

## Asetilsalisilik Asit ve Salisilik Asitin Paklitaksel ile Eş Uygulamasının Prostat Kanseri Hücreleri Üzerindeki Olası Sinerjistik Etkilerinin Otofaji, ER stresi ve Apoptotik Hücre Ölümü ile İlişkisinin Araştırılması

### Investigation of Possible Synergistic Effects of Co-administration of Acetylsalicylic Acid and Salicylic Acid with Paclitaxel on Autophagy, ER stress and Apoptotic Cell Death in Prostate Cancer Cells

Yalçın ERZURUMLU <sup>1\*</sup>, Deniz ÇATAKLI <sup>2</sup>, Hatice Kübra DOĞAN <sup>3</sup>

<sup>1</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

<sup>2</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye

<sup>3</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Isparta, Türkiye



## Ö Z

Prostat kanseri, dünya genelinde erkeklerde en sık görülen ikinci kanser türüdür ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasında beşinci sırada yer almaktadır. Kemoterapötikler ve anti-androjenler prostat kanseri tedavisinde sıklıkla kullanılan yaklaşımlar olmasına karşın kazanılan ilaç direnci ve gelişen kastrasyona direnç mekanizmaları nedeniyle kullanımları sınırlanmaktadır. Bu nedenle mevcut tedavilere ait yan etkilerin giderilmesi ve hali hazırda kullanılan ajanların terapötik etkinliklerinin geliştirilebilmesi için yeni yaklaşımlara olan ihtiyaç devam etmektedir. Bu çalışma kapsamında, asetilsalisilik asit (ASA) ve salisilik asit (SA)'in tek başına veya kemoterapiye dirençli çeşitli kanser türlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılan bir anti-mitotik ajan olan Paklitaksel ile kombine uygulamalarının prostat kanseri hücrelerinde katlanmamış protein yanıtı (UPR) sinyalinin PERK kolu, otofaji ve apoptotik hücre ölümü aracılı olası etki mekanizmaları incelendi. Bulgularımız, Paklitaksel'in ASA ve SA ile kombinasyonunun otofaji mekanizmasını uyardığını ve UPR'nin PERK kolu aktivasyonu aracılı CHOP uyarımına ve apoptotik proteinler olan kaspaz-3 ve PARP-1 kesimine neden olarak prostat kanseri hücrelerinde güçlü anti-kanser etkiler sergilediğini göstermiştir. Bu sonuçlar, prostat kanseri tedavisinde ASA ve SA'nın Paklitaksel ile kombinasyonunun Paklitaksel'in anti-kanser etkinliğini geliştirerek etkili bir tedavi yaklaşımı sunabileceğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptozis, Asetilsalisilik asit, Katlanmamış protein yanıtı, Salisilik asit, Paklitaksel, Prostat kanseri, Otofaji

Alınış / Received: 11.11.2022 Kabul / Accepted: 05.05.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



## ABSTRACT

Prostate cancer is the second most common type of cancer in men and the fifth leading cause of cancer-related death worldwide. Although chemotherapeutics and anti-androgens are frequently used approaches in the treatment of prostate cancer, their use is limited due to acquired drug resistance and developing castration resistance mechanisms. For this reason, the need for new approaches continues to eliminate the side effects of existing treatments and to improve the therapeutic efficacy of currently used agents. In the present study, we investigated the effect of acetylsalicylic acid (ASA) and salicylic acid (SA) alone or their combination with Paclitaxel which is an anti-mitotic agent frequently used in the treatment of various chemotherapy-resistant cancer types, on the PERK branch of unfolded protein response (UPR) signaling, autophagy and apoptotic cell death in prostate cancer cells. Our findings showed that the combination of Paclitaxel with ASA and SA has strong anti-cancer effects on prostate cancer cells by inducing autophagy, causing CHOP stimulation via the PERK arm of the UPR and activating apoptotic proteins caspase-3 and PARP-1. These results suggest that the combination of ASA and SA with Paclitaxel may offer an effective treatment approach by improving the anti-cancer efficacy of Paclitaxel in the treatment of prostate cancer.

**Keywords:** Apoptosis, Acetylsalicylic acid, Unfolded Protein Response, Salicylic acid, Paclitaxel, Prostate cancer, Autophagy



## 1. Giriş

Prostat kanseri, dünya genelinde erkeklerde akciğer kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanser türü olup, kansere bağlı ölüm nedenleri arasında beşinci sırada yer almaktadır [1]. 2023 yılında yaklaşık 288.300 yeni prostat kanseri vakası tespit edileceği ve 34.700 kişinin prostat kanseri nedeniyle yaşamını yitireceği düşünülmektedir [2] Genetik yatkınlık başta olmak üzere, aile öyküsü, ırk/etnik köken, bireysel ve çevresel faktörler hastalığın epidemiyolojisinde önemli rollere sahiptir [3]. Tanıdan sonraki 5 yıl içerisinde prostat kanserli hastaların %10 ile %20'sinde kastrasyona dirençli prostat kanserine dönüşümün gerçekleşebildiği bilinmektedir [4]. Uzun yıllardır kullanılmakta olan tıbbi veya cerrahi kastrasyon yolları aracılı sürdürülen androjen yoksunluğu tedavisi (ADT), metastatik prostat kanserinin birincil tedavisi olmuştur, fakat hastalarda gelişen kastrasyon direnci tedavinin etkinliğini büyük oranda kısıtlamaktadır [5]. Bu sebeple günümüzde prostat kanseri tedavisinde kullanılmakta olan kemoterapötik aracılı ya da hormonal tedavi yaklaşımlarının etkinliğini destekleyen yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasına ve karsinogenez sürecinin moleküler mekanizmalarını seçici olarak hedefleyen güçlü tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olan ihtiyaç devam etmektedir.

Aspirin®'in birincil metaboliti olan salisilik asit (SA), antik çağ dönemlerinden beri ağrı, ateş ve iltihaplanma için yaygın olarak kullanılmaktadır. Salisin metabolizmasından türetilen SA veya o-hidroksibenzoik asit, akne tedavilerinde kullanılan steroid olmayan anti-inflamatuar etkileri ile bilinmektedir [6]. Kimyasal olarak SA, aromatik bir halka, bir hidroksil grubu ve diğer fonksiyonel türevleri olan geniş bir fenolik bileşik grubuna aittir. SA türevleri kozmetik, gıda endüstrilerinden farmasötik ürünlere kadar çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [7]. Asetilsalisilik asit (ASA) ve SA gibi nonsteroidal antiinflamatuar ilaçların (NSAID'ler) kalın bağırsak kanserinde [8] ve insan akciğer adenokarsinomunda [9] apoptozisi indüklediği bildirilmiştir. SA'nın etki mekanizmaları siklooksijenaz-2 (COX-2, cyclooxygenase-2) enzimini hedeflemeyi, DNA onarımını ve tümör protein 53 (TP53, tumor protein 53), siklin bağımlı kinaz 1 (CDKN1, Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A) ve Bcl-2-ilişkili X protein (BAX, Bcl-2-associated X protein) gibi tümör baskılayıcı genlerin yukarı düzenlenmesini kapsamaktadır [10].

ASA ve salisin ön ilacını içeren söğüt ağacının özleri, eski Mısırlılar tarafından vücut spazmlarını gidermek için kullanılmıştır [11]. Daha sonra SA'ya asetil grubu eklenerek asetilsalisilat tozu sentezlenmiştir. Günümüzde yaygın olarak kullanılan ilaçlardan biri olan Aspirin® (asetilsalisilik asit) ve diğer NSAID'ler, etkili dozlarda COX enzimlerini inhibe ederek araşidonik asidin prostanoidlere dönüşümünü bloke eder [12]. ASA'nın kanserli hücreler üzerindeki etkisinde diğer NSAID'lere benzer olduğu düşünülmektedir [13]. Ayrıca ASA'nın kanser hücreleri üzerindeki baskılayıcı etkisiyle ilişkili trombosit-tümör hücre etkileşiminin azalması, sitokinlerin, kemokinlerin, pro-anjiyojenik ve büyüme faktörlerinin trombosit salınımının azaltılması gibi olası mekanizmalar öne sürülmüştür [14]. Ancak günümüzde halen daha ASA'nın karsinogenez üzerindeki etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır.

Paklitaksel (Taxol®), *Taxus brevifolia*'nın kabuğunda ve iğnelerinde doğal olarak üretilen trisiklik halkaya sahip lipofilik bir diterpenoid bileşiktir. İlk olarak 1963 yılında, Wani ve Wall tarafından Pasifik porsuk ağacı kabuğundan ham özüt olarak elde edilmiştir [15,16]. Paklitaksel kanser hücrelerinde antimitotik etki sergileyerek apoptozu uyarmaktadır [17]. Klinik deneylerde kullanılan ilk taksan sınıfı ilaç olmasıyla birlikte özellikle kemoterapiye direnç gösteren birçok kanser türünün tedavisinde sıklıkla kullanılan bir kemoterapötik ajandır [18]. Ancak tümör hücrelerinde henüz mekanizmaları tam olarak aydınlatılmamış taksanlara karşı gelişen direnç nedeniyle kullanımları sınırlanabilmektedir. Bu nedenle prostat kanseri başta olmak üzere kanser tedavilerinde yaşam kalitesinin iyileştirilmesi ve bu yan etkilerin giderilmesi amacıyla yeni anti-kanser bileşiklerin keşfi veya mevcut bileşiklerin sinerjistik etkilerinin araştırılması oldukça önemlidir [19].

Otofaji memeli hücrelerinde ileri düzeyde korunmuş karmaşık fizyolojik mekanizmalardan biridir. Otofaji çift membranla sarılmış keselerin lizozom ile füzyonu aracılı olarak yanlış katlanmış ve kümelenmiş proteinlerin, hücrelerdeki hasarlı organellerin, ribozomların ve hücre içi patojenlerin yıkımından sorumlu olan hücresel homeostazisin korunmasında kritik öneme sahip sofistike bir moleküler mekanizmadır [20]. Bununla birlikte hücrelerde seyreden bazal otofajinin kontrolünün bozulmasına bağlı olarak apoptotik olmayan bir hücre ölüm mekanizması olarak çalışabilmektedir [21]. Bu nedenle hücrelerdeki otofajik aktivitenin hassas bir şekilde regüle edilmesi oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalar otofajinin otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kalp hastalıkları, enfeksiyon ve kanser gibi çok sayıdaki hastalığın patofizyolojisinde önemli rollere sahip olduğunu ortaya koymuştur [22,23].

Tümör hücrelerinin büyümelerinde ve adaptasyonunda otofajinin önemli rolü olduğu bilinmektedir. Ancak otofajinin kanserin aşamalarına bağlı olarak tümör-baskılayıcı veya tümör-destekleyici olarak ikili bir rol oynadığına dair belirsizlik devam etmektedir ve karsinogenez sürecindeki kesin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır [24]. Ayrıca kanser tedavisinde kullanılan birçok ajanın hücrelerdeki otofajiyi doğrudan etkilediği günümüzde artık daha iyi anlaşılmıştır [25,26]. Bununla birlikte otofaji kemoterapötik ajanlara karşı sağ kalım ve direnç kazanımı mekanizması olarak çalışabilmesine karşın otofaji aracılı hücre ölüm mekanizması olarak antikanser ilaçlarının etkinliğine katkıda da bulunmaktadır. Bu nedenle terapötik yaklaşımlarda otofajinin hedeflenmesi ilaç direncinin aşılması ve antikanser tedavilerin terapötik yararlanımlarının geliştirilmesi için umut verici bir yaklaşım olarak önerilmektedir.

Endoplazmik retikulum (ER), protein sentezi, transportu ve katlanması, lipid ve steroid sentezi, kalsiyum homeostazı gibi önemli hücresel süreçleri düzenleyen multi-fonksiyonel bir organdır [27]. Hücresel gereksinimlere bağlı olarak ER'nin kapasitesinin yetersiz kalması ya da ER içersinde devam eden mekanizmaların aksaması ER stresi olarak ifade edilen süreci tetiklemektedir. Hücreler ER'nin fizyolojik gereksinimlere optimum cevap verebilmesi için katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak ifade edilen ileri düzeyde regüle edilen sinyal mekanizmasını aktive etmektedir. UPR, yüksek düzeyde protein sentezi ve katlama kapasitesi ihtiyacı gibi aşırı metabolik faaliyetler altında ökaryotik hücrelerin yeniden programlanmasında önemli bir rol oynar [28]. Ayrıca kanser hücreleri için bir sağ kalım mekanizması gibi çalışabilmekle birlikte ilaç direnci gelişimi ile ilişkili olduğu da bilinmektedir. UPR sinyalizasyonu ER membranında lokalize üç transmembran proteini olan inositol gerektiren kinaz 1 alfa (IRE1 $\alpha$ , inositol requiring protein-1 $\alpha$ ), aktive edici transkripsiyon faktörü (ATF6, activating transcription factor-6) ve protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (PERK, PKR-like ER kinase) tarafından düzenlenir [29]. UPR hücreler için bir sağ kalım mekanizması olarak çalışabilmesine karşın UPR sinyalinin uzun süreli uyarımı altındaki hücrelerde programlanmış hücre ölümünün indüklenbildiği bilinmektedir [30].

Bu çalışmada, uzun yıllardır ağırlı hastalıkların tedavisinde sıkça kullanılan ve anti-inflamatuar etkileri olduğu bilinen SA ve ASA bileşikleri ile yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan biri olan Paklitaksel'in birlikte kullanımının prostat kanseri hücrelerinde otofaji, ER stresi ve hücre ölümü ile ilgili

proteinler üzerindeki olası sinerjistik etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. *In vitro* deneme sonuçlarımız ASA ve SA'nın Paklitaksel ile eş uygulamasının sinerjistik etkiler sergileyerek Paklitaksel'in prostat kanseri hücreleri üzerindeki anti-kanser etkilerini geliştirebileceğini önermektedir.

## 2. Materyal ve Metot

**Materyaller:** Asetilsalisilik asit (#A5376) ve salisilik asit (#105910) Sigma-Aldrich firmasından temin edildi. Paklitaksel (sc-201439) Santacruz Biotechnology, Bafilomycin A1 (#54645) ve Staurosporin (#9953) Cell Signaling Technology firmasından satın alındı. Çalışmalarda kullanılan hücre kültürü plastik malzemeleri Sarstedt firmasından temin edildi. Paklitaksel, asetilsalisilik asit ve salisilik asit Biological Industries firmasından temin edilen steril hücre kültürü grade H<sub>2</sub>O'da çözülerek hazırlandı. Bafilomycin A1 ve Staurosporin SERVA firmasından temin edilen moleküler biyoloji grade dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülerek hazırlandı. Hücrelere uygulanan DMSO içeriği %0.05'i geçmedi.

**Hücre Kültürü:** Çalışmalarda kullanılan insan epitelyal prostat karsinoma hücre hattı olan LNCaP hücreleri American Type Culture Collection (ATCC)'dan temin edildi. Kültür çalışmalarında kullanılan fetal sıgır serumu (FBS), Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640) besi ortamı ve hücrelerin büyümeleri için gereksinim duyulan diğer yardımcı malzemeler Capricorn Scientific'ten satın alındı. Hücreler %10 FBS ve 2 mM L-glutamin içeren RPMI1640 besi yeri içerisinde konvansiyonel hücre kültürü şartları olan 37 °C ve %5 CO<sub>2</sub> bulunan hücre kültürü inkübatöründe kültüre edildi. Düzenli aralıklarla hücrelerin mikoplazma içermediği EZ-PCR™ Mikoplazma Tespit Kiti (Biological Industries) kullanılarak doğrulandı.

**İmmünoblotlama:** İmmünoblotlama çalışmaları daha önceki çalışmalarımızda rapor edildiği gibi gerçekleştirilmiştir [31]. LNCaP hücreleri %1 memeli proteaz inhibitörü içeren radyoimmünopresipitasyon testi (RIPA) tamponu ile lizatlandı. Örnekler 4 °C'de 20 dakika boyunca 14.000 r.p.m'de santrifüj edildi ve süpernatant kullanılmak üzere saklandı. İzole edilen proteinlerin total protein içeriğinin belirlenmesi amacıyla bikinkoninik asit (BCA) (Takara) protein tahlil yöntemi kullanıldı. Çalışmalarda 25-30 µg protein örneği kullanıldı. Protein örnekleri 4x Laemmli tamponu içerisinde 95 °C'de 5 dakika ısıtılarak denatüre edildi. Örnekler hazırlanan sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) jeline yüklenerek 2 saat süre ile elektroforez işlemine tabi tutuldu. Takiben protein örnekleri poliviniliden diflorür (PVDF) (Bio-Rad) membranına transfer edildi. Bu işlem sonrasında membran sırasıyla bloklama, birincil antikor uygulanması, yıkama işlemi, HRP-konjuge ikincil antikor uygulanması, yıkama işlemi ve kemiluminesans görüntüleme işlemlerine tabi tutuldu. Protein bantlarının görüntülenmesi için Clarity™ Western ECL substrat (Bio-Rad) çözümü kullanıldı ve protein bantları ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) sisteminde görüntüldü.

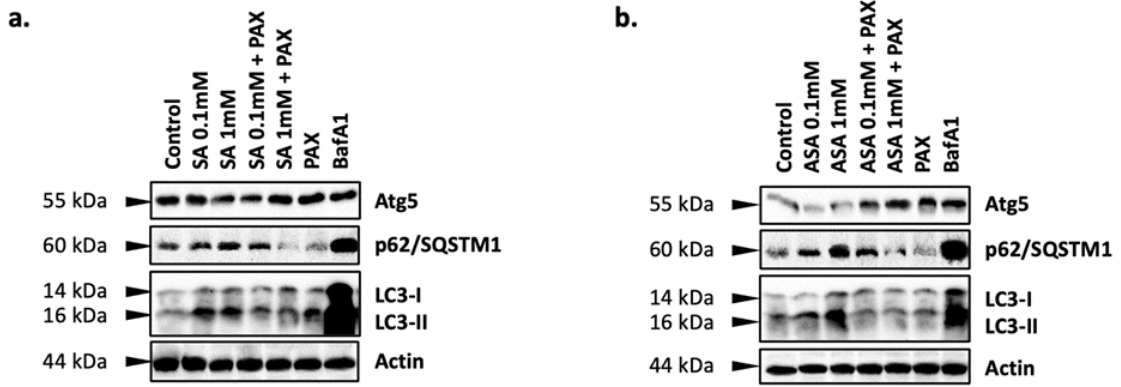
İmmünoblotlama çalışmalarında kullanılan monoklonal tavşan anti-LC3-I/II (#12741)(1:2000), anti-Atg5 (#12994)(1:2000), poliklonal tavşan anti-p62/SQSTM1(#5114)(1:2500), anti-eIF2α (#9722)(1:3000), anti-phospho (Ser51)-eIF2α (#9721)(1:3000) ve fare monoklonal anti-CHOP (#2895)(1:2000) primer antikorları Cell Signaling firmasından temin edildi. Tavşan poliklonal anti-PERK (#24390-1-AP)(1:2500), anti-Caspase 3 (#19677-1-AP)(1:1000) ve anti-PARP-1 (#13371-1-AP)(1:1500) antikorları Proteintech firmasından sağlandı. Fare monoklonal anti-beta-actin (#A5316)(1:10000) antikorunu Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.

## 3. Bulgular

### Paklitaksel'in Salisilik Asit ve Asetilsalisilik Asit ile Kombinasyonu LNCaP Hücrelerinde Otofajiyi İndükler

Çalışmamız kapsamında kullanılan Paklitaksel, ASA ve SA dozları literatür taramaları sonrasında hücreler üzerinde belirlenen IC<sub>50</sub> doz değerlerine göre seçilmiştir [32-34]. İlk olarak Paklitaksel'in tek başına ve ASA/SA ile kombine tedavisinin otofaji üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla immünoblotlama çalışmaları gerçekleştirildi. Bu kapsamda, LNCaP hücrelerine 24 saat süre ile 0.1 ve 1 mM konsantrasyonlarında ASA ve SA, 10 nM Paklitaksel ve ASA, SA ve Paklitaksel'in kombinasyonları uygulandı (Şekil 1a, b). Otofaji ile ilişkili Atg5, p62/SQSTM1 ve LC3-I/II protein ifade düzeyleri incelendi [35]. Yalnız başına Paklitaksel uygulaması Atg5 ve LC3-II düzeylerini kontrol grubuna kıyasla arttırdı. Buna karşın p62/SQSTM1 düzeyleri Paklitaksel uygulamasına bağlı olarak kontrol grubuna kıyasla azaldı. SA ve ASA uygulamalarının doz bağımlı olarak Atg5 düzeylerini azalttığı belirlendi. LC3-II ve p62/SQSTM1 düzeylerinin ise ASA ve SA uygulamalarına bağlı olarak arttığı saptandı. ASA ve SA'nın

Paklitaksel ile eş uygulaması Atg5 ve LC3-II düzeylerini arttırırken p62/SQSTM1 düzeylerinde azalmaya neden olduğu belirlendi (Şekil 1a, b). Bu deney sisteminde bafilomisin A1 (BafA1) otofajik inhibisyonunun pozitif kontrolü olarak kullanılmıştır [35]. Beklendiği gibi BafA1 uygulaması LC3-I ve özellikle LC3-II ifade düzeylerinde ve p62/SQSTM1 düzeylerinde artışa neden olduğu belirlendi. Toplu olarak bu sonuçlar Paklitaksel'in ASA ve SA ile kombine uygulamasının Atg5 düzeyini ve LC3 dönüşümünü artırarak ve bir otofajik substrat proteini olan p62/SQSTM1 düzeylerini azaltarak otofajiyi hızlandırdığını göstermiştir.

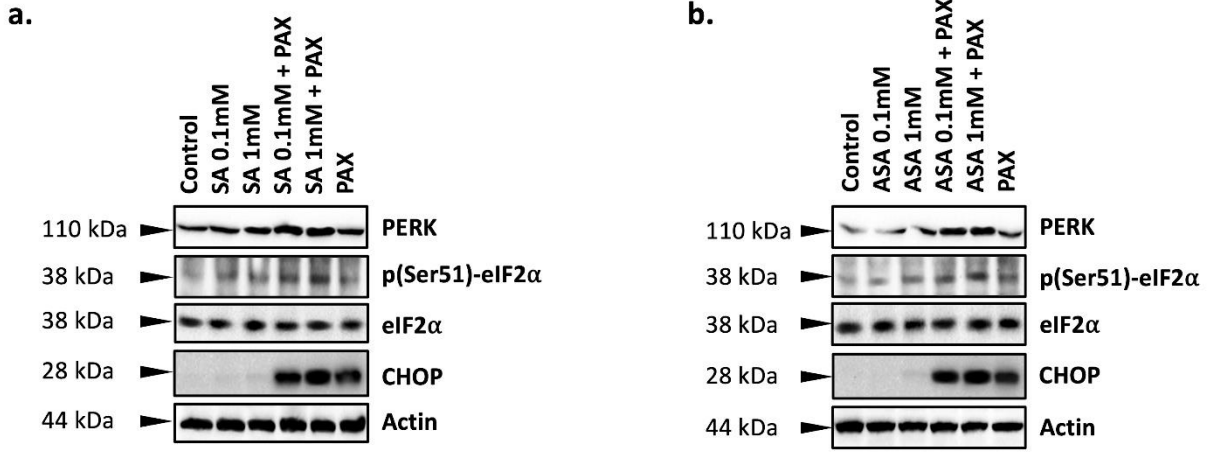


**Şekil 1.** Salisilik asit ve asetilsalisilik asitin Paklitaksel ile kombine uygulamasının otofaji üzerine olan etkisinin incelenmesi. LNCaP hücrelerine 24 saat süre ile 0.1mM ve 1mM konsantrasyonlarında salisilik asit ve asetilsalisilik asit, 10nM Paklitaksel veya salisilik asit ve asetilsalisilik asitin Paklitaksel ile eş uygulamaları gerçekleştirildi. 1µM bafilomisin A1 otofaji inhibitörü olarak kullanıldı. Atg5, p62/SQSTM1 ve LC3-I/II protein düzeylerindeki değişimler immünoblotlama çalışmaları ile incelendi. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

### **Paklitaksel'in Salisilik Asit ve Asetilsalisilik Asit ile Kombinasyonu LNCaP Hücrelerinde Katlanmamış Protein Yanıtı Sinyalinin PERK Kolunu Uyarr**

Paklitaksel'in SA ve ASA ile kombine uygulamasının UPR sinyali üzerindeki etkisini test etmek amacıyla PERK proteini ve UPR'nin PERK kolunun aşağı efektörü olan ve UPR indüksiyonu altında serin 51 pozisyonundan fosforilasyona uğradığı bilinen eIF2 $\alpha$  (eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$ ) düzeyi ve bu akışın devamındaki efektör proteini olan CHOP (C/EBP Homologous Protein) protein düzeylerine olan etkisini immünoblotlama ile inceledik (Şekil 2a, b). Tek başına Paklitaksel tedavisi kontrol grubuna kıyasla PERK ve p(Ser51)-eIF2 $\alpha$  düzeylerini arttırdığı belirlendi. Yalnızca SA ve ASA uygulamalarının da PERK ve p(Ser51)-eIF2 $\alpha$  düzeylerini arttırdığı saptandı. Paklitaksel'in SA ve ASA ile eş uygulamasının p(Ser51)-eIF2 $\alpha$  düzeylerini yalnızca Paklitaksel, SA ve ASA uygulamalarına kıyasla doz bağımlı olarak daha güçlü bir şekilde arttırdığı belirlendi. Total eIF2 $\alpha$  düzeylerinde ise belirgin bir değişim olmadığı saptandı. CHOP protein düzeylerinin ASA ve SA uygulamasına bağlı olarak etkilenmediği Paklitaksel uygulaması ile arttığı gözlemlendi. ASA ve SA'nın Paklitaksel ile eş uygulamasının Paklitaksel'in neden olduğu artan CHOP düzeylerini güçlendirdiği belirlendi (Şekil 2a, b). Bu sonuçlar Paklitaksel'in ASA ve SA ile kombine uygulamasının UPR'nin PERK kolunu eş bir şekilde uyararak artan CHOP protein ifade düzeylerine neden olduğunu göstermiştir.

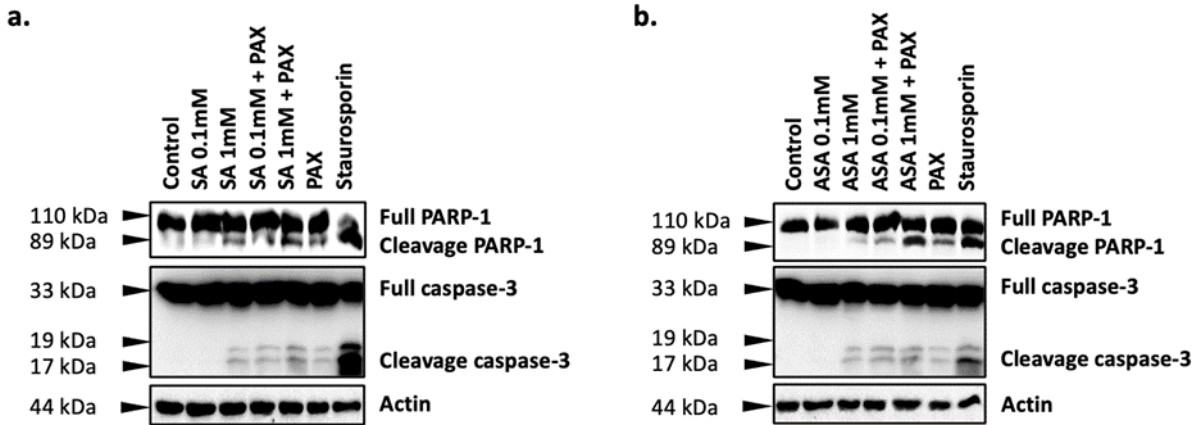




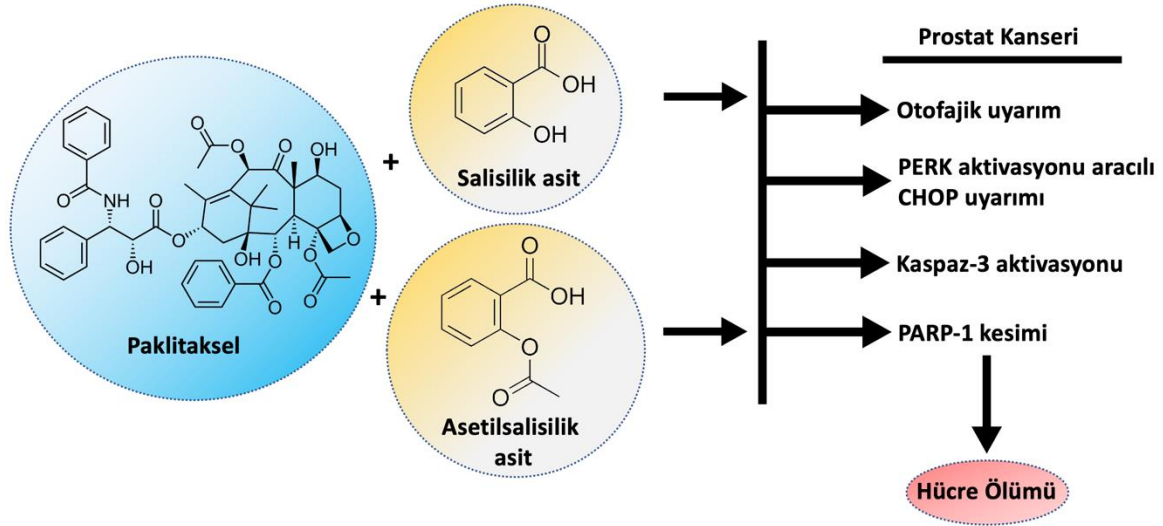
**Şekil 2.** Salisilik asit ve asetilsalisilik asitin Paklitaksel ile kombine uygulamasının UPR'nin PERK kolu üzerine olan etkisinin incelenmesi. LNCaP hücrelerine 24 saat süre ile 0.1mM, 1mM konsantrasyonunda salisilik asit ve asetilsalisilik asit 10nM Paklitaksel veya salisilik asit ve asetilsalisilik asitin Paklitaksel ile eş uygulamaları gerçekleştirildi. PERK, eIF2α, p(Ser51)-eIF2α ve CHOP protein düzeylerindeki değişimler immünoiblottama çalışmaları ile incelendi. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

### Paklitaksel'in Salisilik Asit ve Asetilsalisilik Asit ile Kombinasyonu LNCaP Hücrelerinde Apoptotik Hücre Ölümü ile İlişkili Protein Düzeylerini Artırır

Paklitaksel'in ASA ve SA ile kombine uygulamasının LNCaP hücrelerinde apoptotik hücre ölümü üzerine olan etkisini değerlendirmek amacıyla kesime uğramamış poli (ADP-riboz) polimeraz 1 (PARP-1, poly [ADP-ribose] polymerase 1) (110kDa) ve kaspaz-3 (33kDa) ile bunların kesim ürünlerinin (PARP-1 için 89kDa, kaspaz-3 için 19, 17kDa) protein düzeyleri immünoiblottama çalışmaları ile incelendi (Şekil 3a, b). Bu çalışmalarda 1µM staurosporin PARP-1 ve kaspaz-3 kesimini uyaran pozitif kontrol olarak kullanıldı. Beklendiği gibi staurosporin uygulaması PARP-1 ve kaspaz-3 kesim ürünlerinin oluşumunu uyardı. Yalnızca Paklitaksel uygulamasının PARP-1 ve kaspaz-3 aktivasyonunu uyardığı belirlendi (Şekil 3a, b). ASA ve SA uygulamalarının yalnızca 1mM uygulama dozlarında PARP-1 ve kaspaz-3 kesim ürünlerinin oluşumunu uyardığı belirlendi. Yalnızca Paklitaksel uygulaması PARP-1 ve kaspaz-3 kesim ürünlerinin oluşumunu uyardı. Paklitaksel, ASA ve SA ile eş uygulamasının sinerjistik etki göstererek PARP-1 ve kaspaz-3 kesimlerini doz-bağımlı olarak yalnızca Paklitaksel veya ASA ve SA uygulamalarına kıyasla daha güçlü düzeyde uyardığı belirlendi (Şekil 3a, b).



**Şekil 3.** Salisilik asit ve asetilsalisilik asitin Paklitaksel ile kombine uygulamasının kaspaz-3 ve PARP-1 kesimi üzerine olan etkisinin incelenmesi. LNCaP hücrelerine 24 saat süre ile 0.1mM, 1mM konsantrasyonunda salisilik asit ve asetilsalisilik asit 10nM Paklitaksel veya salisilik asit ve asetilsalisilik asitin Paklitaksel ile eş uygulamaları gerçekleştirildi. 1µM staurosporin apoptotik uyarıcı olarak kullanıldı. PARP-1 ve kaspaz-3 protein düzeylerindeki değişimler immünoiblottama çalışmaları ile incelendi. Beta-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.



**Şekil 4.** Salisilik asit ve asetilsalisilik asitin Paklitaksel ile kombine uygulamasının etki mekanizmasının gösterimi.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Dünya genelinde erkeklerde en sık teşhis edilen malignitelerden biri olan prostat kanserinin önlenmesi ve tedavi edilebilmesine yönelik çok sayıda hedefli tedavi geliştirilmiştir. Ancak kemoterapötiklerin ya da sıklıkla kullanılan anti-androjenlerin prostat kanseri progresyonu üzerinde kısıtlı ölçüde başarı sağladığı bilinmektedir [36]. Prostat kanserinin moleküler patogenezinde pro-inflamatuar sinyal mekanizmalarında yer alan gen ve proteinlerdeki değişikliklerin önemli olduğu ortaya konulmuştur [37]. Elde edilen bulgular, inflammatuar mekanizmaların da prostat kanseri gelişiminde rol oynayabileceğini göstermiştir. Yapılan çalışmalar, SA, ASA ve diğer NSAID'lerin prostat kanseri riskini azaltabileceğini göstermiştir [38,39].

Trombositler, homeostazın sürdürülmesinde çok önemli bir role sahiptir ve son kanıtlar, kanser progresyonunda da önemli olduklarını göstermiştir. Ayrıca, son yıllarda aspirin bazlı kemoterapötikler için klinik öneriler oluşturulmuştur [40]. Aspirin® olarak bilinen ASA, analjezik, antipiretik özellikleri ile kardiyovasküler profilaksi için en sık kullanılan anti-platelet ajanlardan biridir [41,42]. *In vitro* çalışmalar, trombositlerin kanser hücrelerinde c-Myc dahil onkogenik proteinlerin aşağı düzenlenmesinin ASA'ya duyarlı olduğunu ortaya koymuştur [14]. Ayrıca, malign tümör mikro çevresinde COX-1 ve COX-2 ekspresyonunun yüksek olduğu ve bunun pro-inflamatuar ve apoptotik belirteç düzeyleriyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [43,44]. Bunun yanı sıra artan COX-2 ekspresyonları baş-boyun, pankreas, akciğer, meme ve kolon kanseri gibi birçok kanser türünde görülmüştür [42]. SA, anti-inflamatuar tedavide iyi bilinen farmakolojik bir etkiye sahiptir [46]. ASA ve SA uzun yıllardır çeşitli hastalıkların tedavisinde sıklıkla kullanılan ve kanser hücreleri üzerinde de önemli etkileri olabileceği düşünülen bileşikler olmasına rağmen prostat kanseri üzerindeki etkileri tam olarak bilinmemektedir [47].

Paklitaksel antimitotik ilaçlar olarak da bilinen mitoz inhibitörleri sınıfındandır. Mitoz inhibitörleri hücre bölünmesi sürecinde olan hücreleri hedefleyen kemoterapötik ilaçlardır [17]. Paklitaksel mikrotübül depolimerizasyonunu engelleyerek mikrotübül etkinliğinde değişimlere yol açar ve bu yol ile mitoz ve hücre proliferasyonu için gerekli mikrotübül ağının bozulmasına neden olabilir [48]. Yapılan çalışmalar Paklitaksel'in uygulama dozuna bağlı olarak farklı etkileri olduğunu göstermiştir. Düşük konsantrasyonlarda (5-30 nM) mikrotübül dinamiğini etkileyerek G2/M fazında duraklamaya neden olurken [49], yüksek konsantrasyonlarda (0.2 µM-30 µM) mikrotübül hasarına [50], mitojen ile uyarılmış protein kinazların (MAPK), Raf-1 protein tirozin kinazların, c-JUN kinazların, siklin bağımlı kinazların ve kaspazların gen anlatımlarında değişimlere yol açtığı rapor edilmiştir [51]. Buna karşın Paklitaksel'in bazı hücreler üzerinde etkili olması ancak bazı kanser tiplerinde etkisiz olması biyokimyasal etkilerinin yalnızca mitotik duraklama ile ilişkili olmadığını ve henüz tam olarak anlaşılmamış başka hücresel mekanizmaların da varlığına işaret etmektedir [19]. Bu çalışma kapsamında Paklitaksel'in SA ve ASA ile eş uygulamasının prostat kanseri üzerinde otofaji, UPR ve apoptotik hücre ölümü ile ilişkisi incelenmiştir.

Tip-II hücre ölümü olarak bilinen otofaji uzun ömürlü ve hatalı katlanmış proteinlerin, hasarlı organellerin otofagozomlar aracılığıyla lizozomlara yönlendirilmesinden ve bu yol ile yıkımından sorumlu ileri düzeyde korunmuş sofistike bir mekanizmasıdır. Ayrıca otofaji protein geri dönüşümü için hücrelerde çalışan en etkili mekanizmalardan birisidir [52]. Radyasyon, metabolik stres, ER stresi ve kemoterapötikler gibi çeşitli faktörlerin otofajiyi indüklediği gösterilmiştir [53]. Otofajinin karsinogenezin farklı aşamalarında dinamik bir rolü olduğu, tümör baskılayıcı veya destekleyici rolleri üstlendiği bilinmektedir [54]. Kemoterapötiklerin ve birçok doğal ürünün doğrudan otofaji üzerinde düzenleyici etkileri olduğu belirlenmiştir [55-58]. Hücrelerdeki artan otofajik aktivitenin hücre ölümüne neden olabilmektedir. Buna karşın yavaşlayan otofaji hücrenin ihtiyaç duyduğu besin gereksinimlerinin sağlanmasında kısıtlayıcı bir etkiye sebep olabildiğinden hücreler üzerinde olumsuz etkileri olabilmektedir. Bu nedenle çalışmalarımızda Paklitaksel ile SA ve ASA'nın eş uygulamasının otofaji üzerine olan etkileri incelenmiştir. Ayrıca Paklitaksel klinikte sıklıkla tercih edilen, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılmakta olan anti-mikrotübül bir ajandır ve kaspaz-3, kaspaz-9 ve PARP aktivasyonuna yol açarak intrinsik otofajiyi indüklediği bilinmektedir [59].

Hücrelerde otofajinin takibinde otofaji proteinlerinin düzeylerindeki değişimler, bir ubiquitin reseptörü olan ve otofajik yol ile yıkıma uğradığı bilinen substrat proteini p62/SQSTM1'in düzeylerindeki değişimler ve LC3-II'nin lipidasyonu ile oluşan LC3-II düzeylerinin incelenmesi gibi yaklaşımlardan faydalanılmaktadır [60]. Otofaji sırasında LC3-I, Atg7 ve Atg3'ünde yer aldığı ubiquitin benzeri bir sistem tarafından lipidasyon yoluyla LC3-II'ye dönüştürülür. LC3-II'nin otofagozomal membran oluşumunda yer aldığı bilinmektedir [61]. Atg5 fagoforik membran yapısının uzatılmasında anahtar rol oynayan bir proteindir [62]. p62/SQSTM1 turnover'ı otofajik aktivitenin takibinde hücre düzeyindeki çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. p62/SQSTM1 otofagozomal membran proteini LC3/Atg8'i bağlayarak p62/SQSTM1 içeren protein birikimlerini otofagozoma taşımaktadır. Otolizozomlar aracılı kargo proteinlerinin bozunması sırasında p62/SQSTM1 düzeylerinde azalma görülmektedir. Aksine otofajik blokasyon ise p62/SQSTM1 düzeylerinde artışa yol açmaktadır [63]. Sonuçlarımıza göre ASA ve SA'nın LNCaP hücrelerinde Atg5 düzeylerinde azalmaya, p62/SQSTM1 ve LC3-II düzeylerinde ise artışa neden olduğu belirlendi. Bununla birlikte yalnızca Paklitaksel uygulamasının ise LC3-II düzeylerinde düşük düzeyde artışa yol açtığı, p62/SQSTM1 düzeylerinde ise dikkat çekici bir azalmaya neden olduğu belirlendi. Atg5 düzeyleri ise Paklitaksel uygulaması ile artış gösterdi. Eş uygulama denemelerimizde SA ve ASA'nın Paklitaksel ile birlikte uygulaması p62/SQSTM1 düzeylerinde doz bağımlı düşüğe, Atg5 düzeylerinde ise artışa neden oldu. LC3-II düzeylerinde ise yalnızca SA ve ASA uygulamalarına kıyasla LC3-II düzeylerinde azalmaya neden olduğu belirlendi. Toplu olarak bu sonuçlar SA ve ASA'nın hücrelerdeki otofajik aktiviteyi yavaşlattığını buna karşı yalnızca Paklitaksel uygulamasının otofajiyi uyardığını göstermektedir. Eş uygulama denemeleri ise kombine tedavinin prostat kanseri hücrelerinde otofajik aktivitede daha güçlü bir artışına neden olduğunu işaret etmektedir (Şekil 1a, b).

ER stresi başta kanser olmak üzere birçok hastalığın patofizyolojisinin altında yatan önemli mekanizmalardan birisidir. ER hücrelerde protein sentezi, modifikasyonu, kalite-kontrolü ve selektif olarak yıkıma yönlendirilmesinde başlıca rol oynayan organeldir [64]. Kanser hücreleri artan metabolik gereksinimlerini karşılayabilmek için ER stresi indüksiyonu yolu ile UPR sinyalini aktive etmektedir. UPR, ER'nin yeniden programlanmasında protein kalite kontrol süreci ile ilişkili protein gruplarının düzeylerinin arttırılmasında ve ER'nin kapasitesinin genişletilmesinde rol oynayan başlıca mekanizmadır [65]. Ayrıca kanser hücrelerinin ilaç direnci geliştirmesinde ER stresi ile ilişkili mekanizmalardan faydalandığı günümüzde daha iyi anlaşılmıştır. Buna karşın ER stresinin aşırı uyarımı programlanmış hücre ölümünü uyarabilmektedir [66]. Bu nedenle kansere yönelik geliştirilen terapilerde ER stresinin aşırı uyarımı temel hedefler arasında yer almaktadır. UPR sistemi ER membranında lokalize 3 transmembran proteini olan IRE1 $\alpha$ , ATF6 ve PERK aracılı olarak kontrol edilmektedir. Günümüzde PERK sinyalinin aşırı uyarımının hücre ölümündeki rolü iyi anlaşılmıştır [53]. PERK aktivasyonu, PERK'in aşağı efektör proteini olan protein translasyonunda görevli eIF2 $\alpha$ 'nın fosforilasyonunun indüksiyonuna neden olarak hücrelerdeki global translasyonun duraksamasına ve seçici olarak UPR hedef proteinlerinin translasyonuna izin vermektedir. Uzun süreli UPR aktivasyonunun pro-apoptotik bir transkripsiyon faktörü olan CHOP düzeylerinde artışa neden olarak ekstrinsik apoptotik hücre ölümünü tetiklediği bilinmektedir [67]. Bulgularımız, SA ve ASA uygulamasının PERK düzeylerinde artışa ve eIF2 $\alpha$  fosforilasyonuna neden olduğunu ancak hücrelerde yüksek düzeyde ER stresi uyarımı gerçekleşmediğinden CHOP aktivasyonunu uyarmadığını göstermektedir. Buna karşın Paklitaksel uygulamasının ER stresini güçlü bir şekilde uyardığı ve CHOP aktivasyonuna neden olduğu belirlendi. SA ve ASA'nın Paklitaksel ile eş uygulamasının yalnızca Paklitaksel uygulamasına kıyasla doza bağlı olarak CHOP uyarımını daha güçlü bir şekilde uyardığını göstermiştir (Şekil 2a, b). Bu sonuçlar Paklitaksel, ASA ve SA kombine tedavisinin



sinerjistik olarak ER stresinin yol açtığı PERK aktivasyonu aracılı olarak pro-apoptotik protein olan CHOP düzeyini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir.

Son olarak SA ve ASA'nın Paklitaksel'in hücreler üzerindeki apoptotik etkilerine olan olası katkılarını incelemek amacıyla hücrelerdeki apoptotik etkilerin incelenmesinde sıklıkla test edilen kaspaz-3 ve PARP-1'in kesim ürünlerinin düzeylerini inceledik [68]. Kaspaz-3; PARP-1 gibi birçok anahtar proteinin proteolitik kesiminden sorumlu olan önemli bir apoptotik aktivatördür ve aktivasyonu sırasında proteolitik olarak kesime uğramaktadır. Kaspaz-3'ün 17 ve 19 kDa'luk fragmentleri kaspaz-3 aktivasyonunun takibinde kullanılmaktadır [69]. PARP-1 hücrel streslerin neden olduğu DNA hasarlarının tamirinde rol oynamaktadır. Aşırı DNA hasarı PARP-1'in hiper aktivasyonuna yol açarak kaspaz enzimi aracılı olarak kesime uğramasına yol açmakta ve bu yol ile DNA'nın fragmentasyonuna ve hücrel parçalanmaya destek vermektedir. Bu nedenle 89 kDa'luk PARP-1 fragmanı apoptotik hücre ölümünün takibinde sıklıkla kullanılmaktadır [70,71]. SA ve ASA uygulamalarının kaspaz-3 ve PARP-1 kesimlerini yalnızca en yüksek dozlarında uyardığı belirlendi. Paklitaksel uygulamasının ise literatür ile uyumlu bir şekilde PARP-1 ve kaspaz-3 aktivasyonunu gerçekleştirdiği doğrulandı. Eş uygulama sonuçlarımız, 0.1mM SA ve ASA ile Paklitaksel eş uygulamalarında yalnız başına Paklitaksel uygulamasının neden olduğu PARP-1 ve kaspaz-3 kesim ürünlerinin düzeylerine kıyasla bir değişime yol açmadığını, 1mM SA ve ASA ile Paklitaksel eş uygulamalarının ise kaspaz-3 ve PARP-1 kesim ürünlerinin düzeylerini etkili bir şekilde arttırdığı saptandı (Şekil 3a, b). Bu sonuçlar 1mM SA ve ASA'nın Paklitaksel ile eş uygulamanın apoptotik proteinler üzerinde sinerjistik bir etki sergilediğini önermektedir.

Toplu olarak sonuçlarımız Paklitaksel'in SA ve ASA kombinasyonunun otofajik aktivasyona, UPR'nin PERK kolunun aktivasyonu aracılı CHOP uyarımına, apoptotik proteinler olan kaspaz-3 ve PARP-1 aktivasyonuna yol açarak prostat kanseri hücrelerinde güçlü etkilere sahip olduğunu önermektedir (Şekil 4). Bulgularımız Paklitaksel'in, SA ve ASA kombinasyonunun prostat kanseri hücrelerinde hücre ölüm mekanizmalarının aktivasyonuna yol açarak Paklitaksel'in terapötik etkinliğinin güçlendirilmesinde alternatif bir yaklaşım sunabileceğini düşündürmektedir.

## Teşekkür

Bu çalışmadaki bazı analizlerin gerçekleştirilmesinde kullanılan ekipmanların erişimine izin verdiğinden dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Yenilikçi Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi (YETEM)'ne teşekkür ederiz. Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesinde Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen (TSG-2021-8302, TAB-2020-8253) projemiz kapsamındaki bütçeden faydalanılmıştır.

## Etik Beyanı

*Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.*

## Kaynakça

- [1] Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. 2021. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 71(3), 209-249.
- [2] Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 73(1), 17-48.
- [3] Brookman-May, S. D., Campi, R., Henríquez, J. D. S., Klatte, T., Langenhuisen, J. F., Brausi, M., Linares-Espinós, E., Volpe, A., Marszalek, M., Akdogan, B., Roll, C., Stief, C. G., Rodríguez-Faba, O., & Minervini, A. 2019. Latest Evidence on the Impact of Smoking, Sports, and Sexual Activity as Modifiable Lifestyle Risk Factors for Prostate Cancer Incidence, Recurrence, and Progression: A Systematic Review of the Literature by the European Association of Urology Section of Oncological Urology (ESOU). European Urology Focus
- [4] Crawford, E. D., Petrylak, D., & Sartor, O. 2017. Navigating the evolving therapeutic landscape in advanced prostate cancer. Urologic Oncology, 35S, S1-S13.

- [5] Patrikidou, A., Lorient, Y., Eymard, J.-C., Albiges, L., Massard, C., Ileana, E., Di Palma, M., Escudier, B., & Fizazi, K. 2014. Who dies from prostate cancer? *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 17(4), 348–352.
- [6] Simić, A., Manojlović, D., Segan, D., & Todorović, M. 2007. Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics. *Molecules*, 12(10), 2327–2340.
- [7] Ekinci, D., Sentürk, M., & Küfrevioğlu, Ö. İ. 2011. Salicylic acid derivatives: synthesis, features and usage as therapeutic tools. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 21(12), 1831–1841.
- [8] Dachineni, R., Ramesh Kumar, D., Callegari, E., Kesharwani, S. S., Sankaranarayanan, R., Seefeldt, T., Jayarama Bhat, G. 2017. Salicylic acid metabolites and derivatives inhibit CDK activity: Novel insights into aspirin's chemopreventive effects against colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, 51(6), 1661-1673.
- [9] Veyselova, D., & Kutlu, H. M. 2015. Inhibitory effects of salicylic acid on A549 human lung adenocarcinoma cell viability. *Turkish Journal of Biology = Turk Biyoloji Dergisi / the Scientific and Technical Research Council of Turkey*, 39(1), 1–5.
- [10] Mahdi, J. G., Alkarrawi, M. A., Mahdi, A. J., Bowen, I. D., & Humam, D. 2006. Calcium salicylate-mediated apoptosis in human HT-1080 fibrosarcoma cells. *Cell Proliferation*. 39(4), 249-60.
- [11] Fuster, V., & Sweeny, J. M. 2011. Response to Letter Regarding Article, "Aspirin: A Historical and Contemporary Therapeutic Overview". *Circulation*. 124(12).
- [12] Vane, J. R., & Botting, R. M. 1996. The history of anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *New Targets in Inflammation*.
- [13] Narayanan, B. A., Narayanan, N. K., Pittman, B., & Reddy, B. S. 2006. Adenocarcinoma of the mouse prostate growth inhibition by celecoxib: downregulation of transcription factors involved in COX-2 inhibition. *The Prostate*, 66(3), 257–265.
- [14] Mitrugno, A., Sylman, J. L., Ngo, A. T. P., Pang, J., Sears, R. C., Williams, C. D., & McCarty, O. J. T. 2017. Aspirin therapy reduces the ability of platelets to promote colon and pancreatic cancer cell proliferation: Implications for the oncoprotein c-MYC. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 312(2), C176–C189.
- [15] Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., & McPhail, A. T. 1971. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, 93(9), 2325–2327.
- [16] Wall, M. E., & Wani, M. C. 1995. Camptothecin and taxol: discovery to clinic—thirteenth Bruce F. Cain Memorial Award Lecture. *Cancer Research*, 55(4), 753–760.
- [17] Matson, D. R., & Stukenberg, P. T. 2011. Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Molecular Interventions*, 11(2), 141–150.
- [18] Surapaneni, M. S., Das, S. K., & Das, N. G. 2012. Designing Paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges. *ISRN Pharmacology*, 2012, 623139.
- [19] Gascoigne, K. E., & Taylor, S. S. 2009. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells? *Journal of Cell Science*, 122(Pt 15), 2579–2585.
- [20] Denton, D., & Kumar, S. 2018. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death and Differentiation*, 26(4), 605–616.
- [21] Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*, 221(1), 3.
- [22] Mizushima, N. 2005. The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death and Differentiation*, 12 Suppl 2, 1535–1541.
- [23] Kundu, M., & Thompson, C. B. (2008). Autophagy: Basic Principles and Relevance to Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 3, 427-55.
- [24] Li, X., He, S., & Ma, B. 2020. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Molecular Cancer*. 19(12).
- [25] Sheng, J., Qin, H., Zhang, K., Li, B., & Zhang, X. 2018. Targeting autophagy in chemotherapy-resistant of hepatocellular carcinoma. *American Journal of Cancer Research*, 8(3), 354–365

- [26] Castoldi, F., Vacchelli, E., Zitvogel, L., Maiuri, M. C., Pietrocola, F., & Kroemer, G. 2019. Systemic autophagy in the therapeutic response to anthracycline-based chemotherapy. *Oncoimmunology*, 8(1), e1498285.
- [27] Hetz, C. (2012). The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 13(2), 89-102.
- [28] Tabas, I., & Ron, D. 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature Cell Biology*. 13(3), 184-90.
- [29] Sidrauski, C., & Walter, P. 1997. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*, 90(6), 1031–1039.
- [30] Corazzari, M., Gagliardi, M., Fimia, G. M., & Piacentini, M. 2017. Endoplasmic Reticulum Stress, Unfolded Protein Response, and Cancer Cell Fate. *Frontiers in Oncology*. 7:78.
- [31] Erzurumlu, Y., & Ballar, P. 2017. Androgen Mediated Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation and its Effects on Prostate Cancer. *Scientific Reports*, 7, 40719.
- [32] Viljoen, T.C., van Aswegen, C.H., du Plessis, D.J., 1995. Influence of acetylsalicylic acid and metabolites on DU-145 prostatic cancer cell proliferation. *Oncology*, 52(6), 465-9.
- [33] Tolba, M. F., Esmat, A., Al-Abd, A. M., Azab, S. S., Khalifa, A. E., Mosli, H. A., Abdel-Rahman, S. Z., & Abdel-Naim, A. B. 2013. Caffeic acid phenethyl ester synergistically enhances docetaxel and paclitaxel cytotoxicity in prostate cancer cells. *IUBMB Life*, 65(8), 716-29.
- [34] Ho, C.-C., Yang, X. W., Lee, T.-L., Liao, P.-H., Yang, S.-H., Tsai, C.-H., & Chou, M.-Y. 2003. Activation of p53 signalling in acetylsalicylic acid-induced apoptosis in OC2 human oral cancer cells. *Eur J Clin Invest*.
- [35] Yoshii, S. R., & Mizushima, N. 2017. Monitoring and Measuring Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(9).
- [36] Thompson, I. M., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Miller, G. J., Ford, L. G., Lieber, M. M., Cespedes, R. D., Atkins, J. N., Lippman, S. M., Carlin, S. M., Ryan, A., Szczepanek, C. M., Crowley, J. J., & Coltman, C. A., Jr. 2003. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, 349(3), 215–224.
- [37] Palapattu, G. S., Sutcliffe, S., Bastian, P. J., Platz, E. A., De Marzo, A. M., Isaacs, W. B., & Nelson, W. G. 2005. Prostate carcinogenesis and inflammation: emerging insights. *Carcinogenesis*, 26(7), 1170–1181.
- [38] Narayanan, B. A., Narayanan, N. K., Pittman, B., & Reddy, B. S. 2006. Adenocarcinoma of the mouse prostate growth inhibition by celecoxib: downregulation of transcription factors involved in COX-2 inhibition. *The Prostate*, 66(3), 257–265.
- [39] Dennis, L. K., Lynch, C. F., & Torner, J. C. 2002. Epidemiologic association between prostatitis and prostate cancer. *Urology*. 60(1), 78-83.
- [40] Tao, D. L., Tassi Yunga, S., Williams, C. D., & McCarty, O. J. T. 2021. Aspirin and antiplatelet treatments in cancer. *Blood*, 137(23), 3201–3211.
- [41] Maclagan, T. 1876. The Treatment Of Acute Rheumatism By Salicin. *The Lancet*. 29(6), 1321-3.
- [42] Drew, D. A., Cao, Y., & Chan, A. T. 2016. Aspirin and colorectal cancer: the promise of precision chemoprevention. *Nature Reviews. Cancer*, 16(3), 173–186.
- [43] Negi, R. R., Rana, S. V., Gupta, V., Gupta, R., Chadha, V. D., Prasad, K. K., & Dhawan, D. K. 2019. Over-Expression of Cyclooxygenase-2 in Colorectal Cancer Patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 20(6), 1675–1681.
- [44] Wilson, A. J., Fadare, O., Beeghly-Fadiel, A., Son, D.-S., Liu, Q., Zhao, S., Saskowski, J., Uddin, M. J., Daniel, C., Crews, B., Lehmann, B. D., Pietenpol, J. A., Crispens, M. A., Marnett, L. J., & Khabele, D. 2015. Aberrant over-expression of COX-1 intersects multiple pro-tumorigenic pathways in high-grade serous ovarian cancer. *Oncotarget*, 6(25), 21353–21368.
- [45] Sangha, S. 2005. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer prevention. *Postgraduate Medical Journal*. 106(7), 1340-1350.

- [46] Vergne, P., Bertin, P., & Trèves, R. 2000. Aspirine, douleurs et inflammation [Aspirin, pain and inflammation]. *La Revue de medecine interne*, 21, 89–96.
- [47] Elwood, P. C., Gallagher, A. M., Duthie, G. G., Mur, L. A. J., & Morgan, G. 2009. Aspirin, salicylates, and cancer. *The Lancet*, 373(9671), 1301–1309.
- [48] Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D., & Wilson, L. 1993. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(20), 9552–9556.
- [49] Wang, J., Lou, P., Lesniewski, R., & Henkin, J. 2003. Paclitaxel at ultra low concentrations inhibits angiogenesis without affecting cellular microtubule assembly. *Anti-Cancer Drugs*, 14(1), 13–19.
- [50] Pulkkinen, J. O., Elomaa, L., Joensuu, H., Martikainen, P., Servomaa, K., & Grenman, R. 1996. Paclitaxel-induced apoptotic changes followed by time-lapse video microscopy in cell lines established from head and neck cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 122(4), 214–218.
- [51] Stone, A. A., & Chambers, T. C. 2000. Microtubule inhibitors elicit differential effects on MAP kinase (JNK, ERK, and p38) signaling pathways in human KB-3 carcinoma cells. *Experimental Cell Research*, 254(1), 110–119.
- [52] Dupont, N., Leroy, C., Hamaï, A., & Codogno, P. 2017. Long-Lived Protein Degradation During Autophagy. *Methods in Enzymology*. 588, 31-40.
- [53] Yoshida, G. J. 2017. Therapeutic strategies of drug repositioning targeting autophagy to induce cancer cell death: from pathophysiology to treatment. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), 67.
- [54] Chun, Y., & Kim, J. 2018. Autophagy: An Essential Degradation Program for Cellular Homeostasis and Life. *Cells*, 7(12).
- [55] Wang, K., Liu, X., Liu, Q., Ho, I. H., Wei, X., Yin, T., Zhan, Y., Zhang, W., Zhang, W., Chen, B., Gu, J., Tan, Y., Zhang, L., Chan, M. T., Wu, W. K., Du, B., & Xiao, J. 2020. Hederagenin potentiated cisplatin- and paclitaxel-mediated cytotoxicity by impairing autophagy in lung cancer cells. *Cell Death & Disease*, 11(8), 611.
- [56] Lin, J., Chen, S., Lu, C., Lin, J., & Yen, G. 2020. Ursolic acid promotes apoptosis, autophagy, and chemosensitivity in gemcitabine-resistant human pancreatic cancer cells. *Phytotherapy Research*. 34(8), 2053-2066.
- [57] Wang, Y., Xie, W., Humeau, J., Chen, G., Liu, P., Pol, J., Zhang, Z., Kepp, O., & Kroemer, G. 2020. Autophagy induction by thiostrepton improves the efficacy of immunogenic chemotherapy. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(1).
- [58] Erzurumlu, Y., Dogan, H. K., Catakli, D., & Aydogdu, E. 2022. Tarantula cubensis Extract Induces Cell Death in Prostate Cancer by Promoting Autophagic Flux/ER Stress Responses and Decreased Epithelial-Mesenchymal Transition. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 32, 575-582.
- [59] Khing, T. M., Choi, W. S., Kim, D. M., Po, W. W., Thein, W., Shin, C. Y., & Sohn, U. D. 2021. The effect of paclitaxel on apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe in AGS cells. *Scientific Reports*, 11(1), 23490.
- [60] Nath, S., Dancourt, J., Shteyn, V., Puente, G., Fong, W. M., Nag, S., Bewersdorf, J., Yamamoto, A., Antony, B., & Melia, T. J. 2014. Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nature Cell Biology*, 16(5), 415–424.
- [61] Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., & Ohsumi, Y. 2000. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature*, 408(6811).
- [62] Arakawa, S., Honda, S., Yamaguchi, H., & Shimizu, S. 2017. Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 93(6), 378.
- [63] Bjørkøy, G., Lamark, T., Pankiv, S., Øvervatn, A., Brech, A., & Johansen, T. 2009. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods in Enzymology*, 452.
- [64] Schröder, M., & Kaufman, R. J. 2005. The mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Biochemistry*, 74, 739–789.

- [65] Almanza, A., Carlesso, A., Chinthia, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., Luís, A., McCarthy, N., Montibeller, L., More, S., Papaioannou, A., Püschel, F., Sassano, M. L., Skoko, J., Agostinis, P., de Belleruche, J., Eriksson, L. A., Fulda, S., Gorman, A. M., A. M., Healy, S., Kozlov, A., Muñoz-Pinedo, C., Rehm, M., Chevet, E., & Samali, A. 2019. Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *FEBS J*; 286: 241–278.
- [66] Bahar, E., Kim, J.-Y., & Yoon, H. 2019. Chemotherapy Resistance Explained through Endoplasmic Reticulum Stress-Dependent Signaling. *Cancers*, 11(3).
- [67] Rozpedek, W., Pytel, D., Mucha, B., Leszczynska, H., Diehl, J. A., & Majsterek, I. 2016. The Role of the PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Current Molecular Medicine*. 16(6), 533-44.
- [68] Soldani, C., Lazzè, M. C., Bottone, M. G., Tognon, G., Biggiogera, M., Pellicciari, C. E., & Ivana Scovassi, A. 2001. Poly(ADP-ribose) Polymerase Cleavage during Apoptosis: When and Where? *Experimental Cell Research*. 296(2), 193-201.
- [69] Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., & Lazebnik, Y. A. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376(6535).
- [70] Weaver, A. N., & Yang, E. S. 2013. Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 3, 290.
- [71] Oliver, F. J., de la Rubia, G., Rolli, V., Ruiz-Ruiz, M. C., de Murcia, G., & Murcia, J. M. 1998. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(50).