

Luna-Vargas MPA, Chipuk JE. The deadly landscape of pro-apoptotic BCL-2 proteins in the outer mitochondrial membrane. *FEBS J* (2016) 283(14):2676–89. doi: 10.1111/febs.13624

Manabe N. et al. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: Regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *J Reprod Develop* 50, 493–514 (2004).

Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J (2005) Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* 22(3):355–370

Mehlen P, Hickey E, Weber LA, Arrigo AP: Large unphosphorylated aggregates as the active form of hsp27 which controls intracellular reactive oxygen species and glutathione levels and generates a protection against TNFalpha in NIH-3 T3-ras cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 241:187–192

Moran L, Mirault ME, Arrigo AP, Goldschmidt-Clermont M, Tissieres A: Heat shock of *Drosophila melanogaster* induces the synthesis of new messenger RNAs and proteins. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1978, 283:391–406.

Parcellier A, Schmitt E, Brunet M, et al. HSP27 is a ubiquitin-binding protein involved in I- κ B α proteasomal degradation. *J Biol Chem.* 2003; 278:21502-21508.

Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT (2011) Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta* 1813(1):238–259

Rogalla T, Ehrnsperger M, Preville X, Kotlyarov A, Lutsch G, Ducasse C, Paul C, Wieske M, Arrigo AP, Buchner J, Gaestel M: Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor alpha by phosphorylation. *J Biol Chem* 1999, 274:18947–18956.

Rothschild SI. Targeted Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer-Beyond EGFR and ALK. *Cancers (Basel)* 2015;7(2):930-49. doi: 10.3390/ cancers7020816.

Ruvolo PP, Deng X, Ito T, Carr BK, May WS. Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem.* 1999; 274:20296–20300. [PubMed: 10400650]

Rudin CM, Hann CL, Garon EB, et al. Phase II Study of Single-Agent Navitoclax (ABT-263) and Biomarker Correlates in Patients with Relapsed Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research.* 2012;18(11):3163–3169.

Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine.* 2006;355(24):2542–2550. doi:10.1056/NEJMoa061884.

Schmitt E, Parcellier A, Gurbuxani S, Cande C, Hammann A, Morales MC, Hunt CR, Dix DJ, Kroemer RT, Giordanetto F, Jäättelä M, Penninger JM, Pance A, Kroemer G and Garrido C: Chemosensitization by a non-apoptogenic heat-shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Res* 63: 8233-8240, 2003.

Spitz MR, Hong WK, Amos CI, et al. A risk model for prediction of lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99(9):715–726. [PubMed: 17470739]

Sreedhar AS, Kalmár E, Csermely P and Shen YF: Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* 562: 11-15, 2004.

Stark AM, Hugo HH, Tscheslog H, Mehdorn HM (2007) p53, BCL-2 and BAX in non-small cell lung cancer brain metastases: a comparison of real-time RT-PCR, ELISA and immunohistochemical techniques. *Neurol Res*, 29, 435-40.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 209–49.

Sun C, Chan F, Briassouli P and Linardopoulos S: Aurora kinase inhibition downregulates NF-kappaB and sensitises tumour cells to chemotherapeutic agents. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 220-225, 2007.

Suzuki M, Youle RJ, Tjandra N. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000; 103: 645–654.

Tan TT, White E. Therapeutic targeting of death pathways in cancer: mechanisms for activating cell death in cancer cells. *Adv Exp Med Biol* 2008; 615:81–104

Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. International Agency for Research on Cancer (IARC). 4th Ed. Lyon 2015.

Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res*. 2008; 68:3421-3428.

Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., and Croce, C (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440–1443.

Xia Y, Rocchi P, Iovanna JL and Peng L: Targeting heat shock response pathways to treat pancreatic cancer. *Drug Discov Today* 17: 35-43, 2012.

Wataru M, Ryoji S.: A study on chronologic change of the relationship between cigarette smoking and lung cancer based on autopsy diagnosis. *Cancer* 1984; 54: 11038-42

Wingo PA, Cardinez CJ, Landis SH, et al. Long-term trends in cancer mortality in the United States, 1930–1998. *Cancer*. 2003; 97(Suppl 12):3133–3275 [PubMed: 12784323]

