T.C.
İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA BORİK ASİTİN APOPTOZ YOLAĞINDAKİ GENLERİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

GAYE NUR VİDİNLİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞRETİM ÜYESİ MURADİYE ACAR

İSTANBUL-2021

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum "A549 ve BEAS-2B Hücre Hatlarında Borik Asitin Apoptoz Yolağındaki Genlerin Ekspresyon Düzeylerine Etkisinin İncelenmesi" adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Gaye Nur Vidinli

ÖZET

A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARINDA BORİK ASİTİN APOPTOZ YOLAĞINDAKİ GENLERİN EKSPRESYON DÜZEYLERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Gaye Nur Vidinli
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Muradiye Acar

2021

Akciğer kanseri, dünyadaki en yaygın kanser türü olmakla beraber tüm kanser ölümlerinin bir numaralı nedeni olmaya devam etmektedir. Apoptoz, bir dizi sinyal iletim kaskadları ve hücresel proteinler tarafından düzenlenen sıkı bir şekilde programlanmış bir hücre ölümü türüdür. Apoptoz hücre popülasyonlarının homeostazını devam ettirmek için önemli bir mekanizmadır ve düzensizliği kansere yol açabilir. Apoptoz, kansere karşı en güçlü savunma mekanizmalarından biridir. Çünkü apoptoz bu süreçte zararlı olabilecek mutasyona uğramış hücreleri ortadan kaldırmaktadır. Bor elementi tıp alanında (örneğin ilaçların üretimi ve kanser tedavisi gibi) sterilizasyon uygulamalarında ve endüstriyel alanlarda (cam, seramik, metal, kozmetik gibi) kullanılmaktadır. Bor bileşikleri, neredeyse tamamen gastrointestinal ve solunum sistemleri yoluyla vücuda alınmaktadır. Yapılan deneysel çalışmalar borik asitin antikanserojen etkilerinin olabileceğini göstermektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada borik asitin akciğer kanserindeki moleküler etkileri araştırılmıştır. Borik asitin, apoptoz yolağında görev alan genlerin ekspresyon seviyelerini nasıl etkilediği ve hücre proliferasyonu ve hücre canlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Çalışmamız kapsamında, xCELLigence sistemi kullanılarak, hücre titrasyon analizleri, hücre proliferasyonundaki farklılıklar ve borik asit muamelesi sonrası hücrenin sitotoksik aktivitesi belirlendi. İlk olarak hücre titrasyon analizi yapıldı ve borik asit muamelesi için doğru hücre sayısı belirlendi. Daha sonra belirlemiş olduğumuz hücre sayılarına göre ekim yapıldı ve farklı konsantrasyonlarda borik asit ile muamele edildi. xCELLigence sistemiyle 24. ve 48. saatteki borik asitin sitotoksik aktivitesi ve proliferasyon etkisi değerlendirilerek inhibitör konsantrasyonu (IC_{50}) belirlendi. IC_{50} değerine göre belirlemiş olduğumuz borik asit konsantrasyonları ile muamele edilmiş hücrelerden RNA izolasyonu ve sonrasında cDNA sentezi gerçekleştirildi. Apoptotik yolakta rol alan seçmiş olduğumuz genlerin ekspresyon seviyeleri Real Time PCR ile belirlendi.

Araştırmanın sonuçlarına göre, A549 akciğer kanseri hücre hattındaki borik asitin farklı konsantrasyonları, apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yolağında etkili olan genler üzerindeki ekspresyon seviyelerinde değişikliğe neden olduğu gözlendi. Elde ettiğimiz sonuçlardan yola çıkarak borik asitin akciğer kanserindeki apoptoz mekanizmasıyla ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, Borik asit, Hücre hattı, Apoptoz

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF BORIC ACID ON THE EXPRESSION LEVELS OF GENES IN THE APOPTOSIS PATHWAY IN A549 AND BEAS-2B CELL LINES

Vidinli, Gaye Nur
Department of Medical Biology and Genetic
Advisor: Acar, Muradiye, Asst. Prof.

2021

Lung cancer is the most common type of cancer in the world and remains the number one cause of all cancer deaths. Apoptosis is a tightly programmed type of cell death regulated by a series of signal transduction cascades and cellular proteins. Apoptosis is an important mechanism for maintaining homeostasis of cell populations, and its dysregulation can lead to cancer. Apoptosis is one of the most powerful defense mechanisms against cancer. Apoptosis eliminates potentially harmful mutated cells in this process. Boron element is used in medicine (in the production of various drugs, in vitamin supplements, in areas such as cancer treatment), in sterilization and cleaning, in various industrial areas (such as glass, ceramics, metal, cosmetics). Boron compounds are taken into the body almost entirely through the gastrointestinal and respiratory systems. Experimental studies show that boric acid may have anticarcinogenic effects. In our study, the molecular effects of boric acid on lung cancer were investigated. How boric acid affects the expression levels of genes involved in the apoptosis pathway and its effect on cell proliferation and cell viability were investigated.

In our study, cell titration analysis, differences in cell proliferation and cytotoxic activity of the cell after boric acid treatment were determined using the xCELLigence system. First, cell titration analysis was performed and the correct cell number was determined for boric acid treatment. Then, cell culture was done according to the cell numbers we determined and treated with different concentrations of boric acid. The inhibitory concentration (IC_{50}) was determined by evaluating the cytotoxic activity and proliferation effect of boric acid at the 24th and 48th hours with the xCELLigence system. RNA isolation from cells treated with boric acid concentrations determined according to IC_{50} value and then cDNA synthesis was performed. Expression levels of the selected genes involved in the apoptotic pathway were determined by Real Time PCR.

According to the results of the study, was observed that different concentrations of boric acid in the A549 lung cancer cell line caused a change in the expression levels on the genes that are effective in the intrinsic and extrinsic pathway of apoptosis. Based on our result, it was concluded that boric acid may be related to the apoptosis mechanism in lung cancer.

Keywords: Lung cancer, Boric acid, Cell line, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince tez konusunun belirlenmesinde ve deney aşamalarının yürütülmesinde, teorik olarak alt yapı oluşturmamı sağlayan ve bütün tecrübesiyle bana yön gösteren değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Muradiye ACAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda her türlü imkân ve koşulları sağlayan Sayın Rektörümüz Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e, yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e ve tüm hocalarıma aynı zamanda İstinye Üniversitesi Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi bünyesinde yürütülen deney aşamalarında desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Zeynep OCAK'a teşekkürlerimi sunarım.

İstinye Üniversitesi Moleküler Kanser Araştırma Merkezi (İSÜMKAM) bünyesinde yürütülen hücre kültürü çalışmalarımdaki yardımları ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya ve hücre kültürü çalışmalarımın planlanmasında ve yürütülmesindeki büyük katkıları ve göstermiş oldukları ilgi ve alakadan dolayı Öğretim Görevlisi Melda SARIMAN'a ve Öğretim Görevlisi Merve ERKISA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda beraber çalıştığımız ve bu süreçteki zorluklarda benden desteğini esirgemeyen arkadaşlarım Seren YİRMİBEŞ ve Hakan YILMAZOĞULLARI'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımcı olan İstinye Üniversitesi Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi ve Moleküler Kanser Araştırma Merkezi çalışanlarına,

Yıllarca tüm eğitim hayatımda yanımda olan ve sürekli olarak desteklerini yanımda hissettiğim aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

DIŞ KAPAK
İÇ KAPAK
KABUL ONAY
ETİK BEYANI
ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **vii**
TABLO LİSTESİ ..... **ix**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **x**
GİRİŞ **1**
1. GENEL BİLGİLER **2**
1.1. KANSER 2
1.2. AKCİĞER KANSERİ 3
1.2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi 3
1.2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi 4
1.2.2.1. Sigara ve tütün ürünleri kullanımı 5
1.2.2.2. Mesleki Maruz Kalma 5
1.2.2.3. Beslenme 6
1.2.2.4. Hava Kirliliği 6
1.2.2.5. Genetik Faktörler 7
1.2.3.Akciğer Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması ve Evrelenmesi 7
1.2.3.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) 8
1.2.3.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) 9
1.2.3.2.1. Adenokarsinom 9
1.2.3.2.2. Skuamöz Hücreli Karsinoma 9
1.2.3.2.3. Büyük Hücreli Karsinoma 10
1.2.4. Akciğer Kanseri Evrelemesi 10
1.2.5. Akciğer Kanserinde Genetik Değişiklikler 14
1.3. BOR ve BORİK ASİT 18

1.4. APOPTOZ 23
1.4.1. Apoptoz ve Nekroz Farkı 23
1.4.2. Apoptoz Mekanizmaları 25
1.4.2.1. İntrinsik (İçsel) Apoptoz Yolağı 26
1.4.2.2. Ekstrinsik (Dışsal) Apoptoz Yolağı 28
1.4.2.3. Perforin/Granzim Yolağı 30
1.4.3. Kaspazlar 31
1.4.4. Apoptoz ve *p53* Geni 34
2. MATERYAL VE METOD 36
2.1. KULLANILAN HÜCRE HATLARI ve ÖZELLIKLERI 36
2.2. MATERYAL 37
2.2.1. Kimyasal Maddeler 37
2.2.2. Sarf Malzemeler 38
2.2.3. Cihazlar 38
2.3. METOD 39
2.3.1. Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu 39
2.3.2. DNA İzolasyonu 39
2.3.3. DNA Konsantrasyon ve Saflık Ölçümü 40
2.3.4. DNA Amplifikasyonu ve Elektroforez 41
2.3.5. Besiyerinin Hazırlanması 43
2.3.6. Stoktan Hücre Ekimi 43
2.3.7. Besiyeri Değişimi ve Pasajlama 43
2.3.8. Hücrelerin Stoğa Alınması 44
2.3.9. Hücre Hatlarında Mikoplazma Kontaminasyon Kontrolü 45
2.3.10. Hücre Sayımı 46
2.3.11. Borik Asit Çözeltisinin Hazırlanması 47
2.3.12. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi 47
2.3.13. Hücre Titrasyon Analizleri 48
2.3.14. Borik Asit Uygulanması ve Sitotoksisite Testi 49
2.3.15. mRNA İfadesinin Belirlenmesi 50
2.3.15.1. Trizol ile Hücreden RNA İzolasyonu 50
2.3.15.2. RNA Konsantrasyon ve Saflık Ölçümü 51
2.3.15.3. cDNA Sentezi 52
2.3.15.4. *Beta Aktin*, *BAD*, *BAX*, *BCL2*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *CYCS*, *FADD* Primerlerinin Dizaynı ve Hazırlanması 53

2.3.15.5. Gradient PZR ile Primerlerin Bağlanma Sıcaklıklarının Belirlenmesi.....54
2.3.15.6. Agaroz Jel Elektroforezi.....55
2.3.15.6.1. Agaroz Jel Hazırlanması.....56
2.3.15.6.2. PZR Ürünlerinin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi.....56
2.3.15.6.3. Jellerin UV Işık Altında İncelenmesi.....56
2.3.15.7. Kantitatif Real Time RT-PZR.....57
3. BULGULAR.....58
3.1. Hücre Karakterizasyon Sonuçları.....58
3.2. Mikoplazma Kontaminasyonu PZR Sonuçları.....60
3.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (xCELLigence) Hücre titrasyon deneyi sonuçları.....60
3.4. Borik Asitin A549 ve BEAS-2B Hücre Hattı Proliferayonu Üzerinde Etkisinin Sonucu63
3.5. IC_{50} Değerinin Belirlenmesi.....65
3.6. RNA İzolasyon Sonuçları.....66
3.7. Gradiyent PZR Bulguları.....66
3.8. Kantitatif Real Time RT-PZR Bulguları.....68
4. TARTIŞMA VE SONUÇ.....72
KAYNAKLAR.....78
İNTİHAL FORMU.....85
ÖZGEÇMİŞ.....86

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün akciğer kanseri ile ilgili her yaştan ve cinsiyetten genel dağılım haritası 3
Şekil 1.2. Akciğer kanseri ölümlerin her iki cinsiyeti de içeren yaş grupları ve bölgelere göre yüzde dağılımı 4
Şekil 1.3. Akciğer kanserinin histolojik sınıflandırılması 8
Şekil 1.4. Borik asitin kimyasal yapısı 18
Şekil 1.5. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar 24
Şekil 1.6. Apoptozdaki beş ana yolağa genel bakış 25
Şekil 1.7. İntrinsik apoptoz yolağı ve BCL-2 ailesi proteinlerinin etki mekanizması 27
Şekil 1.8. Apoptozun içsel ve dışsal yolakları 29
Şekil 1.9. Başlıca apoptotik yolaklar 31
Şekil 1.10. Kaspaz aktivasyon yolakları 32
Şekil 1.11. İnsan kaspazlarının alan yapısı 33
Şekil 1.12. *p53* ve apoptotik yolaklar 35
Şekil 2.1. A549 hücrelerinin 10x mikroskop görüntüleri 36
Şekil 2.2. BEAS-2B hücrelerinin 10x mikroskop görüntüleri 36
Şekil 2.3. xCELLligence RTCA DP cihazı ve 16 kuyucuklu E-plaka 48
Şekil 3.1. A549 hücre hattının elektroferogram görüntüsü 58
Şekil 3.2. BEAS-2B hücre hattının elektroferogram görüntüsü 58
Şekil 3.3. Mikoplazma PZR reaksiyonuna ait agaroz jel elektroforez görüntüsü 60
Şekil 3.4. BEAS-2B hücre hattının titrasyon deneyleri sonucu cell index ve zamana bağlı görüntüsü 60
Şekil 3.5. BEAS-2B hücre hattı 24. saatteki 4x mikroskop görüntüleri 61
Şekil 3.6. A549 hücre hattının titrasyon deneyleri sonucu cell index ve zamana bağlı görüntüsü 61
Şekil 3.7. A549 hücre hattı 24.saatteki 4x mikroskop görüntüleri 62
Şekil 3.8. xCELLigence sisteminde borik asit'in ışıma verip vermediğinin kontrolü 62
Şekil 3.9. BEAS-2B hücre hattı için yapılan proliferasyon deney grafiği 63
Şekil 3.10. BEAS-2B hücre hattında borik asit muamelesinden sonra 24. saatteki 4x mikroskop görüntüleri 64
Şekil 3.11. A549 hücre hattı için yapılan proliferasyon deney grafiği 64
Şekil 3.12. A549 hücre hattında borik asit muamelesinden sonra 48. saatteki 4x mikroskop görüntüleri 65

Şekil 3.13. xCELLigence cihazı ile IC_{50} değerinin hesaplanması 66
Şekil 3.14. *ACTB, BAX, BCL2* genlerine ait jel görüntüleri 67
Şekil 3.15. *BAD, FADD, CYCS* genlerine ait jel görüntüleri 67
Şekil 3.16. *CASP3, CASP8, CASP9* genlerine ait jel görüntüleri 67
Şekil 3.17. A549 hücre hattında 12 saatlik borik asit muamelesi sonucu *BAD, BAX* ve *BCL2* genlerinin ekspresyon değişimlerinin grafiksel gösterimi 68
Şekil 3.18. A549 hücre hattında 12 saatlik borik asit muamelesi sonucu F*ADD* ve *CASP8* genlerinin ekspresyon değişimlerinin grafiksel gösterimi 69
Şekil 3.19. A549 hücre hattında 12 saatlik borik asit muamelesi sonucu *CASP3, CASP9* ve *CYCS* genlerinin ekspresyon değişimlerinin grafiksel gösterimi 69
Şekil 3.20. A549 hücre hattında 24 saatlik borik asit muamelesi sonucu *BAD, BAX* ve *BCL2* genlerinin ekspresyon değişimlerinin grafiksel gösterimi 70
Şekil 3.21. A549 hücre hattında 24 saatlik borik asit muamelesi sonucu *FADD* ve *CASP8* genlerinin ekspresyon değişimlerinin grafiksel gösterimi 70
Şekil 3.22. A549 hücre hattında 24 saatlik borik asit muamelesi sonucu *CASP3, CASP9* ve *CYCS* genlerinin ekspresyon değişimlerinin grafiksel gösterimi 71

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. Primer tümör evrelemesi 11
Tablo 1.2. Bölgesel lenf nodu evrelemesi 12
Tablo 1.3. Uzak metastaz evrelemesi 12
Tablo 1.4. TNM sınıflandırmasının sekizinci versiyonuna göre evre gruplandırması 13
Tablo 2.1. PZR reaksiyon karışımı 41
Tablo 2.2. PZR programının aşamaları 41
Tablo 2.3. PZR ürünlerinin kapiller elektroforeze hazırlanması 42
Tablo 2.4. PZR reaksiyon karışımı 45
Tablo 2.5. PZR amplifikasyon aşamaları 46
Tablo 2.6. Borik asit çözeltisinin hazırlanması 47
Tablo 2.7. cDNA sentezinde kullanılan reaktifler 52
Tablo 2.8. Gradient PZR için kullanılan bileşikler 55
Tablo 2.9. Gradiyent PZR aşamaları 55
Tablo 2.10. Real Time PZR reaksiyon karışımı 57
Tablo 2.11. Real Time PZR aşamaları 57
Tablo 3.1. A549 hücre hattı STR profili 59
Tablo 3.2. BEAS-2B hücre hattı STR profili 59
Tablo 3.3. İzole edilen RNA konsantrasyonları ve OD değerleri 60

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
AIF	**:** Apoptoz Tetikleyici Faktör
Apaf-1	**:** Apoptotik Peptidaz Aktive edici Faktör – 1
B	**:** Bor
($B(OH)_3$)	**:** Borik asit
BCL-2	**:** B hücresi lenfoma-2
Bç	**:** Baz çifti
BH	**:** BCL-2 homoloji
CARD	**:** Kaspaz alım alanı
CF	**:** Kalsiyum fruktoborat
DD	**:** Ölüm Domaini
DED	**:** Ölüm Efektör Bölgesi
DIABLO	**:** Düşük pI direkt Apoptozis İnhibitör Bağlayıcı Protein
DISC	**:** Ölüme Neden olan Sinyal Kompleksi
DMSO	**:** Dimetilsülfoksit
DR	**:** Ölüm Reseptörü
DSÖ	**:** Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	**:** Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FGFR	**:** Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü
FADD	**:** FAS ilişkili ölüm domaini
FASL	**:** FAS Ligandı
GzmA	**:** Granzim A
GzmB	**:** Granzim B
HDAC	**:** Histon Deasetilaz
IAP	**:** Apoptoz İnhibitörleri
IC_{50}	**:** Hücrelerin %50'sini azaltan inhibitör konsantrasyon
IGF-1	**:** İnsülin benzeri Büyüme Faktörü
IGFBP-3	**:** İnsülin benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Protein 3

KHAK : Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

KDHAK : Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri

KRAS : Kirstenrat sarkoma viralonkogen homoloğu

LCNEC : Büyük Hücreli Nöroendokrin Karsinom

MOMP : Mitochondrial Outer MembranePermeabilization

NNK : 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-bütanon

OMM : Dış MitokondriyalMembran

PI3K : Fosfatidilinositol 3-kinaz

PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

STR : Kısa Bitişik Tekrar Dizileri

TNF : Tümör Nekroz Faktörü

TK : Tirozin Kinaz

TKI : Tirozin Kinaz İnhibitörleri

TP53 : Tümör Süpressör Geni

cm^2 : Santimetre kare

kDa : Kilodalton

M : Molar

mM : mili Molar

mg : miligram

ml : mililitre

mm : milimetre

nm : nanometre

pmol : pikomol

ppm : milyonda bir partikül sayısı

µM : mikro molar

µl : mikrolitre

GİRİŞ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi, tümör oluşumu ve doku işlev kaybı ile karakterizeedilen ölümcül bir hastalıktır. Birincil tümörler genetik değişikliklerden ve çevresel etmenlerden kaynaklanabilmektedirler. Bu değişiklikler, onkogenler ve tümör süpressör genlerdeki genetik hasarın neden olduğu proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi temel hücre fonksiyonlarının düzenlenmesindeki anormalliklerden kaynaklanmaktadır. Tümörler içinde, kanser hücreleri genellikle normal kontrol mekanizmalarından kaçarak göç etme yeteneği kazanırlar ve böylece çevre doku ve organları istila ederek metastaz oluşumuna yol açmaktadırlar (Nikitovic, Kouvidi ve ark. 2013).

Akciğer kanseri, dünyadaki en yaygın kanser türü olmakla beraber tüm kanser ölümlerinin bir numaralı nedeni olmaya devam etmektedir. Akciğer kanseri, erkeklerde kansere bağlı ölümlerin ilk sırasında yer alırken kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Siegel, Miller ve ark. 2020). Akciğer kanserinin gelişiminde genetik, epigenetik ve çevresel faktörlere sahip onkogenlerle tümör supresör genlerin düzensiz etkileşimlerinin neden olduğu kanserle ilişkili sinyal yolaklarının aktivasyonuna yol açan çoklu kanserojenik aşamalar gözlenir (Diniz, Ünlü ve ark. 2017).

Apoptoz, bir dizi sinyal iletim kaskadları ve hücresel proteinler tarafından düzenlenen sıkı bir şekilde programlanmış bir hücre ölümü türüdür (Abotaleb, Samuel ve ark. 2018). Apoptoz, kansere karşı en güçlü savunma mekanizmalarından biridir. Çünkü bu süreçte zararlı olabilecek mutasyona uğramış hücreleri ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle üzerinde en çok durulan muhtemel etki mekanizmalarından biri, kanser hücrelerinde apoptozun uyarılmasıdır (Scorei, Ciubar ve ark. 2008).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalardaki verilere göre bor ve bileşiklerinin antikanserojen etkilerinin olabileceği gösterilmiştir (Korkmaz, Uzgoren ve ark. 2007). Meme kanseri hücre hatlarının borik asit ile muamele edilmesiyle yapılan bir çalışmada bu hücrelerde borik asitin, apoptoz mekanizmasını uyararak kanser hücrelerinin proliferasyonunu doz bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir (Scorei, Ciubar ve ark. 2008).

Bu çalışmada; borik asitin A549 akciğer kanseri hücre hattında ve BEAS-2B sağlıklı bronşial epitel hücre hattındaki hücre proliferasyonu, hücre canlılığı ve apoptoz mekanizmasında görevli olan genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. KANSER

Kanser kelimesi Latince yengeç olarak ifade edilen ‘’carcinos’’ kelimesinden ortaya çıkmıştır. Tümör kelimesi ilk defa Hipokrat tarafından M.Ö III. yüzyılda tümörün etrafındaki kırmızı ve şişmiş damarları olan bir yengecin bacaklarına benzetildiği için kullanılmıştır. Yunan doktor Galen ise şişme anlamına gelen “oncos” terimini kullanmıştır (Baykara 2016).

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi, tümör oluşumu ve doku işlev kaybı ile karakterize edilen ölümcül bir hastalıktır. Birincil tümörler genetik değişikliklerden ve çevresel etmenlerden kaynaklanabilmektedir. Bu değişiklikler, onkogenler ve tümör süpressör genlerdeki genetik hasarın neden olduğu proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi temel hücre fonksiyonlarının düzenlenmesindeki anormalliklerden kaynaklanmaktadır. Tümörler içinde, kanser hücreleri genellikle normal kontrol mekanizmalarından kaçarak göç etme yeteneği kazanırlar ve böylece çevre doku ve organları istila ederek metastaz oluşumuna yol açmaktadır (Nikitovic, Kouvidi ve ark. 2013). İnsan vücudunu etkilediği bilinen 100’den fazla kanser türü bulunmaktadır (Hanahan ve Weinberg 2000).

Kanserin oluşumunda büyük role sahip olan onkogenler, tümör süpressör genler ve DNA tamir genleri yer almaktadır. Hücre büyümesini ve farklılaşmasını sağlayan normal genler olan proto-onkogenler; gen ifadesindeki artış ve azalış, mutasyonlar, duplikasyon, insersiyon, delesyonlar ve kromozomal düzenlemeler sonucunda değişime uğrayarak aktif hale geçer ve onkogene dönüşürler. Tümör süpressör genler hücrenin bölünmesini ve çoğalmasını kontrol etmektedir. Hasar durumunda ise DNA tamirini başlatmakta, tamir mekanizmasınında başarısız olması durumunda ise apoptozu tetiklemektedir. Tümör süpressör genlerden en çok bilinen ve çalışılanı TP53 genidir. DNA tamir genleri ise DNA’yı tamir etmek üzere gerekli olan proteinleri o bölgeye çekerek genin işlevinin yeniden kazanılmasını sağlamaktadır. Diğer önemli görevi ise tamir mekanizmasının başarısız olması halinde hücrenin apoptoz veya nekroz yolakları ile imha edilmesini sağlamaktır. DNA tamir genlerindeki işlev kayıpları hücrenin kanserleşmesine neden olmaktadır (Baykara 2016).

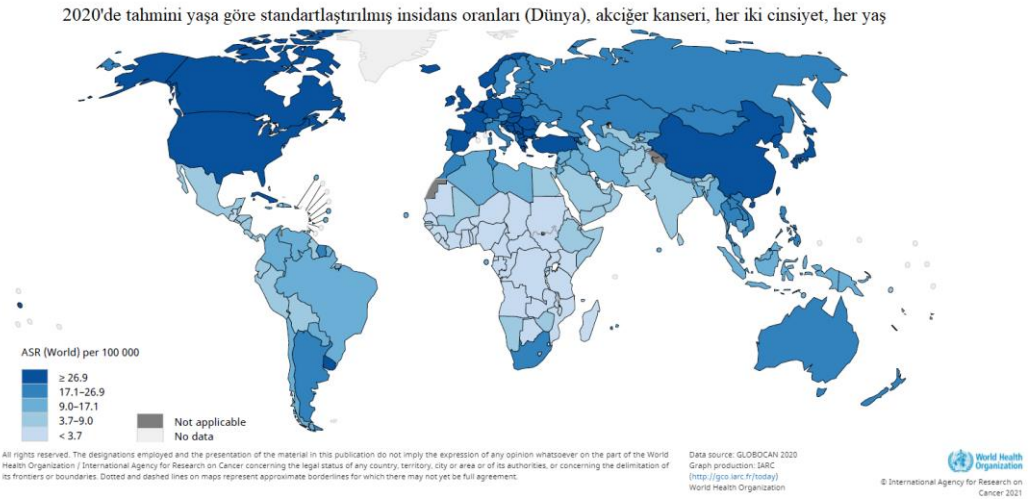
1.2. AKCİĞER KANSERİ

Akciğer kanseri, dünyadaki en yaygın kanser türü olmakla beraber tüm kanser ölümlerinin bir numaralı nedeni olmaya devam etmektedir. Akciğer kanseri, erkeklerde kansere bağlı ölümlerin ilk sırasında yer alırken kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Siegel, Miller ve ark. 2020).

Akciğer kanseri, farklı hastalık paternleri ve tedavi yöntemleri nedeniyle tarihsel olarak küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere 2 ana grupta sınıflandırılan heterojen bir hastalıktır. KHDAK ayrıca skuamöz hücreli karsinoma, adenokarsinom ve büyük hücreli karsinoma olarak sınıflandırılmaktadır (Wood, Pernemalm ve ark. 2015).

1.2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

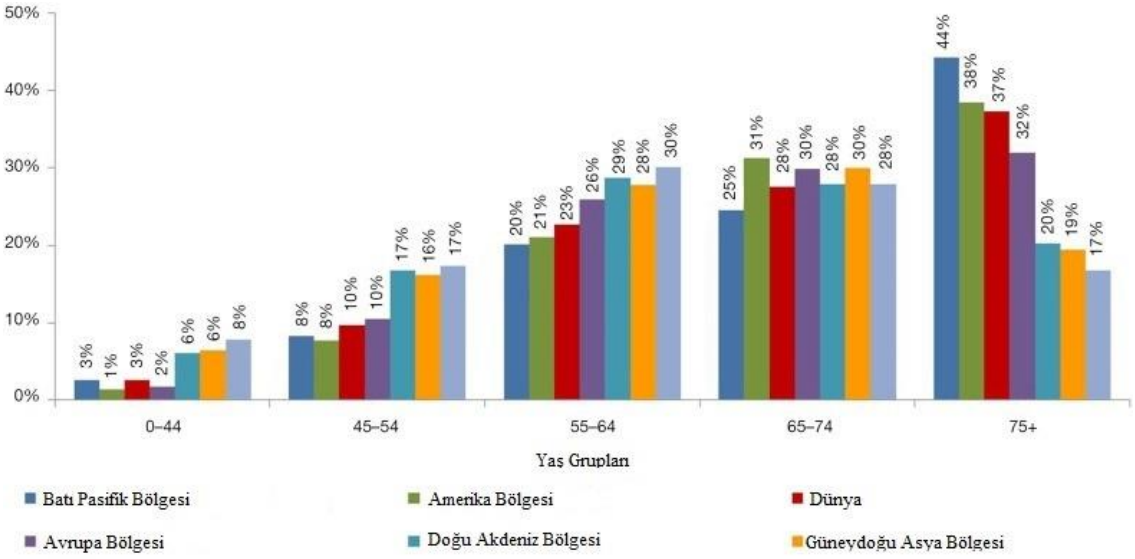
Günümüzde dünyada en sık görülmekte olan kanser türü akciğer kanseridir ve tüm yeni kanser vakalarının %12,8'ini oluşturmaktadır. Her yıl sıklığı %3 oranında artış göstermektedir (Bingöl 2014). Akciğer kanseri kötü prognoza sahiptir ve bu da insidansın mortalite ile çok yakın olduğu anlamına gelmektedir (Didkowska, Wojciechowska ve ark. 2016). Dünyada her yıl yaklaşık olarak 1,8 milyon kişiye akciğer kanseri teşhisi konulmakta ve akciğer kanserleri 1,6 milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır. Akciğer kanserli popülasyonlarda 5 yıllık sağkalım oranları, evre ve bölgesel farklılıklara göre %4-17 arasında değişmektedir (Hirsch, Scagliotti ve ark. 2017). Tüm kanser ölümlerinin neredeyse dörtte birini akciğer kanseri oluşturmaktadır (Siegel, Miller ve ark. 2020).



Şekil 1.1. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün akciğer kanseri ile ilgili her yaştan ve cinsiyetten genel dağılım haritası (GLOBOCAN 2020)

Akciğer kanseri insidansı oranı, erkeklerde kadınlardan daha yüksektir. 1980'lerden beri erkekler için bu oran düşüş göstermektedir. Ancak kadınlarda akciğer kanseri insidansı oranları 1965'te artmaya başladı ve 2000'den bu yana ise son birkaç yılda yaklaşık olarak %2'lik hafif bir düşüş göstermektedir (de Groot and Munden 2012).

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı Kanser Daire Başkanlığı'nın 2015 yılı verilerine göre akciğer kanserinin erkeklerde yaşa göre standardize edilmiş insidans hızı 100.000'de 52,5 iken kadınlarda ise 100.000'de 9 olarak bildirilmektedir (T.C. Sağlık Bakanlığı and İstatistikleri 2015).



Şekil 1.2. Akciğer kanseri ölümlerin her iki cinsiyeti de içeren yaş grupları ve bölgelere göre yüzde dağılımı (Didkowska, Wojciechowska ve ark. 2016)

1.2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi

Sigara ve tütün ürünleri akciğer kanserinin etiyolojisinden sorumlu en önemli faktörlerden biridir (Malhotra, Malvezzi ve ark. 2016). Globocan 2018 verilerine göre akciğer kanserinin %80'i sigara kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Bray, Ferlay ve ark. 2018). Mesleki maruz kalma, beslenme, hava kirliliği ve genetik faktörler gibi diğer faktörlerde akciğer kanserinin etiyolojisinde önemli rol oynamaktadır.

1.2.2.1. Sigara ve tütün ürünleri kullanımı

Sigara ve tütün ürünlerinin kullanımı en önemli ve en yaygın akciğer kanseri risk faktörüdür. Sigara dumanı, çoklu genotoksik akciğer kanserojenlerini içeren kimyasal bir karışımdır. Sigara dumanında, 73 bileşik arasında 20'den fazla akciğer kanserojeni bulunmaktadır. Polisiklik aromatikhidrokarbonlar (PAH), NNK (4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-bütanon), 1,3-bütadien ve etilen oksit gibi uçucular, kadmiyum gibi metaller ve radyoaktif bileşikler bu bileşikler arasında yer almaktadır (Hecht 2012).

Sigara içen kişilerdeki akciğer kanseri riski sigara içmeyen kişilere oranla 20-50 kat daha fazladır. Sigara tüketiminin süresi artmış akciğer kanseri riskinin en güçlü belirleyicisidir (Malhotra, Malvezzi ve ark. 2016). Tütün kullanımı her yıl dünyada 5 milyondan fazla insanın yani her 10 kişiden 1'inin ölümüne neden olmaya devam etmektedir (WHO 2008). Sigara içme prevalansı kadınlarda erkeklerden daha düşük olmakla beraber, bu değer kadınlarda %18,3 iken erkeklerde %23,1 olduğu bilinmektedir. Fakat bu fark giderek azalmaktadır. Yine sigara içme prevalansının yaşa göre yüzde değerleri 18-24 yaş %21,4, 25-44 yaş %23,7, 45-64 yaş %22,6 ve 65 yaş ve üzeri için %9,3 olarak bildirilmiştir. Akciğer kanserli hastaların %31,1'i 65-74 yaş arasında, %29'u 75-84 yaş arasında ve %8,3'ü 85 yaş ve üzerindedir. Yaşlı popülasyondaki sigara içme prevalansı ile daha yüksek kanser oranı arasındaki bu farkın muhtemelen yaşlı popülasyondaki yoğun sigara içme öyküsünün neden olabileceği düşünülmektedir (Dela Cruz, Tanoue ve ark. 2011).

Pasif içicilik, maruz kalma derecesine bağlı olarak akciğer kanseri riskinde artışa neden olabilmektedir (Dela Cruz, Tanoue ve ark. 2011). Yapılan EPIC (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) çalışmasında hiç sigara kullanmamış ve sigarayı bırakmış olan kişilerde akciğer kanseri riskinde pasif sigara içiminin %16-24 olduğu bildirilmiştir (Vineis, Hoek ve ark. 2007). Sigara kullanan annelerin bebeklerinden alınan idrar örneklerinde tütüne özgü kanserojen bir madde olan 4-(metilnitrozamino)-1-(3-piridil)-1-bütanon (NNK) seviyelerinin yüksek saptanması üzerine, pasif olarakta olsa sigara dumanına maruz kalmanın kanser riskini artırdığı düşüncesi ortaya çıkmıştır (Lackmann, Salzberger ve ark. 1999).

1.2.2.2. Mesleki Maruz Kalma

Mesleki maruz kalma akciğer kanseri etiyolojisinde önemli bir rol oynamaktadır. Çeşitli endüstrilerde ve mesleklerde çalışan işçiler arasında akciğer kanseri riski artmaktadır. En

önemli kanıtlanmış mesleki akciğer kanserojenleri arasında asbest, silika, radon, ağır metaller ve polisiklik aromatik hidrokarbonlar bulunmaktadır (Malhotra, Malvezzi ve ark. 2016).

Mesleki karsinojenlere maruz kalmanın, tarihsel olarak en yaygın sebebinin asbest maruziyeti olduğu akciğer kanserlerinin %5-10'unu oluşturduğu düşünülmektedir. Avrupa ve Kanadada yapılan bir çalışmada, asbeste sürekli maruz kalmanın erkeklerde %24, kadınlarda %12 artmış akciğer kanseri risk ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Schabath ve Cote 2019).

Polisiklik aromatik hidrokarbonlar, organik maddelerin yanmasıyla oluşan önemli bir kimyasal gruptur. Alüminyum üretimi, kömür gazlaştırma, demir ve çelik yapımı, katran damıtma, çatı kaplama ve baca süpürme gibi polisiklik aromatik hidrokarbonlara maruz kalmaya neden olan çeşitli endüstrilerde ve mesleklerde akciğer kanseri riskinde artış olduğu bildirilmiştir (Malhotra, Malvezzi ve ark. 2016).

1.2.2.3. Beslenme

Diyetin tüm kanserlerin yaklaşık %30'undan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Yapılan çoğu çalışmada, diyet faktörlerinin akciğer kanseri riski ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bir çalışmada, A, C ve E vitaminleri gibi düşük serum antioksidan konsantrasyonları, akciğer kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir. A vitamininin hem hayvansal (retinol) hem de bitkisel (karotenoid) kaynağı bulunmaktadır. Fakat sadece bitkisel kaynaklı bileşenin akciğer kanserinde koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir. Bir karotenoid olan β-karoten'in akciğer kanserine karşı yüksek bir koruyucu etkiye sahip olduğuve aynı zamanda C ve E vitaminlerinin (α-tokoferol) de az bir miktarda da olsa koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir (Dela Cruz, Tanoue ve ark. 2011). Yapılan başka bir çalışmada ise özellikle kızarmış veya iyi pişmiş kırmızı et tüketimi, akciğer kanseri riski ile ilişkilendirilmiştir. Bunun nedeninin ise pişirme sırasında oluşan nitrozaminden kaynaklanabileceği düşünülmüştür (Sinha, Kulldorff ve ark. 1998).

1.2.2.4. Hava Kirliliği

Hava kirliliği, küreselleşme ve sanayileşme hızı göz önünde bulundurulduğunda dünyada büyük bir sorun haline gelmiştir. Uzun zamanlardan beri hava kirliliğininin akciğer kanseri riskini artırdığı düşünülmektedir. Spesifik kirleticileri belirlemek için kullanılan analitik yöntemlerdeki gelişmeler, araştırmacıların havada bulunan bu türpartiküllerin etkilerini incelemelerine fayda sağlamıştır. Yapılan kentsel ve kırsal karşılaştırmaları içeren ilk

çalışmalarda, "kentsel faktörün" akciğer kanseri ölümlerinde %10-40'lık bir artışla ilişkili olduğunu gösterilmiştir (Dela Cruz, Tanoue ve ark. 2011).

Dizel egzoz, hava kirliliğinin önemli bir bileşenidir. Özellikle kamyon taşımacılığı endüstrisinde çalışan bireylerdeki mesleki olarak dizel egzozuna maruz kalmanın, akciğer kanseri görülme riskini yaklaşık %30-50 oranında arttırdığı bildirilmiştir (Dela Cruz, Tanoue ve ark. 2011).

1.2.2.5. Genetik Faktörler

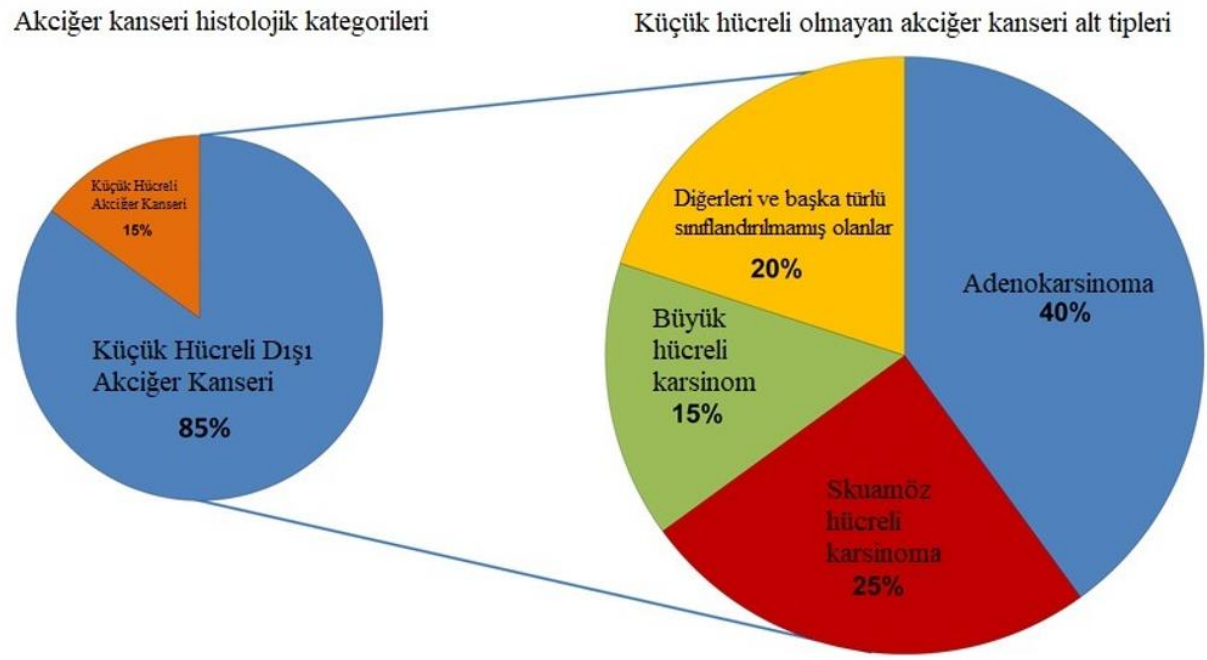
Aile öyküsünde akciğer kanseri bulunan kişilerde, erken başlangıçlı akciğer kanseri için yüksek risk bildiren çalışmalara dayalıolarak genetik risk faktörlerinin de akciğer kanserinde önemli etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Malhotra, Malvezzi ve ark. 2016). Cassidy ve arkadaşları, özellikle ailesinde erken başlangıçlı akciğer kanseri öyküsü olan (<60 yaş) kişilerde akciğer kanseri riskinin önemli ölçüde arttığını bildirmiştir. Bailey-Wilson ve arkadaşları, yüksek riskli pedigrilerin bağlantı analizini kullanarak, ailesel akciğer kanserinin, kromozom 6q23-25 bölgesiyle ilk ilişkisini bildirmişlerdir. Bu kalıtımın etkisinin üzerine sigara içme öyküsünün eklenmesi, akciğer kanseri riskini 3 kat arttırdığını göstermiştir (Dela Cruz, Tanoue ve ark. 2011). Aynı zamanda akciğer kanseri riski, tümör süpresör geni olan P53'teki germ hattı mutasyonu ile karakterize olan Li-Fraumeni sendromu çerçevesinde de artmaktadır (Malhotra, Malvezzi ve ark. 2016).

Uzun süreli karsinojenlere maruz kalmak genetik bozukluklara ve hücre çoğalmasını düzenleyen genlerde farklılıklara neden olmaktadır. DNA düzeyinde olan farklılıklar mutasyon, delesyon ve insersiyonlardan oluşurken, RNA düzeyindeki farlılıklar ise kansere neden olan genlerin ekspresyonlarını içermektedir. Akciğer kanseri gelişimine yol açtığı bilinen genetik olaylardan bazıları, bir proto-onkogen olan KRAS genindeki mutasyonlar, p53 gibi tümör süpresör gendeki mutasyonlar, retinoblastoma genindeki (Rb) anomalilerve diğer hücre döngüsündeki regülatör genlerdeki kusurlardır (Fleischhacker, Beinert ve ark. 1999).

1.2.3. Akciğer Kanserinin Histolojik Sınıflandırılması ve Evrelenmesi

Histolojik olarak akciğer kanseri tümörleri Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK) ve Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK) olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Akciğer kanserlerinin yaklaşık %85'i KHDAK'tır. Ayrıca KHDAK %40'ı adenokarsinom, %25-30'u

skuamöz hücreli karsinom ve %10-15'i büyük hücreli akciğer karsinom olmak üzere üç ana alt tipe ayrılmaktadır (Schabath ve Cote 2019).



Şekil 1.3. Akciğer kanserinin histolojik sınıflandırılması (Schabath and Cote 2019)

1.2.3.1. Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (KHAK)

Patologlar, 1926'da Barnard'ın bronşiyal karsinomu gösteren çalışmasından sonra küçük hücreli akciğer karsinomun varlığını tespit etmişlerdir. Fakat Watson ve Berg hastalığın bu tipinin klinik özelliklerini 1962'de tanımlamışlardır (Watkin ve Green 1990). KHDAK dünya da yeni teşhis edilen tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %15'ini veya yılda 180.000 vakayı oluşturan agresif bir malignitedir. KHAK'lı hastaların %90'ı ağır sigara içicisidir (Barnes, See ve ark. 2017). KHAK'lı hastaların prognozu kötüdür. 5 yıllık sağkalım oranı %5'in altındadır ve herhangi bir aktif tedavi almayan hastalar için sağkalım süresi ortalama 2-4 ay devam etmektedir (Yang, Zhang ve ark. 2019). KHAK, sık görülen TP53 mutasyonu (KHAK'ların> %75-90'ı) ile birleştiğinde, her tümörde çok sayıda mutasyon bulunan moleküler olarak agresif ve karmaşık bir yapıya sahip olmaktadır (Byers ve Rudin 2015).

KHAK, belirgin olmayan hücre sınırları, yetersiz sitoplazma ve belirgin nükleol içermeyen farklı sitolojik özelliklere sahip küçük tümör hücrelerinden oluşan epitelyal bir maligniteye sahiptir. Yüksek mitotik aktiviteye sahiptir ve birçok hastada nekroz görülmektedir (Davidson, Gazdar ve ark. 2013).

1.2.3.2. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri (KHDAK)

1.2.3.2.1. Adenokarsinom

Adenokarsinom, akciğer kanserlerinin yaklaşık %40'ını oluşturan, en sık görülen histolojik akciğer kanseri tipidir. Erkek hastalarda daha çok görülmekle beraber kadınlarda, nispeten genç hastalarda ve hiç sigara içmemiş kişilerde görülmektedir (Kuhn, Morbini ve ark. 2018). Adenokarsinomda beyin metastazı sıklıkla görülmektedir. Baş ağrısı, kusma, görme alanı eksikliği ve nöbetler ile ortaya çıkmaktadır (Clark ve Alsubait 2020). Genellikle periferik akciğer dokusunda meydana gelen ve histolojik olarak glandüler farklılaşma veya müsin üretimi ile karakterizedirler. Çoğu adenokarsinom, histolojik açıdan incelendiğinde heterojen bir yapıdadır. Bu yapı, lepidik, papiller, asiner, mikropapiller ve solid paternlerine sahiptir (Davidson, Gazdar ve ark. 2013).

Akciğer adenokarsinomlarında onkojenik ve aktive edici sürücü mutasyonlar olan, KRAS ve EGFR bulunmaktadır. KRAS mutasyonları neredeyse sadece adenokarsinom histolojisi sahip olan ve sigara içen hastalarda tespit edilmiştir (Davidson, Gazdar ve ark. 2013). KRAS, hastaların yaklaşık %30'unda tespit edilmekle beraber akciğer adenokarsinomunda en yaygın mutasyona uğramış onkogendir (Denisenko, Budkevich ve ark. 2018).

1.2.3.2.2. Skuamöz Hücreli Karsinoma

Skuamöz hücreli karsinom, akciğer kanseri vakalarının %25-30'unu oluşturmaktadır. Akciğerlerin merkezindeki bronşiyal hava yolu epitel hücrelerindeki skuamöz hücrelerin metaplazi/displazisinden kaynaklanır (Denisenko, Budkevich ve ark. 2018). Skuamöz hücreli karsinom, omuzda ağrı, Horner sendromu, el kaslarının atrofisi veya kemik yıkımı ile kendini gösteren Pancoast sendromuna neden olabilmektedir (Clark ve Alsubait 2020). Skuamöz hücreli karsinom merkezi akciğer tümörüdür, fakat önemli bir kısmı periferde tanımlanmıştır. Hücreler arası köprüler, bireysel hücre keratinizasyonu ve skuamöz inci oluşumu bu tümör tipinde skuamöz farklılaşmanın morfolojik özelliklerini karakterize etmektedir. Dünya Sağlık Örgütünün (DSÖ) sınıflandırmasına göre skuamöz hücreli karsinomanın berrak hücreli, küçük hücreli, papiller ve bazaloid alt tiplerini içermektedir (Davidson, Gazdar ve ark. 2013). Skuamöz hücreli karsinomun özel bir transkripsiyonel faktörü olan p63'ün güçlü ve yaygın ekspresyonunu göstermektedir (Perez-Moreno, Brambilla ve ark. 2012).

1.2.3.2.3. Büyük Hücreli Karsinoma

Büyük hücreli karsinom; skuamöz hücreli karsinom, adenokarsinom ve KHAK morfolojik özelliklerini göstermeyen farklılaşmamış bir karsinomdur. Bu tip karsinom, veziküler çekirdekleri ve belirgin nükleolleri olan büyük poligonal hücrelerin tabakalarından ve yuvalarından oluşan büyük hacimli ve görünüşte nekrotiktirler (Davidson, Gazdar ve ark. 2013). Ayrıca morfolojik olarak, skuamöz veya glandüler olgunlaşma göstermez (Denisenko, Budkevich ve ark. 2018). 2004 DSÖ sınıflandırmasına göre büyük hücreli karsinoma, büyük hücreli nöroendokrinkarsinom (LCNEC), bazaloidkarsinom, lenfoepitelyoma benzeri karsinom, berrak hücreli karsinom ve rabdoidfenotipli büyük hücreli karinoma gibi alt tipleri içermektedir (Davidson, Gazdar ve ark. 2013).

1.2.4. Akciğer Kanseri Evrelemesi

Akciğer kanserinde uygun tedavi yöntemlerinin seçimi ve prognoz açısından doğru ve kesin evrelemenin iyi yapılması büyük önem taşımaktadır. Akciğer kanserlerinde tümör-nod-metastaz (TNM) evrelemesi kullanılmaktadır. TNM evreleme sistemine göre T primer tümörün boyutunu, N lenf nodu tutulumunun varlığını ve M ise uzak metastaz varlığını veya yokluğunu göstermektedir (Liam, Andarini ve ark. 2015).

TNM evrelemesinin sekizinci baskısı, Uluslararası Kanser Kontrolü Birliği (UICC), Amerikan Ortak Kanser Komitesi (AJCC) ve Akciğer Kanseri Araştırmaları Derneği (IASLC) tarafından ortaklaşa olarak yayınlanmıştır (Rami-Porta, Call ve ark. 2018).

Tablo 1.1. Primer tümör evrelemesi (Goldstraw, Chansky ve ark. 2016)

Tx	Primer tümör değerlendirilmez veya balgam veya bronş lavajında malign hücrelerin varlığı ile tümör kanıtlanamaz	
T0	Primer tümör bulgusu olmadığı durumlar	
Tis	Karsinom in situ	
T1	Akciğer veya visseral plevra ile çevrili, lober bronştan daha proksimalde bronkoskopik invazyon kanıtı olmayan tümörün en büyük boyutu ≤3 cm	
	T1a (mi)	Minimal invazivadenokarsinom
	T1a	Tümörün en büyük çapı ≤1 cm
	T1b	Tümörün en büyük çapı >1 cm, ≤2 cm
	T1c	Tümörün en büyük çapı >2 cm, ≤3 cm
T2	Tümörün en geniş çapı >3 cm, ≤5 cm olan tümör veya aşağıdaki özelliklerden herhangi birine sahip tümör • Karina tutulumu olmaksızın ana bronş tutulumu, • Visseral plevra invazyonu, • Akciğer hilusuna kadar uzanan, ancak tüm akciğeri kapsamayan atelektazi veya obstrüktif pnömoniyle ilişkilidir.	
	T2a	Tümörün en büyük çapı >3 cm, ≤4 cm
	T2b	Tümörün en büyük çapı >4 cm, ≤5 cm
T3	Tümörün en büyük çapı >5 cm, ≤7 cm, göğüs duvarı (parietal plevra ve superior sulkus tümörleri dahil), frenik sinir, parietal perikard invazyonu, primer tümörle aynı lobda ayrı tümör nodül veya nodülleri	
T4	Tümörün en büyük çapı >7 cm veya diyafram, mediasten, kalp, büyük damar, trakea, rekürren laringeal sinir, özofagus, vertebral cisim, karina invazyonu, primer tümörününden farklı bir ipsilateral lobda ayrı tümör nodülleri	

Tablo 1.2. Bölgesel lenf nodu evrelemesi (Goldstraw, Chansky ve ark. 2016)

Nx	Bölgesel lenf düğümleri değerlendirilemiyorsa
N0	Bölgesel lenf nodu metastazı yok
N1	İpsilateral peribronşial ve/veya hiler lenf noduna ve intrapulmoner lenf nodunda metastaz
N2	Mediastinal ve/veya subkarinal lenf nodlarında metastaz
N3	Kontralateral mediastinal, hiler / skalen / supraklavikuler lenf nodu metastazı

Tablo 1.3. Uzak metastaz evrelemesi (Goldstraw, Chansky ve ark. 2016)

M0	Uzak metastaz yok	
M1	Uzak metastaz mevcut ise	
	M1a	Kontralateral lobda ayrı tümör nodülleri; plevral/perikardiyal nodüllü veya malign plevral/perikardiyal efüzyonlu tümör
	M1b	Tek ekstra torasik organda tek metastaz
	M1c	Bir veya daha fazla organda mültipleks tratorasik metastazlar

Tablo 1.4. TNM sınıflandırmasının sekizinci versiyonuna göre evre gruplandırması (Goldstraw, Chansky ve ark. 2016)

EVRE		T	N	M
GİZLİ KARSİNOM		TX	N0	M0
EVRE 0		Tis	N0	M0
EVRE I	IA1	T1a(mi)	N0	M0
		T1a	N0	M0
	IA2	T1b	N0	M0
	IA3	T1c	N0	M0
	IB	T2a	N0	M0
EVRE II	IIA	T2b	N0	M0
	IIB	T1a-c	N1	M0
		T2a	N1	M0
		T2b	N1	M0
		T3	N0	M0
EVRE III	IIIA	T1a-c	N2	M0
		T2a-b	N2	M0
		T3	N1	M0
		T4	N0	M0
		T4	N1	M0
	IIIB	T1a-c	N3	M0
		T2a-b	N3	M0
		T3	N2	M0
		T4	N2	M0
	IIIC	T3	N3	M0
		T4	N3	M0
EVRE IV	IVA	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1a
		Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1b
	IVB	Herhangi bir T	Herhangi bir N	M1c

1.2.5. Akciğer Kanserinde Genetik Değişiklikler

Akciğer kanserinde moleküler belirteçler, hedefe yönelik tedavilere yanıtın önemli belirleyicileri haline gelmiştir. Aynı zamanda, hastaya ait tümörlerin moleküler patolojisine dayalı olarak en iyi hastaya yönelik tedavi seçeneklerinin belirlenmektedir. Her bir moleküler kanser alt tipi, bazıları spesifik inhibitör moleküller tarafından hedeflenebilen belirli bir genetik değişiklik veya değişiklikler tarafından tetiklenmektedir (Tuononen, Maki-Nevala ve ark. 2013).

Kansere bağlı oluşan mutasyonların keşfedilmesi, kanser genomunun sistematik olarak yeniden düzenlenmesi sonucu gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu çalışmada patologlar tarafından belirlenen minimum %70 tümör hücresi içeren 188 insan akciğer adenokarsinomu vakasında yeni somatik mutasyonları keşfetmeyi amaçlamaktadır. Bilinen onkogenleri ve tümör süpresör genleri, protein kinaz ailelerini ve kopya numarası değişikliği bölgelerindeki 623 genin DNA sekans analizinden sonra 1.000 somatik mutasyon ortaya çıkarmıştır. Analiz sonuçlarına göre muhtemel olarak yüksek bir mutagenez hızına sahip 26 gen tanımlanmıştır. Bunlarında muhtemelen karsinogenezde etkili olan genler olduğu ifade edilmiştir. Sıklıkla mutasyona uğramış diğer genler arasında *EGFR* homoloğu *ERBB4* gibi tirozinkinazlar ve *EPHA3, VEGFR2 (KDR)* ve *NTKR* gibi çoklu efrin reseptör genleri yer almaktadır (Ding, Getz ve ark. 2008).

Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü (EGFR) bir trans membran tirozin kinaz (TK) reseptörüdür. Hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptoz gibi biyolojik süreçleri kontrol eden birçok sinyal iletim yolağını düzenlemektedir. EGFR sinyal yolaklarındaki bozukluklar önemli kanser etkenidir. EGFR'deki TK domaini 18-24 ekzonlarını kapsamaktadır. Bu ekzonlar Akciğer Kanseri ile ilişkili olan en yaygın ve önemli mutasyonları kapsamaktadır (Tuononen, Maki-Nevala ve ark. 2013).

EGFR, dünya da klinik ortamda yaygın olarak kullanılan, akciğer kanserinde moleküler hedefli tedavi de kilit rol oynamaktadır. EGFR'yi hedefleyen mevcut ilaçlar 2 kategoriye ayrılabilir. Bunlar küçük moleküllü EGFR tirozin kinaz inhibitörü (TKI) olan gefitinib ve erlotinib ve monoklonal anti-EGFR antikoru olan setuksimab (El-Telbany ve Ma 2012). EGFR'deki TK domaini, EGFR'nin hücre içi katalitik bölgesidir ve gefitinib ve erlotinib gibi TKI'ler tarafından hedeflenebilmektedir. EGFR TKI'ler, EGFR'nin aktivasyonunu inhibe eder ve aşağı akış sinyal yollarının aktivasyonunu baskılar böylece upregüle olan proapoptotik

sinyal molekülleri apoptotik yolağı aktive etmektedir. KHDAK hastalarında *EGFR* ekzon 18-21 mutasyonlarının çoğu TKI duyarlı olmakla beraber, bazı mutasyonlar TKI direnci ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Tuononen, Maki-Nevala ve ark. 2013). TK domaininde 18-21 arasındaki ekzonların, mutasyonel sıcak noktaları barındırdığı düşünüldüğünden, en yoğun dizilenen bölgedir (El-Telbany ve Ma 2012).

KRAS (Kirstenrat sarkoma viralonkogen homoloğu), RAS-RAF-MEK-ERK sinyal yolağında önemli rolleri olan üç RAS ailesi proteinlerinden birisini kodlamaktadır (PharmGKB). RAS proteinleri, hücrelerin proliferasyonu, hayatta kalma ve farklılaşması gibi birçok hücresel yanıtı kontrol eden sinyal yolaklarını düzenleyen bir proto-onkogendir (Schubbert, Shannon ve ark. 2007). Ras proteinleri, inaktif guanozin difosfat (GDP) ve aktif guanozin trifosfat (GTP) bağlayan yapılar arasında geçiş yapan küçük GTPazlardır. İnsanlarda RAS proteinleri, *RAS* gen ailesinin üyeleri *HRAS, NRAS ve KRAS* olarak adlandırılan fonksiyonel genler tarafından ifade edilmektedir. *RAS* mutasyonlarının %86'sını oluşturan en sık mutasyona uğramış izoformu *KRAS* genidir. *KRAS* geninde en sık bulunan mutasyonlar öncelikle ekzon 12. 13. ve 61. kodonlarında yanlış anlam mutasyonlarıdır. *KRAS* gen mutasyonları KHDAK hastalarının yaklaşık %15-25'inde bulunmaktadır (Liu, Wang ve ark. 2019).

Serin/treonin protein kinaz aile üyesi olan BRAF, RAS-RAF-MAPK sinyal iletim yolağının önemli bir bileşenidir. Bu protein, MAPK sinyal yolağının, çekirdekteki transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna ve aktivasyonuna yol açarak proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi temel hücresel süreçleri düzenlemektedir (Geyer, Abdel-Wahab ve ark. 2019). *BRAF* mutasyonlarının %85'inden fazlasının adenokarsinomlarda gözlendiği bildirilmiştir. Aynı zamanda KHDAK hastalarının sadece %2-4'ünde bir *BRAF* mutasyonu tanımlanmıştır (Baik, Myall ve ark. 2017).

ALK (Anaplastik Lenfoma Kinazı) geni, kromozom 2 (2p23) kısa kolu üzerinde yer alan bir transmembran tirozin kinaz reseptörüdür. *ALK* ilk olarak 1994 yılında anaplastik büyük hücreli lenfomada kromozomal bir translokasyondan kaynaklanan *NPM-ALK* füzyonu olarak tanımlanmıştır. Bu tanımlamadan sonra *ALK* geni, KHDAK'ta dahil olmak üzere diğer kanser türleri ile ilişki olduğu bildirilmiştir. *EML4-ALK* füzyonu ilk olarak 2007 yılında potansiyel onkojenik olarak KHDAK'ta tanımlanmıştır. *ALK* geninde kromozomal yeniden düzenlenmesi KHDAK'da %3-6 oranında gözlenmektedir (Du, Shao ve ark. 2018).

HER2 (NEU, EGFR2 veya ErbB-2), EGFR ailesinin bir üyesi olan bir tirozin kinaz reseptörüdür. Akciğer Kanserinin de dahil olduğu bazı insan kanserlerinin patogenezinde önemli bir rol oynayan mutasyon bildirilmiştir (Shigematsu, Takahashi ve ark. 2005). ErbB-2 tirozin kinaz reseptörü, PI3K-AKT ve ERK-MAPK yolakları dahil olmak üzere çoğalma, göç, hayatta kalma ve hücre büyümesi gibi birçok hücre fonksiyonunu düzenleyen birçok yolağı aktive etmektedir (Leonetti, Sharma ve ark. 2019). Akciğer kanserlerinde HER2'nin aşırı ekspresyonu yaklaşık %20 oranında olduğu bildirilmiştir (Shigematsu, Takahashi ve ark. 2005). KHDAK'ta, HER2 proteininin aşırı ekspresyonu ve *HER2* gen amplifikasyonunun oranları sırasıyla %23-36 ve %20 olarak bildirilmiştir (Tomizawa, Suda ve ark. 2011).

PIK3CA geni, hücre proliferasyonu, farklılaşması, hayatta kalması ve motilitesi dahil olmak üzere birçok hücresel süreçte yer alan bir lipit kinaz ailesinden olan fosfatidilinositol 3-kinazların (PI3K) katalitik alt birimlerinden biri olan p110a'yı kodlar (Liu ve Roberts 2006). *PIK3CA* genindeki E542K, E545K ve H1047R mutasyonlarının, lipidkinaz aktivitesini yükselttiği ve AKT gibi downstream sinyal yolaklarını aktive ettiği gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, *PIK3CA* genindeki somatik yanlış anlamlı mutasyonlarının akciğer, kolon, beyin, mide, meme ve yumurtalık dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde bulunduğu bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise akciğer kanserlerinin yaklaşık %4'ünün *PIK3CA* geninde mutasyonların bulunduğu saptanmıştır (Kawano, Sasaki ve ark. 2006).

MET, hepatosit büyüme faktörü (HGF) için reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesi olan c-MET'i kodlayan bir proto-onkogendir. *MET* geni kromozom 7q21-q31 üzerinde bulunur ve 21 ekzon sahiptir. c-MET ve HGF'nin spesifik kombinasyonu, hücre migrasyonu, proliferasyonunu ve anjiyogenezi tetiklemek için downstream sinyal yolaklarını aktive etmektedir (Mo ve Liu 2017). MET, HGF ligandının MET reseptörüne bağlanmasıyla aktive olur ve hücre içi tirozin kalıntılarının homodimerizasyonunu ve fosforilasyonunu indükler. Bunun sonucunda, RAS/ERK/MAPK, PI3K-AKT, Wnt/β-katenin ve STAT gibi downstream sinyal yolakları aktive olurlar. İlk olarak 1980'lerin ortalarında keşfedilen MET yolağının 1990'larda akciğer kanserinde düzensiz mekanizmaya sahip olduğu tespit edilmiştir. Akciğer kanserinde MET yolunun düzensizliği, gen mutasyonu, amplifikasyon, yeniden düzenleme ve protein aşırı ekspresyonu da dahil çeşitli mekanizmalar tarafından gerçekleşmektedir. Bazı KHDAK'larda, c-MET yolağını, özellikle *MET* ekzon 14 (METex14) değişiklikleri ve *MET*

gen amplifikasyonunu etkilediği düşünülmüştür. *MET*ex14 değişiklikleri akciğer adenokarsinomlarının yaklaşık %3-4'ünde saptanmıştır (Drilon, Cappuzzo ve ark. 2017).

RET proto-onkogeni ilk olarak 1985 yılında fare NIH3T3 hücrelerinin insan lenfoma DNA'sı ile transfeksiyonu sırasında tanımlanmıştır. *RET,* kanserde esas olarak *RET*'in kinaz domainini içeren füzyon genlerini ve RET proteininin hem hücre dışı hem de sitoplazmik bölgelerindeki yanlış anlamlı işlev kazanımı mutasyonlarını oluşturan kromozomal yeniden düzenlemeler yoluyla aktive edilmektedir (Subbiah, Yang ve ark. 2020). Bugüne kadar, diğer ortak genlerle beraber *RET* füzyonunun, onkojenik yeniden düzenlemeleri ve mutasyonları, papiller tiroid karsinomu (PTC) ve KHDAK dahilolmak üzere çeşitli insan kanserlerinde bulunduğu tespit edilmiştir. *RET* füzyonu KHDAK'ların %1-2'sinde tanımlanmıştır. *KIF5B-RET* füzyonu en yaygın olarak tanımlanandır.

ROS1, insülin reseptör ailesinin bir reseptör tirozin kinazıdır (El-Telbany ve Ma 2012). *ROS1* geni kromozom 6q22.1 üzerinde bulunmaktadır. *ROS1* gen füzyonları ilk olarak bir insan glioblastoma hücre hattında tanımlanmıştır. *ROS1* genini içeren kromozomal yeniden düzenlemeler ilk olarak 2007 yılında KHDAK hastalarının %1-2'sinde tanımlanmıştır (Lin ve Shaw 2017). *ROS1* füzyonları potansiyel bir sürücü mutasyonu olarak kabul edilmektedir (El-Telbany ve Ma 2012). Yapılan çalışmalarda, *ROS1* gen füzyonlarının onkojenik potansiyelini gösterilmiştir. Akciğer alveolar epitelinde *EZR-ROS1* füzyonu eksprese eden transgenik farelerde, bilateral akciğer adenokarsinomları geliştiği bildirilmiştir (Lin ve Shaw 2017).

Nörotrofik tirozin kinaz reseptör 1 (*NTRK1*) proto-onkogeni, 1q21-22 kromozomu üzerinde bulunur. Tirozin kinaz reseptörlerinin süper ailesine ait, tropomiyozin ilişkili kinaz A olarak da bilinen bir tirozin kinazı kodlar. *NTRK1* geni, MAPK, PI3K gibi çeşitli sinyal iletim yolaklarının aktivasyonu ile hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Akciğer kanserinde, adenokarsinomların yaklaşık %3'ünde *NTRK1* füzyonları tanımlanmıştır (Villalobos ve Wistuba 2017).

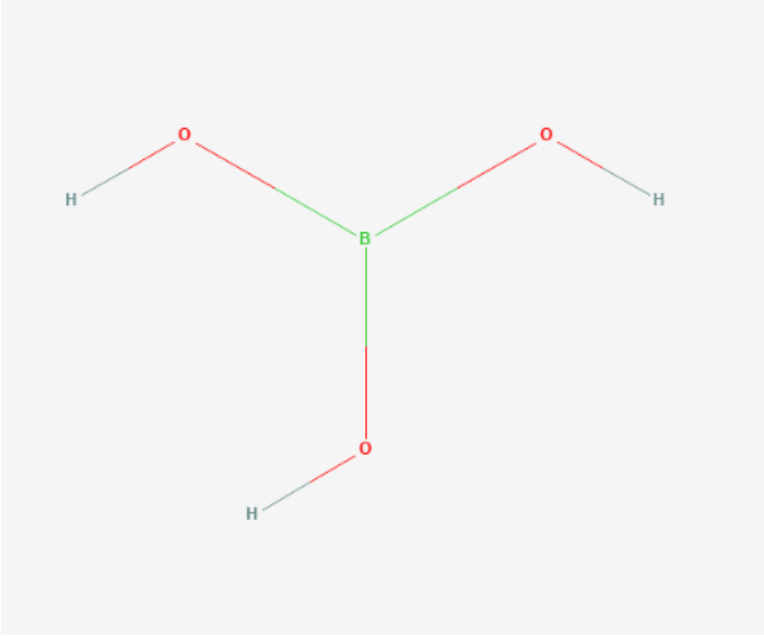
Fibroblast büyüme faktörü reseptörü (*FGFR*) geni, kromozom 8 üzerinde bulunur ve FGFR ailesine ait bir tirozin kinaz reseptörünü kodlamaktadır. Ligand-reseptör bağlanması gerçekleştiğinde, *FGFR* geni, FGFR substrat 2-alfa'yı (FRS2a) dimerize ve fosforile eder ve RAS/MAPK ve PI3K/AKT/mTOR yolakları dahil olmak üzere farklı yolakların aktivasyonuna yol açarak hücre hayatta kalmasını, hareketliliğini, istilasını ve proliferayonunda rol almaktadır. Akciğer kanserinde, *FGFR1* amplifikasyonunun insidansı,

skuamöz hücreli karsinomda %20 adenokarsinomada %3 olarak saptanmıştır (Villalobos ve Wistuba 2017).

1.3. BOR ve BORİK ASİT

Periyodik tablonun beşinci elementi olan bor, doğada elemental halde bulunmaz. Bunun yerine bor, borik asitin tuzu veya esteri olarak oksijenle birleşir (Briggs 2001). Doğada bor çeşitli moleküller ile bileşikler oluşturarak bulunmaktadır. Borun oksijenle yaptığı bileşikler borat olarak adlandırılmaktadır. Aynı zamanda boraks, borik asit, kolemanit, kernit ve uleksit gibi moleküler yapıda bulunmaktadır (Turkez, Geyikoglu ve ark. 2012).

Bor elementi periyodik tabloda B simgesi ile gösterilmektedir (Kot 2008). Ayrıca, periyodik tabloda karbon elementinin sol yanında yer almaktadır. Bu nedenle fiziksel ve kimyasal özellikleri karbon elementine çok benzemektedir ve tıp alanında (örneğin ilaçların üretimi ve kanser tedavisi gibi) sterilizasyon uygulamalarında ve endüstriyel alanlarda (cam, seramik, metal, kozmetik gibi) kullanılmaktadır (Aysan, Sahin ve ark. 2013).



Şekil 1.4. Borik asitin kimyasal yapısı (PubChem)

Bor bileşikleri, neredeyse tamamen gastrointestinal ve solunum sistemleri yoluyla vücuda alınmaktadır. Vücudun normal pH aralığında baskın tür olarak, vücut dokularında ve sıvılarda borik asit ($B(OH)_3$) bulunmaktadır (Hunt 1998). Borik asit, doğal bir bileşik olarak bilinmektedir ve sudan, sebzelerden ve diğer birçok gıdadan diyet yoluyla vücuda

alınmaktadır (Howe 1998). Vücuda alınan borik asit hızlı bir şekilde absorbe edilmektedir. Daha sonra pasif difüzyon yoluyla kan ve vücut sıvılarına yayılmaktadır. Daha önce yapılmış olan çalışmalarda hem insan hem de farelerde borik asitin kan ve dokulardaki dağılım konsantrasyonunun 1:1 oranında olduğu bildirilmiştir. Borik asit metabolizmaya katılmadığı edilemediği için vücuttan idrar yoluyla atılmaktadır. Vücutta kalma süresi yaklaşık bir gündür. Borik asit yumuşak dokularda birikim göstermemesine karşın kemik dokularda biriktiği tespit edilmiştir. Yumuşak doku, idrar ve kandaki normal bor seviyeleri 0.05 -10 ppm aralığındadır (Qureshi, Al-Shabanah ve ark. 2001).

Sağlıklı bir insan kanındaki borik asit konsantrasyonu, borun az olduğu kesimlerde saptanabilir en düşük seviye 4,7 µM (48,5 µg) ve en seviyenin ise bor madeni işçilerinde 350 µM (3600 µg) olduğu bildirilmiştir (Henderson, Kobylewski ve ark. 2015). DSÖ, bor alımının yetişkinler için 1-13 mg / gün güvenilir aralığı olabileceğini belirtmiştir (WHO). Kemik sağlığı açısından önerilen günlük bor alımının 3 mg/gün olduğu bildirilmiştir (Zofkova, Nemcikova ve ark. 2013). Bor içeriği çeşitli vücut organ ve dokuları arasında değişiklik göstermektedir (Tablo 1.5). Bu da borun her organda farklı fonksiyonel etkiler yerine getirdiğini göstermektedir (Devirian ve Volpe 2003).

Organ	Bor Konsantrasyonu (ppm)	Analiz Yöntemi
Kalp	28	Atomik AbsorpsiyonSpektrometrisi
Kaburga	10.2	Kütle Spektrometrisi
Karaciğer	2.31	Emisyon Spektrometrisi
Dalak	2.57	Emisyon Spektrometrisi
Akciğer	0.6	Kütle Spektrometrisi
Böbrek	0.6	Kütle Spektrometrisi
Kas	0.1	Kütle Spektrometrisi
Beyin	0.06	Kütle Spektrometrisi

Tablo 1.5. Organ ve Dokulardaki Bor Konsantrasyonu (Devirian and Volpe 2003)

İnsan vücudundaki total bor içeriğinin 3-20 mg arasında değiştiği düşünülmektedir. Aynı zamanda vücuttaki en yüksek bor konsantrasyonunun bulunduğu dokuların kemik, tırnak ve saçta bulunduğu tahmin edilmektedir. Yapılan bir çalışmada 50 sağlıklı insanın, tam kan, serum ve idrardaki ortalama bor konsantrasyonlarının sırasıyla 0.06, 0.02 ve 0.75 ppm olduğu gösterilmiştir (Devirian ve Volpe 2003).

Diyetle alınan borun çeşitli metabolik eylemler üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Kemik metabolizmasında önemli rol oynayan kalsiyum, D vitamini ve magnezyum gibi minerallerle etkileşime girmektedir. Aynı zamanda postmenopozal kadınlarda steroid hormonu yükselttiği ve aterosklerozun önüne geçmede faydalı olabileceği tespit edilmiştir (Devirian ve Volpe 2003). Bor ve bileşiklerinin üreme sistemi ve gelişimsel toksisite üzerinde etkileri olduğu bilinmektedir. Bu toksisitenin östrojen benzeri etkiler nedeniyle kaynaklandığı belirsizdir. Sıçanlar üzerinde yapılan bir araştırmada in vivo koşullarda borik asitin östrojene benzer belirtiler sergilediği gözlenmiştir. Ancak, MCF-7 meme kanseri hücre hatlarında yapılan çalışmalar ile in vitro koşullarda bu belirtilerin olduğu saptanamamıştır (Wang, Zhao ve ark. 2008).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar bor ve bileşiklerinin antikanserojen etkilerinin olabileceğini göstermektedir. Korkmaz ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, bor açısından fakir bölgelerde yaşayan 587 kadın ve borca zengin bölgelerde yaşayan 472 kadından alınan smear örnekleri karşılaştırılmıştır. Diyetle alınan ortalama bor alımı, bor açısından zengin bölgelerdeki kadınlar için 8.41 mg/gün iken borca fakir bölgelerde yaşayan kadınlar için 1.26 mg/gün olarak belirlendi. Bordan zengin bölgede yaşayan kadınlardan alınan smear örneklerinde, sitopatolojik olarak serviks kanseri bulgusuna rastlanmamıştır. Fakat bor açısından fakir bölgelerde yaşayan kadınlardan alınan örneklerin, 15'inde sitopatolojik olarak serviks kanseri bulguları tespit edilmiştir (Korkmaz, Uzgoren ve ark. 2007).

Yapılan deneysel çalışmalarda borik asitin insan prostat kanserini azalttığı rapor edilmiştir. Borik asitin, konsantrasyona bağlı olarak kanser hücrelerinde NAD^+ ve $NADP^+$ üretimini ve Ca^{++} salımını etkiledeği tespit edilmiştir. Hücre içi Ca^{++} sinyalinin hücrelerin proliferasyonunu düzenlemede önemli rol oynamaktadır. Bu çalışmada borik asitle muamele edilmiş DU-145 prostat kanseri hücrelerinde depolanmış Ca^{++} salımını, NAD^+ ve $NADP^{+'}$ yı inhibe ettiği bildirilmiştir. Kanser hücresinin çoğalmasının boratlarla %30-97 oranında inhibe edildiği bildirilmiştir (Barranco, Kim ve ark. 2009).

Yapılan bir çalışmada ise borik asitin insan deri melanoma hücre hatlarında (SK-MEL28), hücrelerin kimyasal ve morfolojik etkilerindeki değişimler incelenmiş. Yapılan bu çalışmaya göre düşük dozlardaki borik asit konsantrasyonlarında hücrelerde nükleik asit/protein oranın yükseldiğinin gözlenmesi hücrelerin replike olduğunu göstermektedir. Borik asitin yüksek dozlardaki muamelesinde ise nükleik asit/protein oranı düşük olduğunun gözlenmesi hücrelerde replikasyonun gerçekleşmediğini göstermektedir. Aynı zamanda hücre canlılığında belirgin bir azalma olduğu görülmektedir. Yüksek doz borik asit konsantrasyonlarının antiproliferatif bir etkiye sahip olduğu ve hücre apoptozunu indüklediği tespit edilmiştir (Acerbo ve Miller 2009).

Epidemiyolojik hayvan ve hücre kültürü çalışmalarında, borun prostat kanseri hücreleri üzerinde kemopreventif bir etkisi olduğunu tespit edilmiştir. Borik asit ayrıca hücrelerin büyümesini destekleyen sitokimyasallar, MAPK ve A-E siklinlerinin doza bağlı olarak azaldığını göstermektedir. Ayrıca hücrelerde, azalmış metastatik potansiyelin göstergesi olan F-aktin değişiklikleriyle beraber, daha az yapışma, migrasyon ve invazyon potansiyeli olduğu saptanmıştır (Barranco ve Eckhert 2006).

Bor ve bileşiklerinin sahip olduğu antitümorijenik etki mekanizmaları tam olarak bilinmemektedir. Apoptoz, kansere karşı en güçlü savunma mekanizmalarından biridir, çünkü bu süreçte zararlı olabilecek mutasyona uğramış hücreleri ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle üzerinde en çok durulan muhtemeletki mekanizmalarından biri, kanser hücrelerinde apoptozun uyarılmasıdır. Bu bilgiler ışığında, MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatlarının borik asit ile muamele edilmesiyle gerçekleştirilen bir çalışma da bu hücrelerde borik asitin, apoptoz mekanizmasını uyararak kanser hücrelerinin proliferasyonunu doz bağımlı bir şekilde inhibe ettiğini göstermektedir (Scorei, Ciubar ve ark. 2008).

Prostat spesifik antijen (PSA), tripsin benzeri bir serin proteazdır ve prostat dokusu tarafından salgılanan en bol proteinlerden biridir. Normalde kanda çok düşük seviyelerde görülmektedir. Fakat prostat kanserinde serumdaki PSA oranı belirgin düzeyde yükselmektedir. PSA, IGFBP-3'ün (Insulin like Growth Factor Binding Protein 3) yapısını bozarak IGF-1 (Insulin like Growth Factor) oluşumuna sebep olur ve bu nedenle tümör büyümesine yol açtığı düşünülmektedir. Bu çalışmada, PSA inhibitörü olarak borik asit konsantrasyonu kullanılmıştır. LNCaP hücre hattı modeli oluşturulan kemirgenler, oral yolla borik asitle

beslenmiştir ve kontrol grubuna ise sadece su verilerek karşılaştırılmıştır. Tümör boyutu 8 hafta boyunca ölçülmüştür. Düşük ve yüksek doz borik asit ile muamele edilen farelerde tümör hacmi sırasıyla %25-38 oranında azalırken, serum PSA seviyeleri kontrollere göre %86.4-88.6 azalmıştır. Aynı zamanda, bor, prostat kanserinin büyümesi için gerekli olan tümördeki IGF-1'in tümörlerdeki ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir (Gallardo-Williams, Chapin ve ark. 2004). Boronun diyet ile alımının, kadınlarda akciğer kanseri ve meme kanseri riskini azalttığıda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Mahabir, Spitz ve ark. 2008).

Borik asitin hücrelerde Histon Deasetilazları da (HDAC) inhibe ettiği gösterilmiştir. HDAC, histonik ve histonik olmayan proteinlerin konformasyonunu değiştirerek gen ekspresyonunu kontrol etmektedir. HDAC'lar histon kuyruklarındaki lizin rezidülerini deasetilleyerek kromatin yoğunlaşması yoluyla transkripsiyonel susturulmaya neden olurlar. Histonların asetilasyonunu modüle ederek HDAC'ların oluşumunu engelleyen ilaçlar, hücre büyümesini inhibe ederek hücreleri farklılaşması için uyarır ve kanser gelişimini önler. Fare embriyoları kullanılarak gerçekleştirilmiş bir çalışma da borik asitin HDAC oluşumunu belirgin bir şekilde engellediği tespit edilmiştir. Aynı zamanda bu etki mekanizmasının borik asitin kanser hücrelerinin çoğalmasını inhibe eden alternatif bir yol olabileceğini göstermektedir (Di Renzo, Cappelletti ve ark. 2007).

Yapılan bütün bu çalışmalar ışığında, bor ve bileşiklerinden biri olan borik asitin antikanserojen ajan olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Borik asit doğal olarak kanda bulunmaktadır ve günlük beslenme ile alımdan sonra vücutta hızlıca absorbe edilmektedir. Yeterli seviyeye ulaştığında ise tüm dokulara yayılmaktadır. Epidemiyolojik, hayvan deneyleri ve hücre kültürü çalışmaları birçok kanser hücresinde borik asitin hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini işaret etmektedir (Barranco ve Eckhert 2006).

1.4. APOPTOZ

Apoptoz; kelime anlamı olarak ağaçların yapraklarını dökmesine benzetilen “yaprak dökme” anlamına gelen bir terimdir (Wong 2011). Programlanmış hücre ölümü olarakta bilinen bu süreç, hücrede yeni proteinlerin sentezini, hücre iskeletinin yıkımı için bazı proteaz enzimlerin ve DNA’nın parçalanması için DNaz enzimlerinin aktif hale gelmesini tetikleyen, aktif olarak düzenlenen bir süreçtir (Cavalcante, Schaan ve ark. 2019).

İlk olarak 1972 tarihli bir makalede Kerr, Wyllie ve Currie tarafından farklı morfolojik özelliğe sahip hücre ölümünü ifade etmek için ‘apoptoz’ kelimesi kullanılmıştır (D'Arcy 2019). Apoptoz, bir dizi sinyal iletim kaskadları ve hücresel proteinler tarafından düzenlenen sıkı bir şekilde programlanmış bir hücre ölümü türüdür (Abotaleb, Samuel ve ark. 2018). Apoptoz, dokularda gelişim ve yaşlanma sırasındaki hücre popülasyonlarını korumak için homeostatik bir mekanizma olarak görev yapar. Apoptoz ayrıca immun reaksiyonlarında olduğu gibi, hücreler hastalık nedeniyle veya zararlı maddeler tarafından hasar gördüğünde bir savunma mekanizması olarak ortaya çıkmaktadır (Elmore 2007).

Apoptoz hücre popülasyonlarının homeostazını devam ettirmek için önemli bir mekanizmadır ve düzensizliği kansere yol açabilir (Mohana-Kumaran, Hill ve ark. 2014). Uygun olmayan apoptozun artması durumunda nörodejeneratif hastalıklara, azalması durumunda ise kanser ve otoimmun hastalıklara yol açabilmektedir (Dinçel ve Kul 2016).

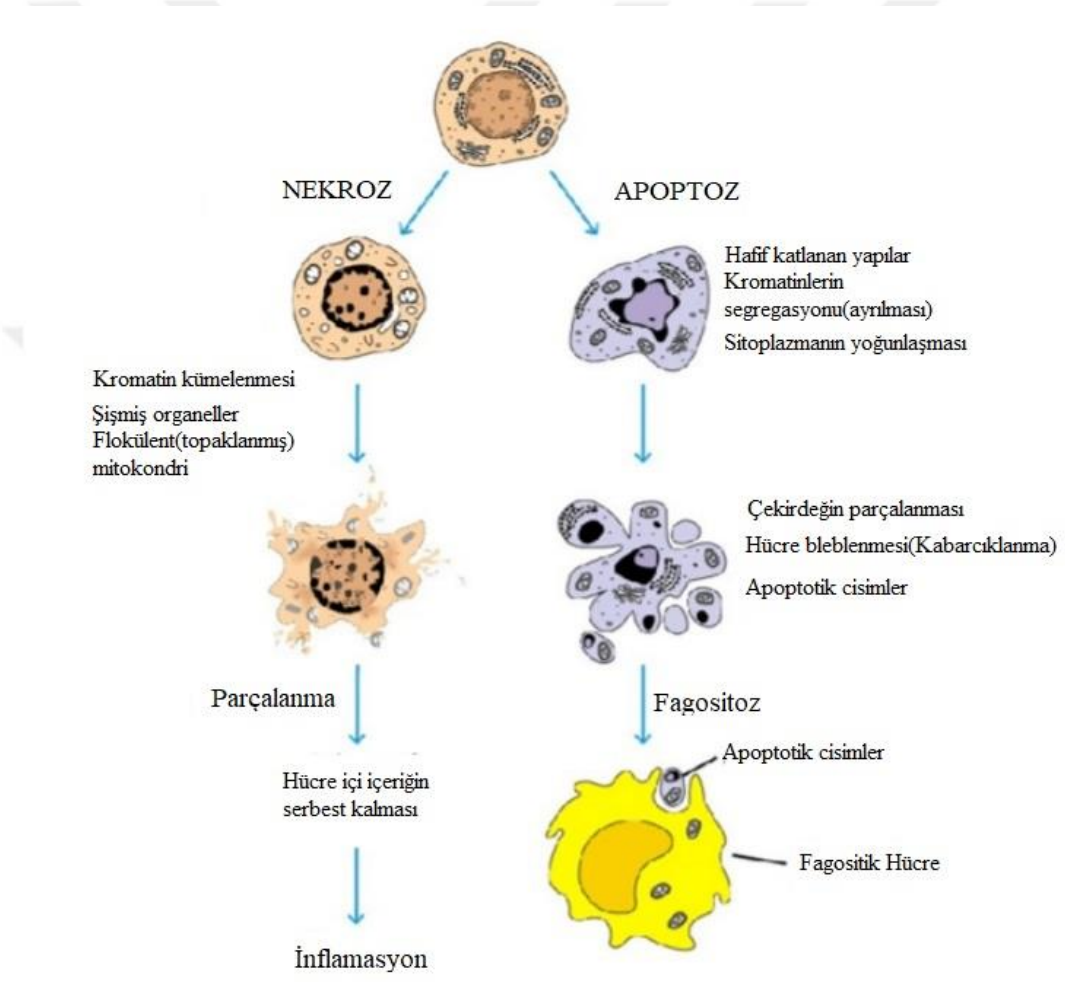
Apoptoz fizyolojik olarak insan vücudunun gelişiminde ve embriyonik gelişimde meydana gelmektedir. Fetüsun el ve ayak parmakları arasındaki doku kaybı embriyonik gelişimdeki apoptoza en güzel örnektir. Yine menstrüel siklusta endometriumun parçalanması apoptozis ile meydana gelir. Apoptozun mitokondriyal yolunun aktivasyonu, radyasyon ve ilaç kullanımı ile ilişkili olarak meydana gelen DNA hasarı, yanlış katlanmış proteinler ve viral enfenksiyonlar ile gerçekleşir (Celepli, Bigat ve ark. 2020).

1.4.1. Apoptoz ve Nekroz Farkı

Apoptozdan farklı olarak nekroz, hipoksi/iskemi, aşırı sıcaklık veya enfenksiyon gibi çeşitli etkenler ile indüklenen kontrolsüz hücre ölümüdür. Nekrozda hücre, homoeostazı sürdürmede başarılı olamadığı için genellikle şişerek yanıt verir (D'Arcy 2019). Ancak apoptoza giden hücrede bu durumun tam tersine büzüştüğü ve küçüldüğü görülmektedir (Dinçel ve Kul 2016).

Apoptozun aksine, nekroz, hücrenin ani bir şokla (radyasyon, ısı, kimyasallar, hipoksi vb.) işlevini kaybedecek kadar şiddetli hasar gördüğü, enerjiden bağımsız olan bir hücre ölümü türüdür (D'Arcy 2019).

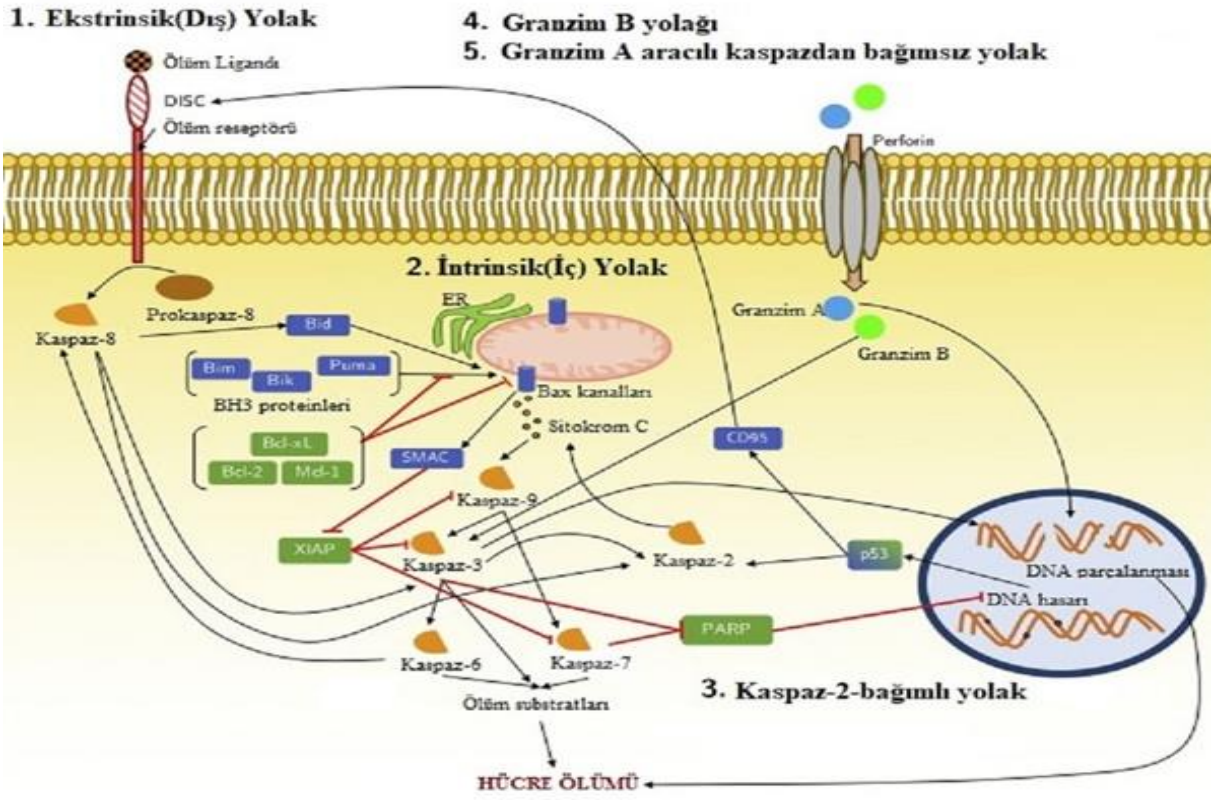
Apoptotik hücre nekrozun aksine apoptotik cisimciklere ayrılır. Bu cisimciklerde nükleus ve hücre içi organeller bulunmaktadır. Apoptozun en bilinen özelliği endonükleaz enziminin aktive olmasıyla beraber DNA'nın internükleozomal bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti ve katları olacak biçimde DNA'yı kesmesidir. Bu durum sonucunda apoptotik hücrelerin DNA'sının jel görüntüsü karakteristik olarak merdiven biçiminde olmaktadır. Buna karşın nekrozda düzensiz parçalanma gerçekleştiği için jelde yayılmış bir biçimde görülmektedir (Dinçel ve Kul 2016).



Şekil 1.5. Apoptoz ve nekroz arasındaki farklar (Asensi, Collazos ve ark. 2017)

1.4.2. Apoptoz Mekanizmaları

Apoptoz mekanizmaları, enerji bağımlı moleküler kaskad olaylarını içeren oldukça kompleks ve karmaşık bir mekanizmadır (Elmore 2007). Apoptozda başlıca 5 farklı yolak tanımlanmıştır. Bu yolakların en bilinenleri intrinsik (içsel) yolak ve ekstrinsik (dışsal) yolaklardır. İntrinsik (içsel) yolak metabolik ve hipoksik stres aracılığı ile aktive olmaktadır. Ekstrinsik (dışsal) yolak ise ölüm ligandı Fas-L veya tümör nekroz faktörü alfanın (TNFα) aracılığı ile kaspaz-8'i aktive etmesiyle bu yolak başlamış olur. Bunlar dışındaki diğer yolaklar; DNA hasarı üzerine tümör süpressör geni TP53 ile aktive olan kaspaz-2 bağımlı yolak, kaspaz-3'ün direkt aktive olması ile gerçekleşen granzim-B yolağı ve ve DNA fragmantasyonu ile başlayan granzim-A yolağıdır (Grilo ve Mantalaris 2019).



Şekil 1.6. Apoptozdaki beş ana yolağa genel bakış (Grilo ve Mantalaris 2019)

Programlı hücre ölümünde, birçok mekanizma etkin olmakla beraber temelde kaspazlar (Caspase: Cycteinyl, aspartate-specific protease) olarak bilinen proteazlar tarafından

gerçekleştirilir. Bu kaspazların hedefleri, sitoskeletal proteinler, kinazlar ve transkripsiyon faktörleri gibi yüzlerce hayati önem teşkil eden proteinleri içerir. Kaspazlar, bu substratlarını spesifik aspartat kalıntılarındaki substrat proteinleri parçalayarak fonksiyon gösterirler (Matsuura, Canfield ve ark. 2016). Apoptozda görev alan kaspazlar fonksiyonel olarak başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-10) ve efektör kaspazlar (kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Shi 2002).

1.4.2.1. İntrinsik (İçsel) Apoptoz Yolağı

İntrinsik apoptoz yolağı, iyonlaştırıcı radyasyonun sebebi ile gerçekleşen genotoksik hasar, endoplazmik retikulum stresi, mitokondriyal hasar, aşırı mutajenik stimülasyon, onkojen nedenli hücre ölümleri veya büyüme faktörü gibi uyaranların olmaması ile aktive olmaktadır (Singh, Letai ve ark. 2019). Apoptozun intirinsik yolağı, BCL-2 (B-cell lymphoma-2) ailesi olarak adlandırılan bir protein ailesi tarafından düzenlenir. Bu proteinler proapoptotik ve antiapoptotik fonksiyonlara sahiptir. BCL-2 protein ailesinin üyeleri apoptoz süreci sırasında mitokondriyal olayların kontrolünü ve düzenlenmesi, hücrenin apoptoza gidip gitmeyeceğini belirlemektedir. Bazı antiapoptotik proteinler arasında BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W bulunur ve bazı proapoptotik proteinler arasında BAK, BAX, BID, BIM bulunur (Siddiqui, Ahad ve ark. 2015).

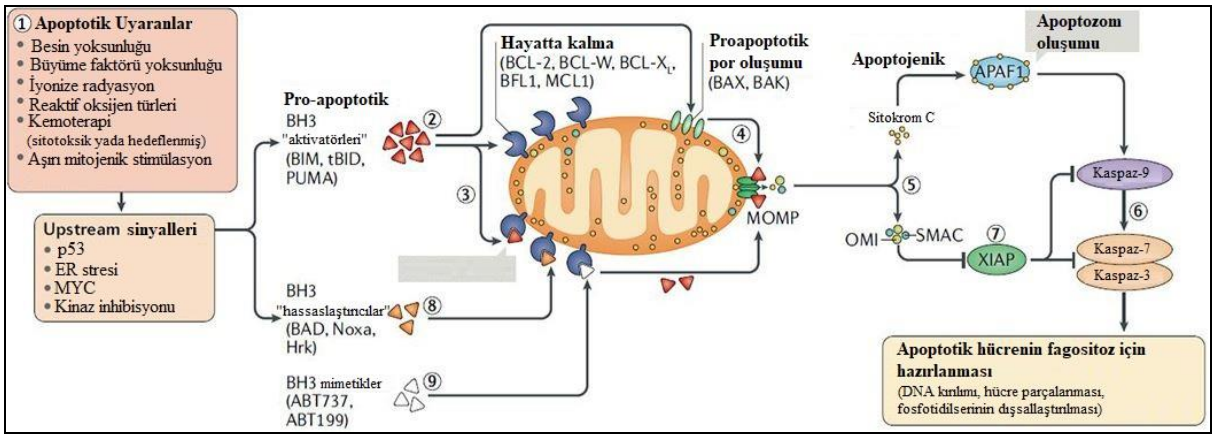
BCL-2 ailesi, BCL-2 homoloji (BH) alanları veya motifleri olarak bilinen kısa bir korunmuş sekans uzantısının (~20 kalıntı) varlığı ile tanımlanmıştır. BCL-2 proteinleri homoloji alanları (BH1, BH2, BH3 ve BH4) ve alfa sarmalını içermektedir (Siddiqui, Ahad ve ark. 2015). BCL-2 ailesinin proteinleri, bir protomerin BH3 alanının başka bir protomerin hidrofobik oluğuna bağlanarak apoptotik fonksiyonlarını kontrol eden homo ve heterodimerler oluşturduğu BH3 oluk mekanizması ile etkileşime girer. BH3 alanları ve oluk mekanizmasındaki amino asit dizilerindeki değişiklikler bu etkileşimlerin özgüllüğünü denetlemektedir. Apoptozisten sorumlu alan BH3'tür (Flores-Romero ve Garcia-Saez 2019).

BCL-2 ailesi, bulunduğu BH alanlarına göre 3 protein grubuna ayrılır. Bunlardan birincisi antiapoptotik akviteye sahip olan BCL-2 proteinleridir. BCL-2, BCL-X L, BCL-W, MCL-1, BFL-1/A1 proteinleri bu grupta yer almaktadır. BH alanlarının (BH1, BH2, BH3 ve BH4) hepsini kapsamaktadırlar. Antiapoptotik proteinler mitokondri membranında bulunan BAX ve BAD proapoptotik proteinlerini inhibe ederek apoptozu engeller. Proapoptotik aktiviteye sahip BCL-2 proteinleri ise ikinci grupta yer almaktadır. BAX, BAK, BCL2L9 proteinleri bu grubun içerisinde yer almaktadır. BH1, BH2 ve BH3 alanlarını içermektedirler. Bu protein

grubu dış mitokondriyal zardaki geçirgenliğin [mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP)] artmasını sağlar. MOMP artması ile apoptotik faktörler sitozole salınır. Proapoptotik aktiviteye sahip olan üçüncü grup ise ikinci gruptan farklı olarak sadece BH3 alanını içermektedir. BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, NOXA, PUMA proteinlerinden oluşmaktadır. Doğrudan mitokondriyal BAX ve BAK ile etkileşime girerek yapısal değişikliklerin oluşmasında sebep olmaktadırlar. Üçüncü grupta yer alan proteinlerin varlığı MOMP için gereklidir (Kale, Osterlund ve ark. 2018).

Mitokondrinin dış membranında eksprese olan BAX ve BAK proteinleri apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) molekülüne bağlanırlar. Hücredeki iç hasar meydana geldiğinde Apaf-1 serbest kalı ve MOMP artışı ile mitokondriyumdaki sitokrom C'nin sitozole salınımı sonucu Apaf-1 ve kaspaz-9 molekülüne bağlanarak aktive eder. Aktive olan bu yapı ATP eşliğinde apoptozom kompleksini oluşturur ve böylece kaspaz kaskadı başlatılır. (Pena-Blanco ve Garcia-Saez 2018).

Dış mitokondriyal membran (OMM) 5 kDa kadar olan moleküllere karşı geçirgendir. Fakat MOMP artmasıyla 100 kDa'dan daha büyük proteinler içinde geçirgen hale gelmektedir (Kalkavan ve Green 2018). Mitokondri intermembran bölgesinden sitoplazmaya geçen bir diğer apoptotik faktörler arasında apoptoz tetikleyici faktör (AIF), mitokondri kaynaklı ikinci kaspaz aktivatörü (Smac), düşük pI direkt apoptozis inhibitör bağlayıcı protein (DIABLO) ve Omi/yüksek sıcaklık gereklilik proteini A (HtrA2) bulunmaktadır. Bunlar apoptoz inhibitörleri (IAP) olarak adlandırılan ve kaspaz-3, kaspaz-9 aktivasyonunu engelleyen proteinlerini bağlayıp inhibe ederler (Wong 2011).



Şekil 1.7. İntrinsik apoptoz yolağı ve BCL-2 ailesi proteinlerinin etki mekanizması (Singh, Letai ve ark. 2019)

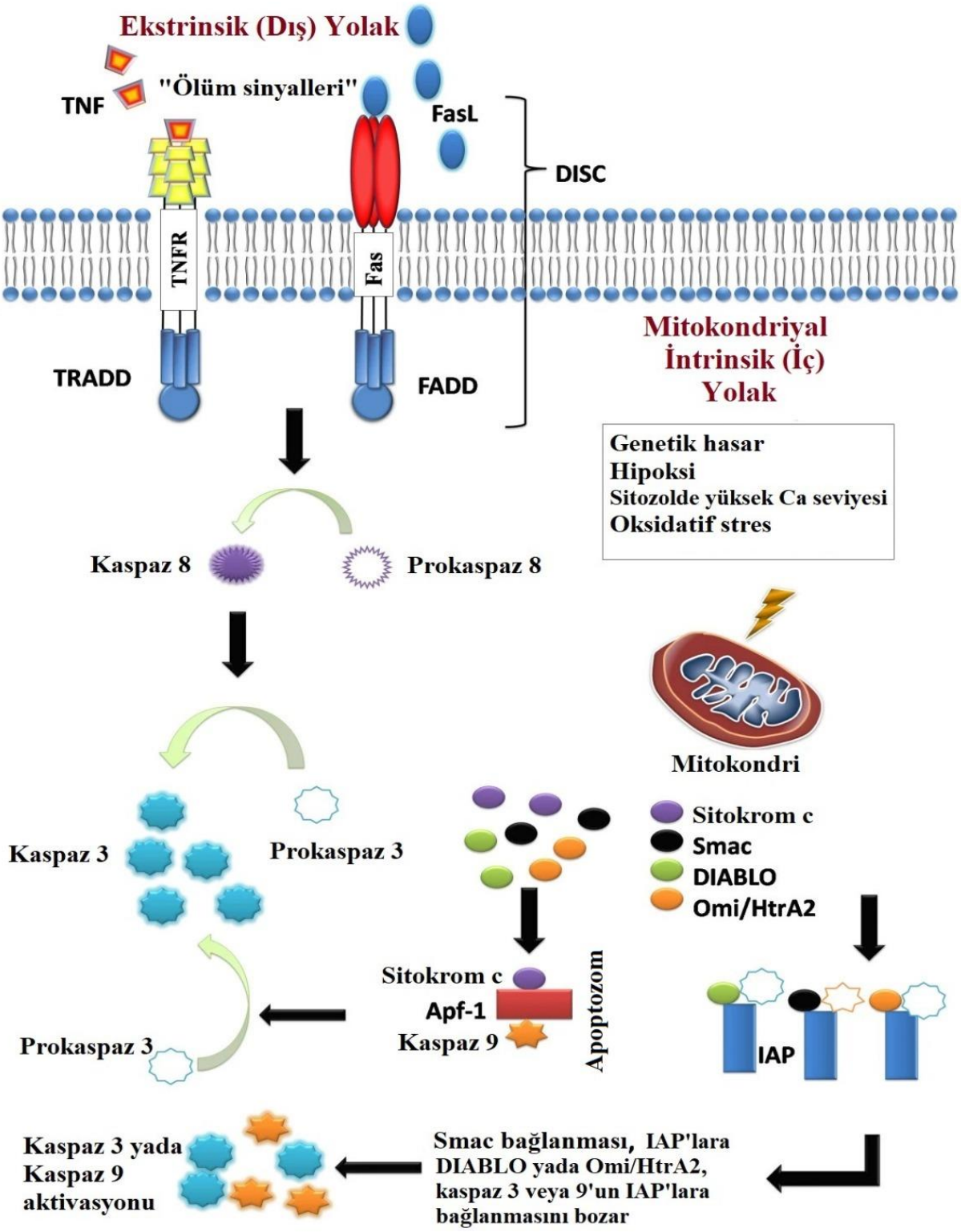
1.4.2.2. Ekstrinsik (Dışsal) Apoptoz Yolağı

Ekstrinsik apoptoz yolağı (ölüm reseptörüne bağımlı), aktive olmuş T lenfositler, doğal katil hücreler (NK, Natural killer) ve makrofajlar gibi bağışıklık hücrelerinde eksprese olan ölüm ligandları, ölüm reseptörlerine (DR, death receptor) bağlandığında aktive olur (Choo, Loh ve ark. 2019). Bu ölüm reseptörleri tümör nekroz faktörü (*TNF, tumor necrosis factor*) gen ailesinin üyelerini barındırmaktadır. *TNF* reseptör ailesinin üyeleri sisteinden zengin ekstrasellüler domain ve protein-protein etkileşim domaini olan ve ölüm domaini (Death Domain: DD) olarak bilinen 80 aminoasitlik domaine sahiptir (Elmore 2007).

En iyi bilinen ölüm reseptörü tip 1 TNF (TNFR1) ve bununla ilişkili olan FAS (CD95) proteinidir. Bunların ligandları sırasıyla tümör nekroz faktör alfa (TNF-α) ve FAS ligandı (FASL) olarak tanımlanmaktadır. *FAS*, tümör nekrozis faktörü reseptörleri gen ailesinin bir üyesi olup *Apo-1* ya da *CD95* olarak da bilinmektedir (Wong 2011).

CD95 (FAS/APO-1), TNFR1, DR3 (APO-3), DR4 (TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand reseptörü 1), DR5 (TRAIL R2) ve DR6 ölüm reseptörleri tanımlanmıştır. Bu ölüm reseptörleri, TNF reseptörü ilişkili ölüm domaini (TRADD), FAS ilişkili ölüm domaini (FADD) ve kaspaz-8 gibi sistein proteazlarını tutan bir hücre içi ölüm domainine sahiptirler (Choo, Loh ve ark. 2019).

FasL, TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL), APO-3/APO-2 ligandı ve TNF-α ölüm ligandaları arasında en çok bilinenlerdir (Pfeffer ve Singh 2018). En iyi karakterize edilmiş ligandlar ve bunların reseptörleri olarak FasL/FasR, TNF-α/TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5 yer almaktadır (Wong 2011). Ekstrinsik apoptoz yolağında en iyi tanımlanan reseptör-ligand ikilileri arasında FasL/FasR ve TNF-α/TNFR1 bulunmakatdır. Ölüm reseptörlerine adaptör protein olarak FADD ve TRADD molekülleri alınır. Bu adaptör proteinlere prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 bağlanarak ölüme neden olan sinyal kompleksini (DISC) oluşturur. Oluşan bu kompleks yapı kaspaz-8 ve kaspaz-10'u aktif hale gelir ve bunlarda cellat kaspazlar olarak adlandırılan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi aktive eder. Aktif hale gelen cellat kaspazlar, hücre ölümüne neden olan proteinlerin ve hücre iskeletinin yıkımına başlamaktadır (Pfeffer ve Singh 2018).



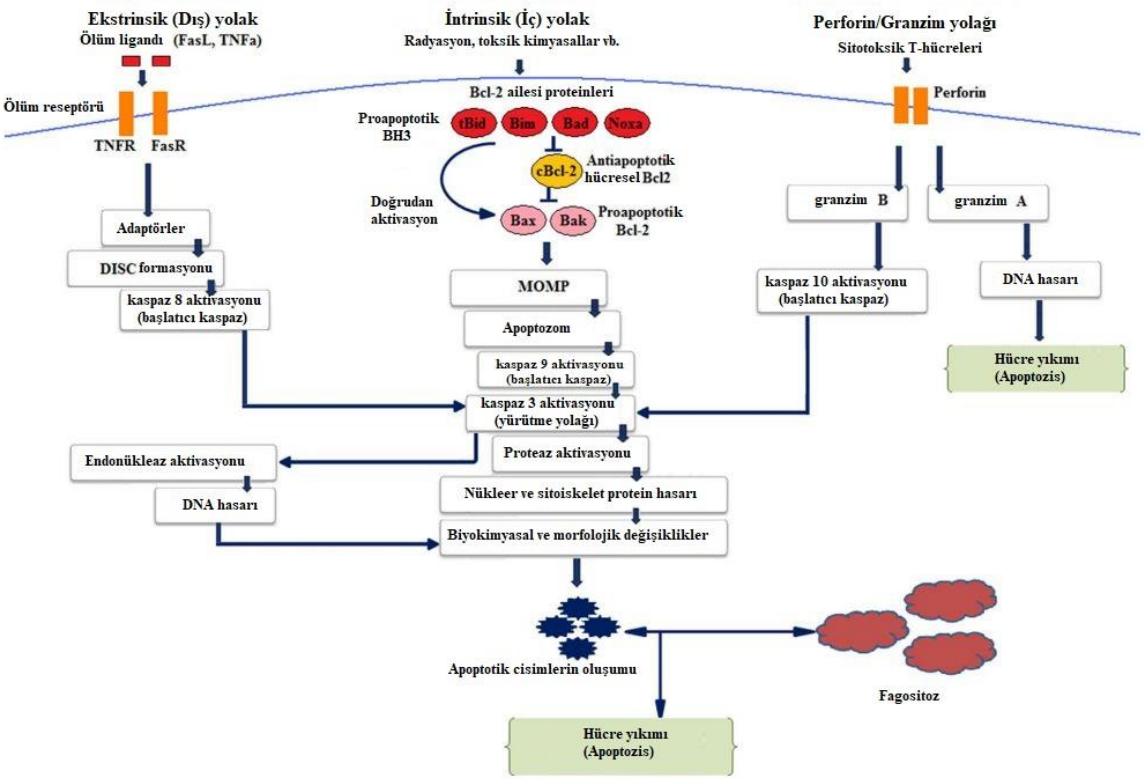
Şekil 1.8. Apoptozun içsel ve dışsal yolakları (Wong 2011)

1.4.2.3. Perforin/Granzim Yolağı

Sitotoksik T lenfositler ve NK hücreleri, granzim A ve B aracılığıyla malign dönüşüm gösteren hücreleri yok ederler. Yok etme işlemini hedef olan hücrenin zarı ile kendisi arasındaki boşluğa sitotoksik serin proteazlar açısından zengin granüller bırakarak yaparlar. İnsan da 5 tip granzim vardır. Bunlar granzim A, B, H, K ve M'dir (Ben Safta, Ziani ve ark. 2015).

Granzim A (GzmA) apoptozu uyaran ve kaspaz bağımsız yolu aktive eden sitotoksik T hücrelerinde de önemli rol oynamaktadır. Hücreye girdikten sonra GzmA, bir tümör süpressör gen ürünü olan DNAaz *NM23-H1* yoluyla DNA nicking'i aktive eder. Nükleozomda toplanan endoplazmik retikulum ilişkili (SET) proteinler, *NM23-H1* genini inhibe etmektedir. GzmA proteaz SET kompleksini parçalar ve bunun sonucuda *NM23-H1*'in inhibisyonunu serbest bırakmaktadır. Apoptotik DNA parçalanmasını başlamış olur (Elmore 2007). GzmA aynı zamanda kaspaz bağımlı apoptotik yolağı uyarır (Martinvalet, Zhu ve ark. 2005).

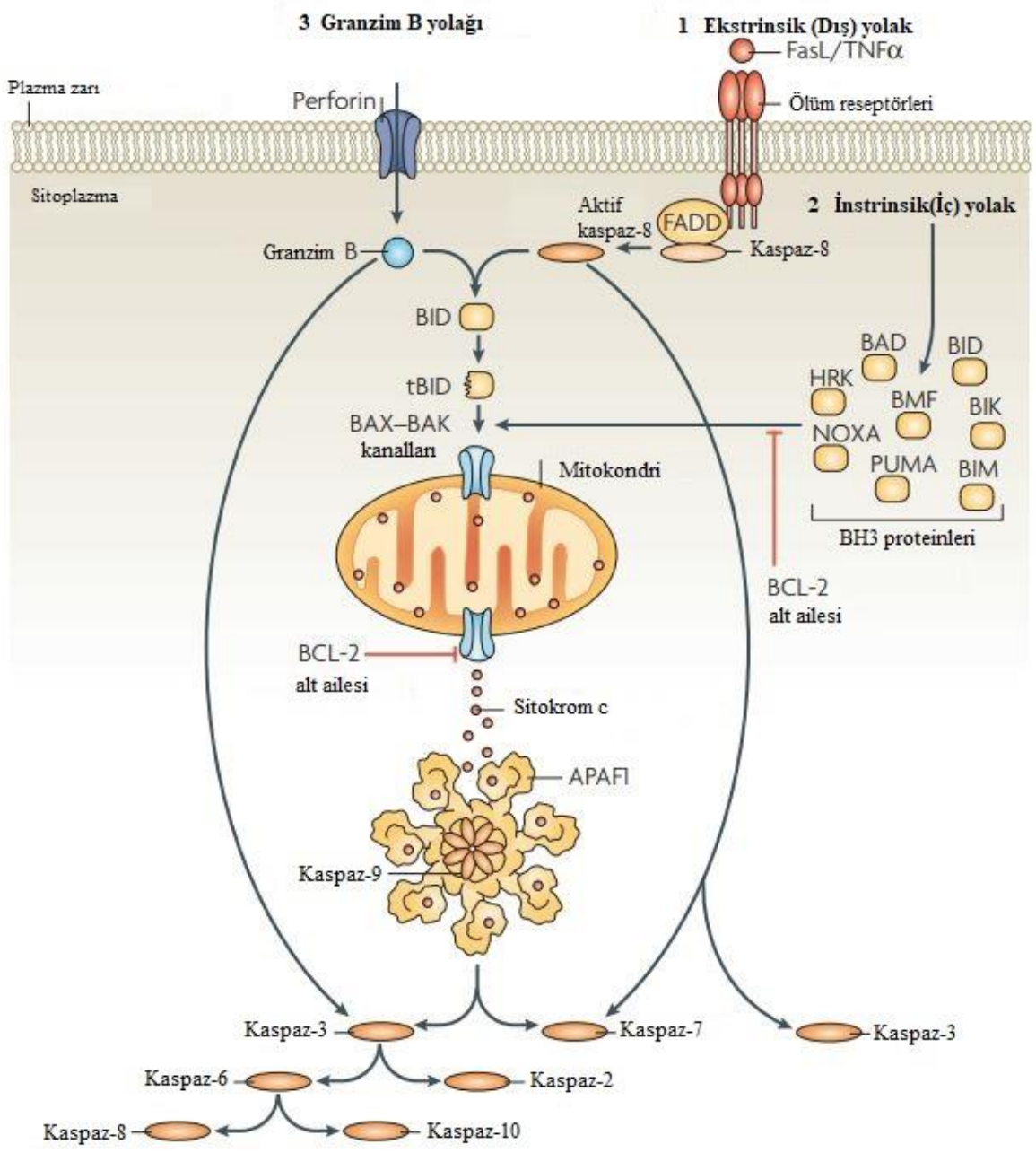
Granzim B (GzmB), proapoptotik proteinler arasında en güçlü olandır. Hücre membranında perforin tarafından gözenekler oluşturulur ve granzim hücreye bu gözeneklerden girmektedir. Sonrasında GzmB, Bcl-2 aile üyesi olan BID'yi bölerek aktif tBID'ye dönüştürür. tBID, sitokrom C'nin mitokondriden sitozole geçişini ve BAK/BAX oligomerizasyonunu kolaylaştırır ve bunun sonucunda apoptozu başlatır (Ben Safta, Ziani ve ark. 2015). GzmB apoptozu başlatmak için BID'nin yanı sıra, kaspaz-3 ve kaspaz-7'yi doğrudan aktive ederek cellat yolağı indükler ve apoptozu başlatır (Kim-Campbell, Gomez ve ark. 2019).



Şekil 1.9. Başlıca apoptotik yolaklar (Siddiqui, Ahad ve ark. 2015)

1.4.3. Kaspazlar

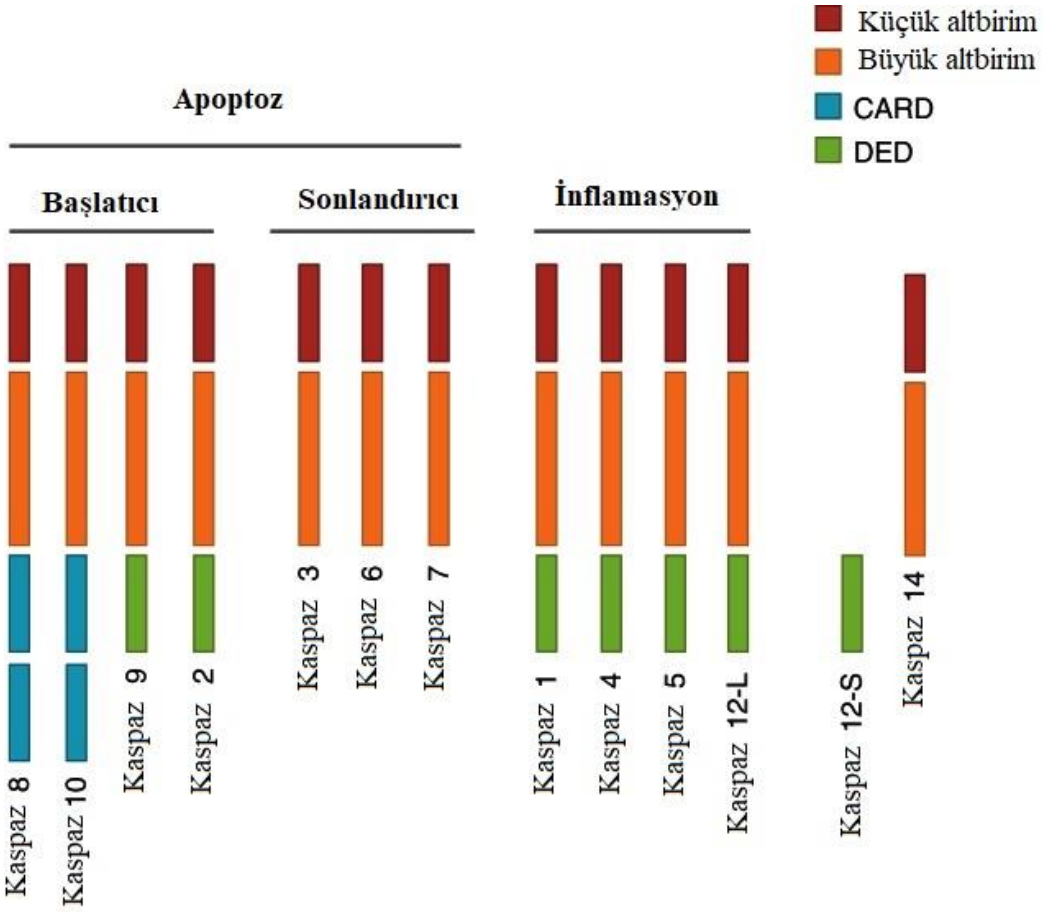
Kaspazlar apoptotik yolaklarda önemli role sahip sistein protezlardır. Kaspaz proteaz ailesinin üyeleri, apoptozun başlatılmasında ve yürütülmesinde önemli roller oynamaktadır (Matsuura, Canfield ve ark. 2016). Apoptozda yer alan kaspazlar kaspaz-2, kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-10'u içeren başlatıcı kaspazlar ve kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi içeren efektör kaspazlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Shi 2002). Başlatıcı kaspazlar, kendi kendilerini aktive edebilir ve bunun için N-terminal (>90 amino asit) pro-alanları içerir. Tüm kaspazlar, katalitik olarak inaktif zimojenler (prokaspaz) olarak hücrelerde bulunur ve apoptoz sırasında proteolitik aktivasyona uğramalıdırlar. Efektör kaspazlar ise, başlatıcı kaspazlar tarafından aktive edilir (Shi 2002). Apoptoz ile ilişkili kaspaz aktivasyonuna giden üç ana yolak mevcuttur. Efektör kaspazlarının aktivasyonu; perforin/granzim yolu ile direkt olarak başlatılabilir (Taylor, Cullen ve ark. 2008).



Şekil 1.10. Kaspaz aktivasyon yolakları (Taylor, Cullen ve ark. 2008)

Başlatıcı kaspazların her birinde prodomain bölgeleri bulunmaktadır. Prodomain bölgeleri katalitik dimerizasyonu kolaylaştımak için kullanılan protein ve protein etkileşim alanlarını kodlamaktadır. Bu alanlar arasında kaspaz-2 ve kaspaz-9'da bulunan kaspaz alım alanı (CARD, caspase recruitment domain) ve kaspaz-8 ve kaspaz-10 da bulunan ölüm efektör bölgesi (DED, death effector domain) bulunmaktadır (McIlwain, Berger ve ark. 2013). Bu etkileşim alanları, her bir kaspaz için aktivasyon bölgesi olaak görev görmektedir. Her bir kaspazın aktivasyon bölgesi kendine özgüdür. Kaspaz-8 ve kaspaz-10 için DISC'i, kaspaz-9

için Apaf-1 apoptozomu ve kaspaz-2 için p53 ile indüklenen ölüm alanı proteinidir (PIDDosome) (McIlwain, Berger ve ark. 2013).



Şekil 1.11. İnsan kaspazlarının alan yapısı (McIlwain, Berger ve ark. 2013)

Kaspaz-8 geni, bir prokaspaz olarak sentezlenen ve DISC kompleksinin oluşumundan sonra ortaya çıkan dışsal yolaktaki ilk aktive kaspaz olan proteini kodlar. Bu noktada aktif kaspaz-8, hangi apoptotik yolun izleneceğini belirlemektedir. Kaspaz-8 protein seviyeleri yüksekse, doğrudan kaspaz-3'ü bölerek daha sonraki işlevini yerine getirir; seviyeler düşükse, sitokrom-c'yi mitokondriden serbest bırakan BID'yi (*tBID*) keserek kaspaz-9'un aktivasyonuna yol açar ve bu da kaspaz-3'ü bölmektedir. Bu nedenle, kaspaz-8'in ana işlevi, özellikle prokaspaz-3 olmak üzere prokaspazların yürütülmesinin aktivasyonu gibi görünmektedir (Cavalcante, Schaan ve ark. 2019).

Kaspaz-9 geni, içsel apoptotik yolaktaki başlatıcı kaspaz olarak görev yapan proteini kodlar. İnaktif formu pokaspaz-9, N-terminal kaspaz alım alanı (CARD), büyük katalitik alt birim ve küçük katalitik alt birim olmak üzere üç farklı bölgeden oluşmaktadır. Konformasyonel değişiklikler, artan konsantrasyon ve kaspaz-9 aktivasyonu için bir platform görevi gören apoptozom oluşumuna yol açmaktadır. Bu proteinin aktif formu, katalitik aktivitesini sürdürmek için apoptozoma bağlı kalması gerekmektedir. Apaf-1 ve prokapaz-9'un konsantrasyonlarının, apoptozomlarda oluşan kaspaz-9 homodimerlerinin ve heterodimerlerin oranını etkilediği görülmektedir. Yani apoptozomlar, kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 gibi kaspazların aktivasyonu ile sonuçlanan homodimerlerin ve heterodimerlerin oluşumu için işlev görmektedir (Cavalcante, Schaan ve ark. 2019).

Kaspaz-3 geni, en önemli efektör kaspaz olarak kabul edilen bir proteini kodlar. Apoptozun yürütme aşamasındaki kaspaz-3, CAD endonükleazı (Kaspaz ile aktive edilen DNaz) inhibitöründen (ICAD, inaktifkaspaz aktive edici DNaz) ayırarak aktive etmektedir. Aktif olan CAD, kromozomal DNA'yı bozar, kromatin yoğunlaşmasına neden olur ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve apoptotik cisimlerde hücre parçalanmasına neden olmaktadır. Kaspaz-3 deregülasyon çalışmaları, kolorektal kanserde, kaspaz-3'ün radyasyona ve kimyasal karsinojenlere maruz kaldıktan sonra tümör invazyonunu ve metastazı teşvik ettiğini göstermektedir. Bu nedenle, kaspaz-3'ün hedeflenmesinin, tümörün kanser tedavisine duyarlılığını artırabileceği ve metastazı inhibe edebileceği öne sürülmüştür (Cavalcante, Schaan ve ark. 2019).

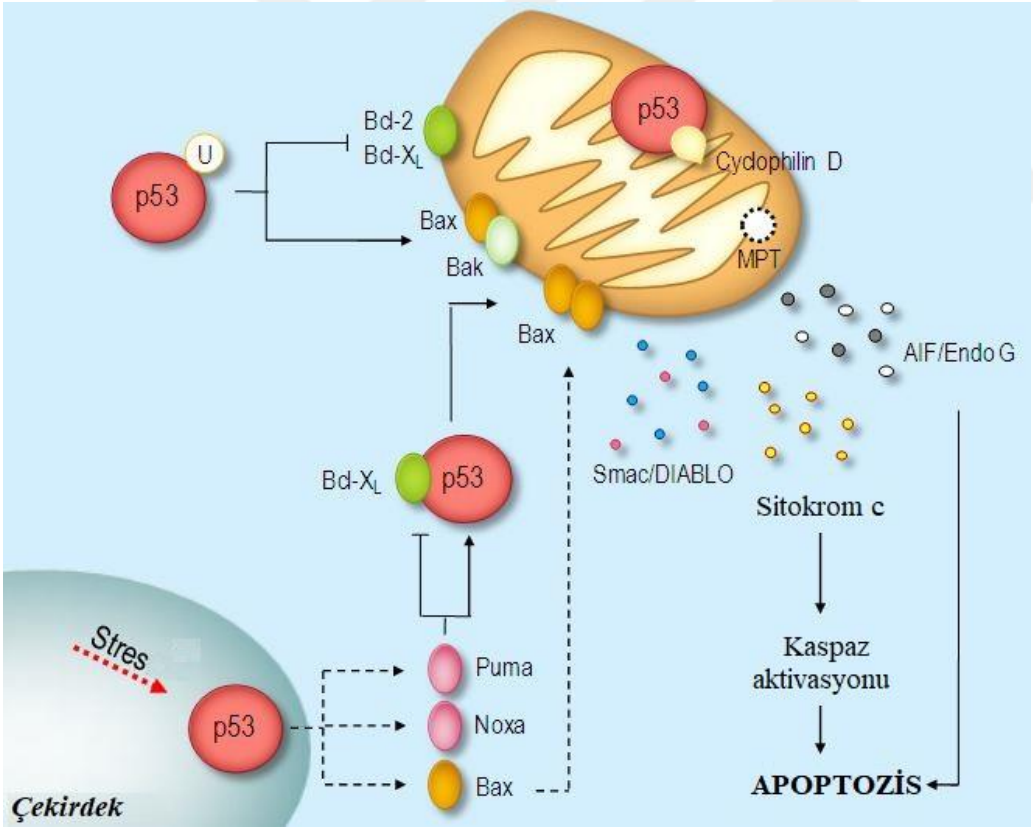
1.4.4. Apoptoz ve *p53* Geni

Kanser, kontrolsüz hücre bölünmesi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla tümör süpresör proteinler, hücre büyümesini kontrol ederek hücrenin onkojenik dönüşümü engellemede önemli bir rol oynamaktadır (Pitolli, Wang ve ark. 2019). Tümör süpressör geni olan *TP53 (Tümör proteini p53)*, hücre ve genomik stabilite, yaşlanma ve hücre ölümünü içeren farklı fonksiyonlara sahipbir transkripsiyon faktörü olan p53 proteinini kodlar. p53 proteini 900'den fazla geni hedefleyerek sadece apoptozu değil, aynı zamanda metabolizmayı, proliferasyonu ve bağışıklık tepkisi genlerini de etkilemektedir (Cavalcante, Schaan ve ark. 2019). *p53*, tüm insan kanserlerinde en sık mutasyona uğrayan gendir (Pitolli, Wang ve ark. 2019).

Tümör süpressör proteini p53, ekstrinsik ve intrinsik yolaklarda transkripsiyondan bağımsız olarak apoptozu indüklediği de gösterilmiştir. P53 protein, FAS'ı indükleyerek ve FAS

promotor bölgelerine bağlanan ve intron 1'de bulunan bir element aracılığıyla apoptozu teşvik ederek ekstrinsik yolağı aktive etmektedir. p53 proteini DNA hasar yolu mekanizmalarıyla, TRAIL için ölüm alanı içeren reseptör olan DR5 aktivasyonunda ve bunun sonucunda kaspaz-8 ve Poli ADP-ribozpolimerazın (PARP) aktivasyonunda da rol oynamaktadır. Bu ilişki kanser tedavisinde potansiyel bir terapötik hedef olmaktadır (Cavalcante, Schaan ve ark. 2019).

p53, yüksek oranda eksprese edildiğinde apoptozu indükleyen intrinsik yolak faktörleri olan NOXA, PUMA ve BID'nin transkripsiyonunu pozitif olarak düzenler. Ayrıca p53, Apaf-1 promotorunu indükleyerek apoptozom oluşumu için önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda sırasıyla hücre stresine ve DNA hasarına yanıt olarak kaspaz-8 ve kaspaz-6'yı aktive etmektedir. p53 proteini, kaspaz-9'u aktive eden ve apoptozun başlamasına neden olan sitokrom C'nin serbest bırakılmasından sorumlu olan mitokondriyal yüzeydeki BAX kanalını tetikleyerek apoptozu teşvik etmektedir (Cavalcante, Schaan ve ark. 2019).



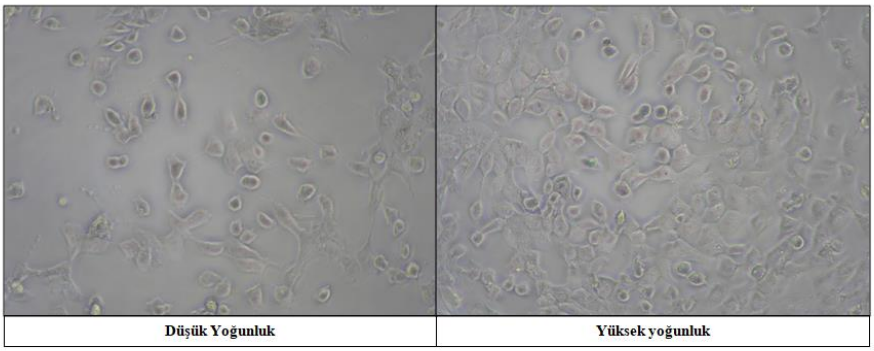
Şekil 1.12. *p53* ve apoptotik yolaklar (Amaral, Xavier ve ark. 2010)

2. MATERYAL VE METOD

2.1. KULLANILAN HÜCRE HATLARI ve ÖZELLIKLERI

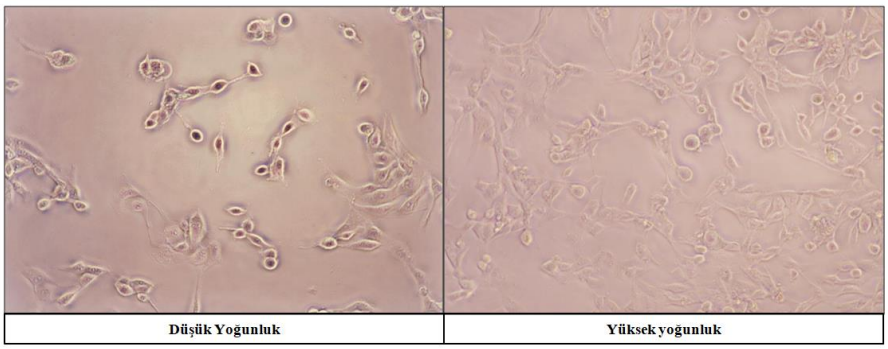
A549 hücre hattı köken olarak ilk defa D.J. Giard ve ekibi ile 1972'de 58 yaşında beyaz bir erkek hastanın tümöründen kanserli akciğer dokusunun çıkarılması ve kültüre edilmesi sonucu gerçekleştirilmiştir (ATCC). Adenokarsinomik insan alveolar bazal epitel hücreleri olan A549 hücreleri kültür kabına in vitro bağlanarak tek bir tabaka halinde yapışmaktadır (Giard, Aaronson ve ark. 1973).

Yapılan bir çalışmada A549 hücre hattının özellikle Tip II pulmoner epitel hücreleri ilaç metabolizması araştırmaları ve transfeksiyon çalışmalarında in vitro ve in vivo olarak kullanılabileceği saptanmıştır (Foster, Oster ve ark. 1998).



Şekil 2.1. A549 hücrelerinin 10x mikroskop görüntüleri

BEAS-2B hücre hattı ilk olarak 1989'da R. R. Reddel ve ekibi tarafından immortalize edilmiştir (ATCC). Bronş epiteli kökenli olup, serumlu ortamda kültüre edildiğinde skuamöz farklılaşma yeteneğini korur. Diferansiyonu ve karsinogenezi indüklemek için ya da biyolojik/kimyasal ajanların diferansiyon ve karsinogenez üzerine etkilerini incelemek için sıklıkla kullanılır (ATCC).



Şekil 2.2. BEAS-2B hücrelerinin 10x mikroskop görüntüleri

2.2. MATERYAL

2.2.1. Kimyasal Maddeler

- PureLink® Genomic DNA Kit, İnvitrogen
- Meridian Bioscience™ SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit
- %0,25 Tripsin-EDTA, Biological Industries
- 1x PBS, Biological Industries
- Taq DNA Polymerase, Thermo Scientific
- Etanol, Sigma
- AmpFLSTR® Identifiler® plus PCR Amplification Kit, Applied Biosystems
- Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems
- GeneScan™-500LIZ™, Applied Biosystems
- RPMI 1640, Biological Industries
- Foetal Bovine Serum, Biological Industries
- Penisilin-Streptomisin (10.000U/ml), Gibco
- L-Glutamin, Gibco
- Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma
- Tripan mavisi, Sigma
- Borik Asit, Sigma
- Trizol, Invitrogen
- Kloroform, Sigma
- 2-propanol, Sigma
- DEPC Water, BIO BASIC
- 1X TE BUFFER, Thermo Scientific
- DreamTaqTM Green PCR Master Mix (2X), Thermo Scientific
- 10x TBE BUFFER, Multicell
- Agaroz, Multicell
- Ethidium Bromide, Merck
- 6x LoadING dye, HIMEDIA
- 100 bp DNA ladder, Hibrigen
- NF Water, BIO BASIC
- Primer, Sentebiolab
- SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit, Meridian Bioscience

2.2.2. Sarf Malzemeler

- Santrifüj tüpleri (1,5 ve 2 mL), Axigen
- PZR tüpleri (0,5 ve 0,2 mL), Axigen
- Serolojik pipet (5-10-25-50 mL), Costar
- Pipet uçları (10-100-200-1000 µl), Axigen
- 25 cm^2 ve 75 cm^2'lik flask, Granier Bio-One
- 5 mL ve 10 mL'lik enjektörler, Genject
- 6 ve 96 kuyucuklu plaka, TPP
- Steril falkontüpleri (15-50 mL), CELLSTAR
- Enjektör filtresi (0,2 mikron), ISOLAB
- Kriyovial tüp 2 mL, NEST
- Thoma lamıneubauer improved, ISOLAB
- xCELLigence 16 well E-plate, Agilent

2.2.3. Cihazlar

- NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific
- SimpliAmp™ Thermal Cycler, Applied Biosystems
- 3500XL Genetic Analyzer, Applied Biosystems
- Elektroforez GÜÇ KAYNAĞI, THERMO SCİENTİFİC
- Corbett Research RG-6000 Real-time PZR Thermocycler Qiagen
- 10 µl, 200 µl ve 1000 µl'lik pipet seti, EPPENDORF
- 200 µl çok kanallı pipet, Brand
- -80°C Buzdolabı, Panasonic
- -20°C Buzdolabı, Bosch
- +4 °C Buzdolabı, Bosch
- CO_2 inkübatörü, Panasonic,
- Inverted mikroskop, Nikon, Eclipse Ts2
- Laminer hava kabini class II, Telstar, Biovanguard
- Santrifüj, Hitachi, CF16RN
- Mikro SANTRİFÜJ, 5418 Eppendorf
- Vorteks, Stuart
- Mikrospin, Cence
- Pipetör, Isolab

- GEN-BOX imagER Mini, ERBİYOTEK
- Hassas Terazi, OHAUS
- Mikrodalga Fırın, ALTUS
- xCELLigence RTCA DP, Agilent

2.3. METOD

2.3.1. Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu

Yapmış olduğumuz deneylerde A549 insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattı ve BEAS-2B normal insan bronşiyal epitel hücre hattı kullanılmıştır. Hücre hatları Prof. Dr. Engin Ulukaya'nın katkılarıyla İstinye Üniversitesi Moleküler Kanser Araştırma Merkezi'nden elde edilmiştir.

Hücre hatları, kanser mekanizmaları da dahil olmak üzere normal ve hastalık biyolojisinin altında yatan mekanizmaları araştırmak için yapılan deneysel çalışmaların temel yapı taşını oluşturmaktadır (Mohammad, Tsai ve ark. 2019). Bilim adamları hücre kültürlerini kullanmaya başladıklarından beri, yaptıkları deneysel araştırmalarda hücre hattının yanlış tanımlanması ile ilgili vakalar ortaya çıkmıştır. Etiketleme hataları, çapraz kontaminasyon ya da kullanılan tekniklerin istenmeyen bir sonucu olarakhücre kültürü yanlış tanımlanabilmektedir. Mevcut olan birkaç DNA profilleme teknolojisinden biri olan kısa tandem tekrar (STR) profilleme, insan hücre hatlarının, kök hücrelerin ve dokuların rutin olarak kimlik tanımlanması için önerilmektedir (Nims, Sykes ve ark. 2010).

2.3.2. DNA İzolasyonu

- Hücre hatlarının DNA izolasyonu İnvitrogen PureLink® Genomic DNA Kit kullanılarak yapıldı.
- Isıtıcı blok 55 ^{0}C' ye ayarlanarak hücreler kaldırıldı.
- Hücreler1.5 ml'lik steril ependorf tüpünde 200 µl 1xPBS eklenerek çözüldü.
- 20'şer µl Proteinaz K ve RNase eklendi. Vortekslenerek iyice homojenize hale gelmesi sağlandı. 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 200 µl Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve homojen karışım elde edilinceye kadar vortekslendi. 55 ^{0}C' de 10 dakika inkübe edildi.

- %96-100'lük etanolden lizata 200 µl eklendi. Homojen karışım elde edilinceye kadar yaklaşık 5 saniye kadar vorteks yapıldı.
- Lizat spin kolona aktarıldı. 10.000 g de 1 dakika 25^0C santrifüjlendi.
- Toplama tüpü değiştirildi. Spin kolona 500 µl Wash Buffer 1 konuldu. 10.000 g de 1 dakika 25^0C santrifüjlenerek toplama tüpü tekrar değiştirildi.
- Spin kolona 500 µl Wash Buffer 2 eklendi. 13.000 rpm de 3 dakika 25^0C santrifüjlendi.
- Spin kolon 1.5 ml'lik steril ependorf tüpüne aktarıldı. 100 µl Genomik Elution Buffer eklenerek oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. 13.000 rpm de 1 dakika 25^0C santrifüjlenerek DNA'nın spin kolondan ayrılarak ependorf tüpüne geçmesi sağlandı.
- Spin kolon atıldı. Ependorf tüpündeki DNA'ların ölçümü NanoDrop cihazı ile yapıldı.

2.3.3. DNA Konsantrasyon ve Saflık Ölçümü

- NanoDrop cihazı (NanoDrop 2000/2000c 1.3.1 Thermo Fisher Scientific) kullanılarak A549 ve BEAS-2B hücrelerinin DNA konsantrasyonu ve saflığı ölçüldü.
- Ölçümün yapılması için öncelikle referans yani blank olarak, içinde nükleik asitlerin olmadığı bir çözeltinin cihaza okutulması gereklidir. Referans çözeltinin amacı spektrofotometrenin ölçüm değerinin daha hassas olmasını sağlamaktır. Referans çözelti olarak DNA'yı içinde çözdüğümüz Genomik Elution Buffer kullanıldı.
- Optik alt yüzey üzerine 1 µl Genomik Elution Buffer eklenerek blank ölçümü alındı.
- Her ölçüm sonrasında optik alt ve üst yüzey temiz bir peçete ile temizlendi.
- NanoDrop cihazında herhangi bir kirlilik olup olmadığını kontrol etmek için 1 µl Genomik Elution Buffer örnek gibi ölçüldü.
- 1 µl DNA optik alt yüzey üzerine dikkatli bir şekilde kabarcık oluşturmadan konuldu ve ölçüm alındı.
- ng/µl değeri, OD 260/280 ve OD 260/230 oranları kaydedilerek, DNA'ların konsantrasyon ve saflık oranları hesaplandı.

2.3.4. DNA Amplifikasyonu ve Elektroforez

Hücre hatlarının DNA STR profillemesinde AmpFlSTR Identifiler Plus PCR Amplification system (Applied Biosystems) kullanıldı. 15 STR lokusu (D8S1179, D21S11, D7S820, CSF1PO, D3S1358, TH01, D13S317, D16S539, D2S1338, D19S433, vWa, TPOX, D18S51, D5S818, FGA) ve Amelogenin bölgesi Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile çoğaltıldı.

İzole edilen DNA'lar 3ng/µl olacak şekilde dilue edildi. PZR bileşenleri Tablo 2.1. deki gibi hazırlandı.

Tablo 2.1. PZR reaksiyon karışımı

Reaktif	**Miktar**
Master Mix	5µl
Primer Set	2,5µl
DNA (3 ng/µl)	2,5 µl

Amplifikasyon işlemi SimpliAmp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems) cihazı kullanılarak Tablo 2.2. deki gibi gerçekleştirildi.

Tablo 2.2. PZR programının aşamaları

Reaksiyon	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü**
Başlangıç Denatürasyon	95°C	11 dakika	
Denatürasyon	94°C	20 saniye	28 döngü
Primer bağlanma	59°C	3 dakika	
Uzama	60°C	10 dakika	
	4°C	∞	

PZR sonunda üretilen amplikonlar GeneScan™-500LIZ™ DNA internal size standardı ve alelik ladder kullanarak kapiller elektroforez (ABI3500xL Genetic Analyzer) ile çözümlenmiştir.

- DNA internal size standardı ve Formamide (ABI) Tablo 2.3.'deki şekilde hazırlandı.
- Çok kısa vorteks yapıldı ve spinlendi.
- 96-kuyucuklu realsiyon plate'nin kuyucuklarına hazırlanan karışımdan 9 µl konuldu ve üzerine 1 µl PZR ürünü ilave edildi.
- Plate septa ile kapatılarak ve PZR ürünlerinin kuyucukların tabanına çökmesi ve hava kabarcıklarının uzaklaşması için kısa bir süre spin edildi.
- Hazırlanan elektroforez karışımı 95°C'de 3 dakika denatürasyona uğradıktan sonra 4°C'de 5 dakika soğutuldu.
- Plate kısa süre spin edildi.
- Örnekler ABI3500xL Genetik Analizör cihazına yüklenerek yürütme başlatıldı.

Tablo 2.3. PZR ürünlerinin kapiller elektroforeze hazırlanması

Reaktif	**Miktar**
Hi-Di™ Formamide	8.7 µl
GeneScan™-500LIZ™	0.3 µl
Toplam	9 µl

Kapiller elektroforez uygulanarak elde edilen verilerin görüntülenmesi, toplanması ve analizi GeneMapper Software 5 (Applied Biosystems) ile gerçekleştirilmiştir.

2.3.5. Besiyerinin Hazırlanması

A549 ve BEAS-2B hücreleri için kullanılan besiyerleri aşağıdaki gibi hazırlandı:

RPMI 1640 besiyerinin içerisine:

- %10 Fetal Bovine Serum (FBS)
- %1 Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10.000 U/ml penisilin, 10 mg/ml streptomisin)
- %1 L-Glutamin

2.3.6. Stoktan Hücre Ekimi

- Sıcak su banyosu 37°C'ye ısıtıldı.
- Stok hücreler -85°C'den alındı ve sıcak su banyosunda 2 dakika çözdürüldü.
- 15 ml'lik falkon tüpüne hazırlanan RPMI 1640 besiyerinden 10 ml konuldu.
- Çözünen hücreler falkon tüpüne aktarıldı. 1100 rpm'de 3 dakika santifüj edildi.
- Süpernatant kısım atılarak hücre pelleti 2 ml besiyeri ile çözüldü.
- 75 cm^2'lik flaskların içine 13 ml besiyeri konuldu ve üzerine 2 ml'lik hücre süspansiyonu ilave edildi.
- Hücrelerin flask içine homojen olarak dağılması için, flask hafif bir şekilde karıştırıldı.
- Hücreler, 37°C'de, %5 CO_2'lik etüvde kültüre edildi.
- 24 saat sonra mikroskopta bakıldı. Hücrelerin canlılıkları ve tutunmaları değerlendirildi.

2.3.7. Besiyeri Değişimi ve Pasajlama

- Besiyeri, 1xPBS ve Tripsin-EDTA 37°C'de sıcak su banyosu ısıtıldı.
- Hücrelere mikroskopta bakılarak, hücre yoğunluğuna göre besiyeri değişimi veya pasaj işlemleri uygulandı.

Besiyeri değişimi;

- Flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı.
- 37°C'de ısıtılmış olan besiyerinden 13 ml eklendi ve hücreler inkübatöre kaldırıldı.

Pasajlama;

%70-80 oranında konfluent olan hücrelerin pasajları aşağıdaki gibi yapıldı.

- Flaskiçerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve flasklar 10 ml 1x PBS ile yıkandı.
- 3-4 ml %0,25 Tripsin-EDTA ilave edilerek hücreler 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda 3-5 dakika inkübe edildi.
- Hücrelerin kalktığı mikroskop ile kontrol edildi. Daha sonra 15 ml besiyeri eklenerek tripsinin etkisi inaktive edildi.
- Flask yüzeyi yıkanarak hücreler toplanarak 15 ml'lik falkon tüpe aktarıldı.
- 1100 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant kısmı atılıp kalan hücre pelleti besiyeri ile çözüldü ve flaska ekildi.

2.3.8. Hücrelerin Stoğa Alınması

Stok (Dondurma) solüsyonu, %5 DMSO olacak şekilde FBS ile hazırlandı ve soğuk olması için buzda veya +4°C soğutuldu.

- Flask içerisindeki besiyeri uzaklaştırıldı ve 10 ml 1x PBS ile yıkandı.
- 4 ml %0,25 Tripsin-EDTA solüsyonu ile hücrelerkaldırıldı.
- 15 ml besiyeri eklendi ve flask yüzeyi birkaç kez yıkanarak hücreler 15 ml falkon tüpe toplandı.
- 1100 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Hücre sayısı ile orantılı şekilde karanlık ortamda stok solüsyonu eklendi.1 ml olacak şekilde kriyovial tüplere aktarıldı.
- Kriyovial tüpler sırasıyla 15 dakika +4°C'de, 30 dakika -20°C'de bekletildi ve hemen akabinde -85°C'ye kaldırıldı.

2.3.9. Hücre Hatlarında Mikoplazma Kontaminasyon Kontrolü

Hücre hatlarında mikoplazmaların tespiti, her hücre kültürü laboratuvarı için zorunludur. Nedeni ise bu bakteriler yaygın kontaminantlardır. Mikoplazmalar çok küçüktür (1 μm'den az) bu nedenle görünür ışık mikroskobu kullanılarak görsel inceleme ile tespit edilemedikleri için hücre kültürlerinde uzun süre fark edilmeden kalabilirler ve hücre deneylerinin saflığının yanı sıra araştırma sonuçlarını da etkiler. (Uphoff ve Drexler 2011) (Wehbe, Vezzalini ve ark. 2018) Mikoplazmalar, morfoloji ve genom boyutu açısından bilinen en küçük kendi kendini kopyalayan organizmalardır. Ayrıca hücre duvarı yoktur ve protein biyosentezini engelleyen yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğundan etkilenmezler (Uphoff ve Drexler 2014).

PZR, hücre kültürlerinde mikoplazma kontaminasyonunun doğrudan tespiti için spesifik bir yöntemdir. Aynı zamanda hızlı ve hassas olan bu yöntem hücre kültürlerinin kontaminasyon durumunu izlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Uphoff ve Drexler 2011).

Hücre hatlarının mikoplazma kontaminasyonu açısından değerlendirilebilmesi için PZR bileşenleri Tablo 2.4.'te yazıldığı gibi hazırlandı.

Tablo 2.4. PZR reaksiyon karışımı

Reaktif	**Miktar**
10X Buffer	5 µl
MgCl2 (50 mM)	1,5 µl
dNTPs (2 mM)	5 µl
Oligo Myc (F)	2,5 µl
Oligo Myc (R)	2,5 µl
Tag (IU)	0,25 µl
DNA	2 µl
Su	31,25 µl
Total	**50 µl**

PZR amplifikasyon aşamaları Tablo 2.5.'e göre hazırlandı.

Tablo 2.5. PZR amplifikasyon aşamaları

Reaksiyon	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü**
Başlangıç Denatürasyon	95°C	5 dakika	
Denatürasyon	94°C	1 dakika	30 döngü
Primer bağlanma	60 °C	1 dakika	
Uzama	72 °C	2 dakika	
Son Uzama	72 °C	10 dakika	
	4°C	∞	

2.3.10. Hücre Sayımı

Hücre kültürü çalışmalarında kuyucuklara eşit sayıda hücre dağılması için hücreler sayılarak ekim yapıldı. Hücre sayımı için aşağıdaki basamaklar izlendi;

- Kültür edilen hücreler 1x PBS ile 2 kez yıkandı ve %0,25'lik Tripsin-EDTA solüsyonu ile flask yüzeyine yapışan hücreler kaldırıldı.
- Kaldırılan hücreler temiz medyumda çözündürülüp karışımın homojenize hale gelmesi sağlandı.
- Hücre sayımı için; Tripan Mavisi boyasından 10 µl ve hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak ependorf tüpünde karıştırıldı.
- Bu karışımdan 10'ar µl alınıp Thoma lamının her iki tarafına (neubauer sayım lamı) konuldu.
- Lamın ortasında bulunan her iki 16 bölmede boyanmamış (canlı) hücreler sayılarak hücre konsantrasyonu ve % canlılık oranları aşağıda verilen formüller ile hesaplandı.

Hücre sayımı için kullanılan formüller:

Hücre konsantrasyonu (hücre/ml) = Sayılan hücre sayısı x 10^4

Canlılık oranı (%) = Sayılan canlı hücre miktarı/Sayılan toplam hücre miktarıx100

2.3.11. Borik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

- Borik asit (Sigma B6768, MW: 61,83 g/Mol) medyum içerisinde çözülerek konsantrasyon 1 M olacak şekilde stok solüsyonu hazırlandı. (12,5 ml medyum içerisinde 0,773 gr borik asit çözüldü ve 0,22 µm'lik enjektör filtresinden geçirildi)
- Hücreler borik asitin 25 µM, 50 µM, 250 µM, 500 µM, 1 mM, 2 mM, 4 mM ve 8 mM konsantrasyonları ile muamele edildi.

Tablo 2.6. Borik asit çözeltisinin hazırlanması

Stok çözelti	Medyum	Konsantrasyon	Final Konsantrasyon
31,25 µl (4 mM'dan)	2468,7 µl	50 µM	25 µM
62,5 µl (4 mM'dan)	2437,5 µl	100 µM	50 µM
3125,5 µl (4 mM'dan)	2187,5 µl	500 µM	250 µM
625 µl (4 mM'dan)	2175 µl	1 mM	500 µM
1250 µl (4 mM'dan)	1250 µl	2 mM	1 mM
20 µl (1 M'dan)	4800 µl	4 mM	2 mM
20 µl (1 M'dan)	2480 µl	8 mM	4 mM
40 µl (1 M'dan)	2460 µl	16 mM	8 mM

2.3.12. xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

xCELLigence; hücre canlılığını, migrasyonu, proliferasyonu, yayılmasını ve çoğalmasını, gerçek zamanlı olarak ölçebilen empedans tabanlı bir biyosensör sistemidir (Stefanowicz-Hajduk, Adamska ve ark. 2016).

Sistemin mekanizması, 16 kuyucuklu E-plaka'nın (E-plate 16) alt yüzeyine yerleştirilen altın kaplama sensör elektrotlarından elektrik empedans okuması prensibinde çalışmaktadır. Empedans okunması, hücreler yüzey elektrotlarına bağlandıkça veya ayrıldıkça değişmektedir. Bu okuma, hücre etkileşimlerinin kalitesinden ve her hücre ile elektrotlar arasındaki yapışma özelliklerinden etkilenmektedir. xCELLigence cihazı yazılımı tarafından dönüştürülmüş olan Hücre İndeksi (CI) empedans değişimini temsil etmektedir (Roshan Moniri, Young ve ark. 2015) (Rakers, Imse ve ark. 2014).



Şekil 2.3. xCELLligence RTCA DP cihazı ve 16 kuyucuklu E-plaka

- xCELLigence gerçek zamanlı hücre analiz sistemi, hücrelere hiçbir işaretleme yapmadan hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonu gibi olayları eş zamanlı olarak ölçüp, analizini gerçekleştirmektedir.
- Bu çalışmada xCELLigence serisinden RTCA-DP cihazı kullanıldı.
- xCELLigence RTCA-DP sistemi içerisinde, bir bilgisayar, sisteme ait özel E plate 16 ve RTCA-DP analizatör bulunmaktadır.
- Mekanizma hücre kültürü 16 kuyucuklu E-plaka'nın tabanına yerleştirilmiş mikroelektrotlar sayesinde elektriksel direnç (empedans) ölçülmektedir.
- 16 kuyucuklu E-plaka'ların her bir kuyucuğunun tabanında altın kaplama mikroelektrot biyosensörleri olduğundan daha etkilidir ve cihazdan elde edilen empedans verisi hücrenin bazı biyolojik durumları (sayı, canlılık, morfoloji, mobilite vb.) ile ilgili bilgi vermektedir.
- Ekilen hücre sayısı plate ve hücre hattına göre değişiklik göstermektedir. Titrasyon deneyi yapılarak uygun hücre sayıları belirlenmektedir.

2.3.13. Hücre Titrasyon Analizleri

- xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analizlerinde, en uygun hücre sayısı ile deneylere başlayabilmek amacıyla A549 ve BEAS-2B hücrelerinin titrasyon analizi yapılmıştır.

- A549 ve BEAS-2B hücre hatlarının çoğalma süreleri farklı olduğundan, E plate'lere farklı sayıda hücrelerekilerek zamana bağlı değişimleri gözlendi.
- Hücreler %70-80 konfluent olduklarında pasajlama protokolüne göre kaldırıldı.
- Tripan Mavisi ile hücre sayımı gerçekleştirildi.
- 16 kuyucuklu E-plaka'nın kuyucuklarına 50 µl medyum ilave edildi. 30 dakika süresince dakikada bir kere empedans ölçecek şekilde background ölçümü yapılarak mikroelektrotların okumaları kontrol edildi.
- Sonrasında 16 kuyucuklu E-plaka cihazdan alındı ve kuyucuklarına 50 µl medyum ilave edildi.
- A549 hücre hattı için her bir kuyucukta 3500, 5000, 6500, 75000 ve 10000 hücre ve BEAS-2B hücre hattı için her bir kuyucukta 5000, 7500, 10000, 15000 ve 20000 hücre olacak şekilde titrasyon deneyleri gerçekleştirildi.
- Belirlenen sayıdaki hücreler üçer tekrarlı olacak şekilde 16 kuyucuklu E-plakalara 100 µl medyum içerisinde ekildi.
- Hücrelerin kuyucukların tabanına çökmesi ve empedansı etkilememesi için 16 kuyucuklu E-plaka 30 dakika inkübatörde bekletildi.
- İnkübasyonun ardından 16 kuyucuklu E-plaka RTCA-DP cihazına yerleştirildi ve cihaz 30 dakikada bir empedans ölçecek şekilde program ayarlandıktan sonra çalıştırıldı.
- Hücrelerin proliferasyonlarındaki farklılıklar, zamana ve sayısına bağlı değişiklikler incelenerek borik asit muamelesi için uygun olan hücre sayısı tespit edildi.

2.3.14. Borik Asit Uygulanması ve Sitotoksisite Testi

- Borik asitin A549 ve BEAS-2B hücre hatları üzerindeki proliferatif ve sitotoksik etkisini gözlemlemek amacıyla xCELLigence RTCA-DP sistemi kullanıldı.
- 16 kuyucuklu E-plaka'nın her kuyucuğuna 100 µl medyum eklenip, background ölçümü yapıldı.

- 16 kuyucuklu E-plaka'ya BEAS-2B hücre hattı için 7500 hücre/well ve A549 hücre hattı için 5000 hücre/well olacak şekilde hücre ekim işlemi yapıldı.
- Ekimden sonra16 kuyucuklu E-plaka'lar 30 dakika inkübatörde bekletildi.
- 16 kuyucuklu E-plaka'lar RTCA-DP sistemine yerleştirildi ve 30 dakikada bir empedans ölçecek şekilde program ayarlandıktan sonra cihaz çalıştırıldı.
- 24 saat sonra program durduruldu ve 16 kuyucuklu E-plaka'lar cihazdan çıkartıldı.
- 100 µl medyum hücrelere zarar vermeden dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- 50 µM, 500 µM, 2 mM, 4 mM ve 8 mM konsantrasyonlarında 100 µl borik asit uygulandı. Kontrol grubuna sadece 100 µl medyum eklendi. Her bir grup için üçer tekrarlı olacak şekilde uygulama yapıldı.
- İlerleyen saatlerde hücrelerin çoğalma eğrileri takip edilerek IC_{50} değeri tespit edildi.

2.3.15. mRNA İfadesinin Belirlenmesi

2.3.15.1. Trizol ile Hücreden RNA İzolasyonu

- 6 kuyucuklu plakalara 1 ml besiyeri konuldu.
- Titrasyon sonucuna göre belirlenen sayılarda hücreler yüzey alanı ile orantılı olacak şekilde ekildi.
- Hücreler 1 ml medyum içerisinde ekildi.
- Ekimden 24 saat sonra 1 ml medyum dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.
- 50 µM, 500 µM, 2 mM, 4 mM ve 8 mM konsantrasyonlarında 1 ml borik asit uygulandı. Kontrol grubuna sadece 1 ml medyum eklendi (Toplam Hacim:2 ml).
- Borik asit uygulamasından 12 saat ve 24 saat sonra RNA izolasyonu yapıldı.
- İzolasyona başlamadan önce mikrosantrifüj soğuması için 20 dakika çalıştırıldı.
- 6 kuyucuklu plakalar'daki medyumun tamamı 15 ml falkon tüpüne toplandı.
- Hücrelere 2 ml 1xPBS eklendi. PBS içindeki hücreler 15 ml falkon tüpüne toplandı.
- Hücrelere 600 µl Trizol ilave edildi.

- Trizol uygulamasından sonra hücrelerin kalkması ve homojenize olması için 7-8 defa pipetaj yapıldı. Tüm lizatlar her kuyucuk içinayrı 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alındı.
- 15 ml falkon tüplerindeki hücreler 1100 rpm'de 3 dakika santrifüjlendi ve hücre pelletinin üzerine 100 µl Trizol eklendi.
- 1,5 ml'lik ependorf tüplerine 150 µl Kloroform ilave edildi ve renk değişimi olana kadar oda sıcaklığında 3-5 dakika ters yüz edildi.
- 4°C 13000 rpm'de 15 dk santrifüjlendi. Sonrasında 3 faz oluşumu kontrol edilerek 1,5 ml'lik ependorf tüpler dikkatli bir şekilde hemen buza kondu.
- RNA içeren üstteki şeffaf kısım, çok dikkatli bir şekilde ortadaki DNA fazına dokunmadan 100 µl'lik pipet ile çekilerek yeni 1,5 ml'lik ependorf tüpe konuldu.
- Üzerine RNA miktarının iki katı kadar olacak şekilde 2-propanol eklendi ve pipetaj ile karıştırıldı. Buz üzerinde 5 dakika inkübe edildi.
- 4°C 13000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi.
- Süpernatant kısım, RNA pelletine zarar verilmeden pipet ile dikkatlice uzaklaştırıldı.
- Yıkama işlemi için %75'lik etanolden 500 µl ilave edildi ve hafifçe ters yüz edildi.
- 4°C 13000 rpm'de 5 dk santrifüjlendi.
- Süpernatant kısım RNA pelletine zarar vermeden dikkatlice uzaklaştırıldı. Etanol'ün uçması için 5-10 dakika buz üzerinde tüplerin kapakları açık olacak şekilde bekletildi.
- RNA pelleti şeffaf bir hal aldıktan sonra, pelletin büyüklüğüne göre 30 ila 50 µl DEPC Water eklendi ve RNA pipetaj ile dikkatlice çözüldü.
- RNA'lar etiketlenerek -85°C'de saklandı.

2.3.15.2. RNA Konsantrasyon ve Saflık Ölçümü

- NanoDrop cihazı (NanoDrop 2000/2000c 1.3.1 Thermo Fisher Scientific) kullanılarak A549 ve BEAS-2B hücrelerinin RNA konsantrasyonu ve saflığı ölçüldü.
- Optik alt yüzey üzerine 1 µl DEPC Treated Water eklenerek blank ölçümü alındı.
- Her ölçüm sonrasında optik alt ve üst yüzey temiz bir peçete ile temizlendi.

- NanoDrop cihazında herhangi bir kirlilik olup olmadığını kontrol etmek için 1 µl DEPC Treated Water örnek gibi ölçüldü.
- 1 µl RNA optik alt yüzey üzerine dikkatli bir şekilde kabarcık oluşturmadan konuldu ve ölçüm alındı.
- ng/µl değeri, $OD_{260/280}$ ve $OD_{260/230}$ oranları kaydedilerek, RNA'ların konsantrasyon ve saflık oranları hesaplandı.
- Ölçümün ardından RNA örnekleri -80°C kaldırıldı.

2.3.15.3. cDNA Sentezi

- İzole edilen RNA'lar Real Time PCR deneylerinde kullanılmak üzere cDNA formuna çevrildi.
- cDNA sentezinde Meridian Bioscience™ SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit kullanıldı.
- İlk olarak kit içerisinde bulunan tüm malzemeler buz üzerinde çözüldü.
- Çözünmüş olan reaktiflere kısa süreli vorteks yapıldı ve spin attırıldı.
- Tüm RNA örnekleri 1 µg'a eşitlendi.
- Tablo 2.7'deki reaktiflerden oluşan tüpler cDNA sentezi için hazırlandı.

Tablo 2.7. cDNA sentezinde kullanılan reaktifler

Reaktif	**Miktar**
Total RNA	1 µg
5x TransAmp Buffer	4µl
Reverse Transkriptaz	1µl
DNase/RNase free-water	Toplam volüm 20 µl'ye tamamlayacak miktarda değişken
Toplam volüm	20 µl

- Hazırlanan karışım pipetajla homojen olana kadar karıştırıldı.

- Sırasıyla 25°C' de 10 dakika, 42°C'de 15 dakika ve 85°C'de 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA'lar -20°C'de muhafaza edildi.

2.3.15.4. *Beta Aktin, BAD, BAX, BCL2, CASP3, CASP8, CASP9, CYCS, FADD* Primerlerinin Dizaynı ve Hazırlanması

- Primerlerin dizaynı, NCBI Primer Blast arayüzü ve SnapGene programı kullanılarak yapıldı. Primerlerin 5'-3' yönündeki dizileri aşağıdaki gibidir:

Beta Actin (ACTB) (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 204 bp

F: TTCCTGGGCATGGAGTCCT

R: AGGAGGAGCAATGATCTTGATC

BAD (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 249 bp

F: CCCAGAGTTTGAGCCGAGTG

R: CCCATCCCTTCGTCGTCCT

BAX (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 172 bp

F: CTGACGGCAACTTCAACTGG

R: CAACCACCCTGGTCTTGGATC

BCL2 (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 254 bp

F: TCATGTGTGTGGAGAGCGTC

R: TCACTTGTGGCCCAGATAGG

CASP3 (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 215 bp

F: CTGGTACAGATGTCGATGCAGC

R: CAGGTCAACAGGTCCATTTGTTC

CASP8 (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 147 bp

F: TCCAAATGCAAACTGGATGATGAC

R: GTCGTTGATTATCTTCAGCAGGC

CASP9 (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 243 bp

F: GACCATGGGTTTGAGGTGG

R: CTGCTCAAAGATGTCGTCCAG

Sitokrom C (CYCS) (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 186 bp

F: CCGCCAATAAGAACAAAGGCATC

R: ATAAGGCAGTGGCCAATTATTACTC

FADD (*Homo sapiens*) mRNA Primer – 233 bp

F: CTCAAGTTCCTATGCCTCGGG

R: GCTGCACACAGGTCTTCTTCC

- Liyofilize haldeki primerleri kullanım kılavuzunda belirtilen miktarda, 1xTE (Tris-EDTA) eklenerek primer konsantrasyonları 100 pmol/ml olacak şekilde stok primerler hazırlandı.
- PCR işleminde kullanılmak üzere stoktan 10 pmol primerler hazırlandı.
- Elde edilen 100 pmol/ml ve 10 pmol'lük primerler -20°C'de saklandı.

2.3.15.5. Gradient PZR ile Primerlerin Bağlanma Sıcaklıklarının Belirlenmesi

- Real Time PZR'da kullanılacak olan primerlerin optimal bağlanma sıcaklıklarını belirlemek amacıyla Gradient PZR çalışması yapıldı. Tablo 2.9'daki reaktifler kullanılarak gradient PZR yapıldı.
- BEAS-2B ve A549 hücrelerinden elde edilen yüksek miktarda ve iyi kalitedeki RNA'lardan sentezlenmiş cDNA kullanıldı.

Tablo 2.8. Gradient PZR için kullanılan bileşikler

Reaktif	**Miktar**
Forward Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol)	1 µl
2x Master mix	16 µl
cDNA	2 µl

- Gradient PZR, SimpliAmp^{TM} Thermal Cycler, Applied Biosystems cihazı kullanılarak Tablo 2.10'daki aşamalara göre yapıldı.

Tablo 2.9. Gradiyent PZR aşamaları

Reaksiyon	**Sıcaklık**	**Süre**	**Döngü**
Başlangıç Denatürasyon	95°C	5 dakika	
Denatürasyon	95°C	30 saniye	36 döngü
Primer bağlanma	58-64°C	30 saniye	
Uzama	72°C	30 saniye	
Son Uzama	72°C	5 dakika	
	4°C	∞	

2.3.15.6. Agaroz Jel Elektroforezi

- PZR çalışması sonrasında amplifiye edilen ürünü görüntüsünün incelenmesi için agaroz jel elektroforezi yapıldı.
- Jel hazırlama, PZR ürünlerinin jele yüklenmesi ve yürütülmesi, yürütülen jellerin UV ışık altında incelenmesi sırasıyla elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

2.3.15.6.1. Agaroz Jel Hazırlanması

- Agaroz jel elektroforez işleminde jelin hazırlanmasında ve jelin yürütüleceği tank içerisine dökmek için tampon çözelti olarak 1xTBE (Tris Borik Asit EDTA) tamponu hazırlandı.
- %2'lik agaroz jel hazırlamak için 2 gr agaroz tartılıp 100 mL 1xTBE tamponu içerisine eklenerek çözdürüldü.
- Karışım mikrodalga fırında ısıtılarak homojen hale gelmesi sağlandı.
- Karışım soğuduktan sonra üzerine 2 mg/ml etidyum bromür 2 µl eklenerek 10 saniye karıştırıldı.
- Karışım jel kasetlerine hava kabarcığı olmamasına dikkat ederek döküldü. Taraklar takılarak 30 dakika boyunca jelin donması beklendi.

2.3.15.6.2. PZR Ürünlerinin Jele Yüklenmesi ve Yürütülmesi

- Donan jeller üzerinden taraklar jele zarar verilmeden dikkatlice yerinden çıkarıldı.
- Agaroz jel, üzerinde bulundukları kasetleri beraber elektroforez tankına yerleştirildi. Üzerine 1xTBE tamponu ilave edildi.
- İlk kuyucuğa yüklenen Hibrigen 100 bç'lik DNA ladder marker yüklendi.
- Örnekler ise 1 µl 6xLoadING dye ve 5 µl PZR ürünü olacak şekilde parafilm üzerinde karıştırılarak kuyucuklara yüklendi.
- Elektroforez tankı güç kaynağına bağlanarak 125 Volt'luk sabit akımda 15 dakika boyunca yürütme işleme yapıldı.

2.3.15.6.3. Jellerin UV Işık Altında İncelenmesi

- Yürütme işlemi tamamlanmış olan jeller kasetlerinden ayrılarak UV transillüminatör cihazına yerleştirildi ve gerekli ayarlamalar yapıldı.
- Çoğaltılan hedef DNA'ların 302 nm dalga boyundaki UV ışıkaltında görüntüleri kaydedildi.

2.3.15.7. Kantitatif Real Time RT-PZR

- A549 hücre hattından elde edilen cDNA'lar ve çalışmada kullanılan her bir gen için Real-Time PZR reaksiyon karışımı Tablo 2.10'a göre hazırlandı.

Tablo 2.10. Real Time PZR reaksiyon karışımı

Reaktif	**Miktar**
2X SYBR Green Reaksiyon Karışımı	10µl
Forward Primer (10 pmol)	1 µl
Reverse Primer (10 pmol)	1µl
cDNA	3µl
Nükleaz free su	5µl
Toplam Miktar	**20 µl**

- Real Time PZR amplifikasyonu Tablo 2.11'deki program koşullarına göre, "Corbett Research RG-6000 Real-time PZR Thermocycler Qiagen Roto-Gene Q" cihazı kullanılarak yapıldı.

Tablo 2.11. Real Time PZR aşamaları

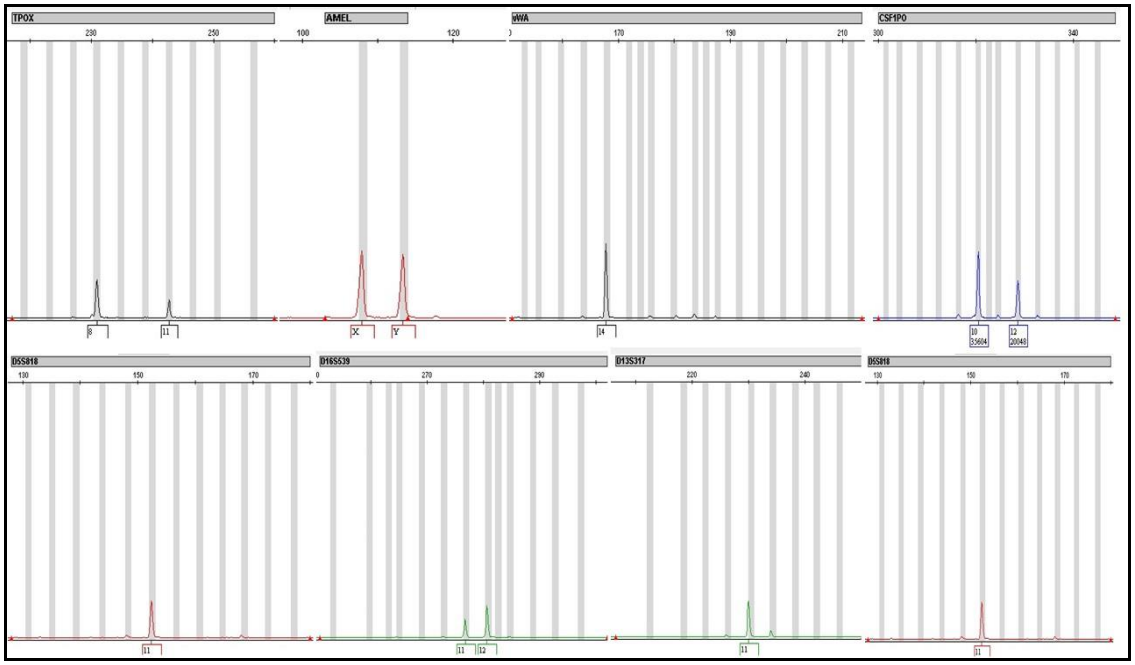
Adım	**Döngü**	**Sıcaklık**	**Süre**
1	1	95	2 dakika
2	40	95	5 saniye
		60	10 saniye
		72	20 saniye
3	1	72-95	5 saniye

- Sonuçlar Rotor-Gene Q Software 2.3.1.49 programında analiz edildi.

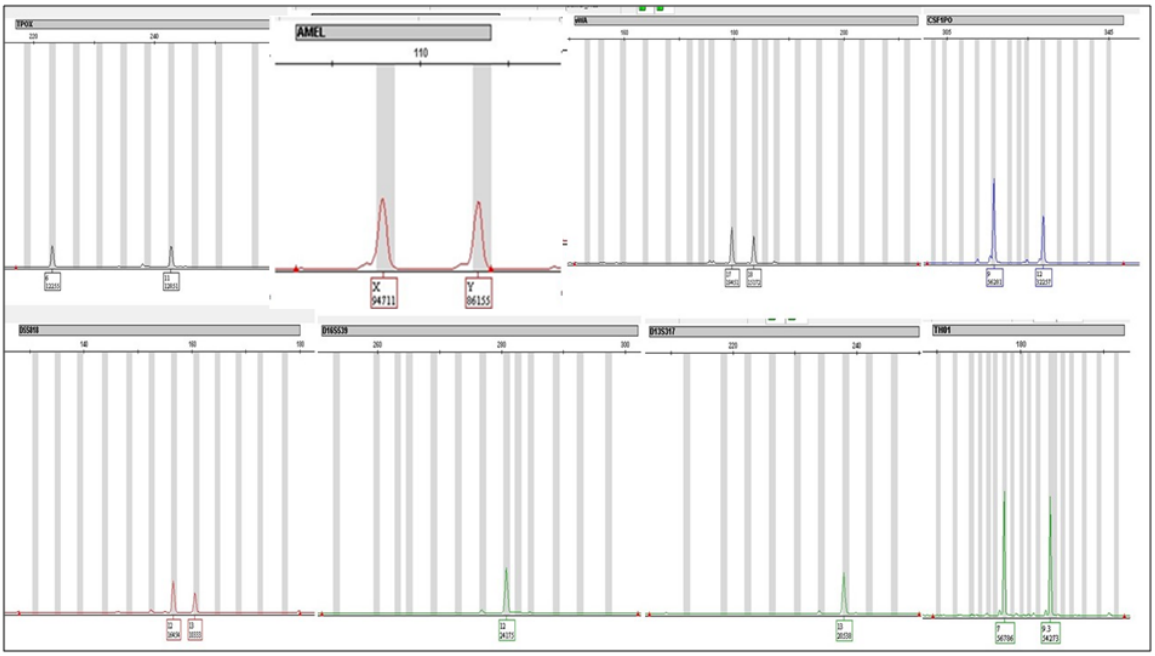
3. BULGULAR

3.1. Hücre Karakterizasyon Sonuçları

BEAS-2B ve A549 hücre hatlarının STR profilleri ATCC'ki verilerle benzer bulundu. Sonuçlar Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Tablo 3.1, Tablo 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. A549 hücre hattının elektroferogram görüntüsü



Şekil 3.2. BEAS-2B hücre hattının elektroferogram görüntüsü

Tablo 3.1. A549 hücre hattı STR profili

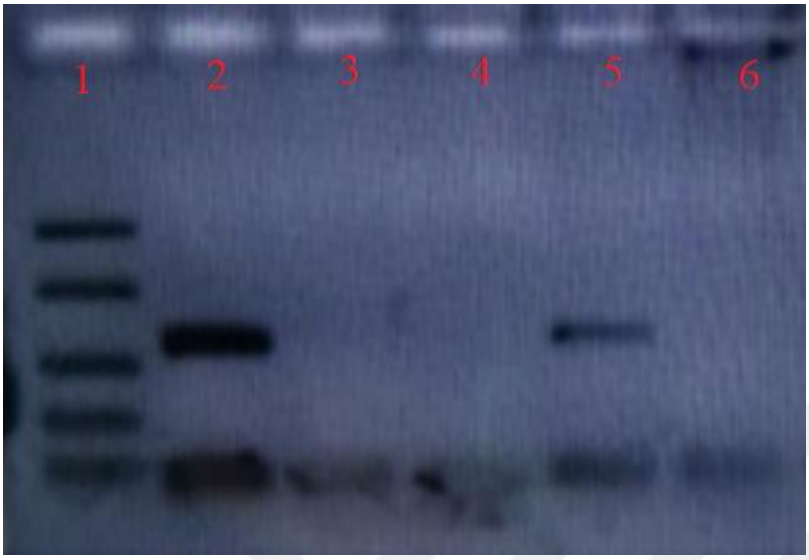
	A549
Amelogenin	X, Y
CSF1PO	10,12
D13S317	11
D16S539	11,12
D5S818	11
TH01	8,9.3
TPOX	8,11
vWA	14

Tablo 3.2. BEAS-2B hücre hattı STR profili

	BEAS-2B
Amelogenin	X, Y
CSF1PO	9,12
D13S317	13
D16S539	12
D5S818	12,13
TH01	7,9.3
TPOX	6,11
vWA	17,18

3.2. Mikoplazma Kontaminasyonu PZR Sonuçları

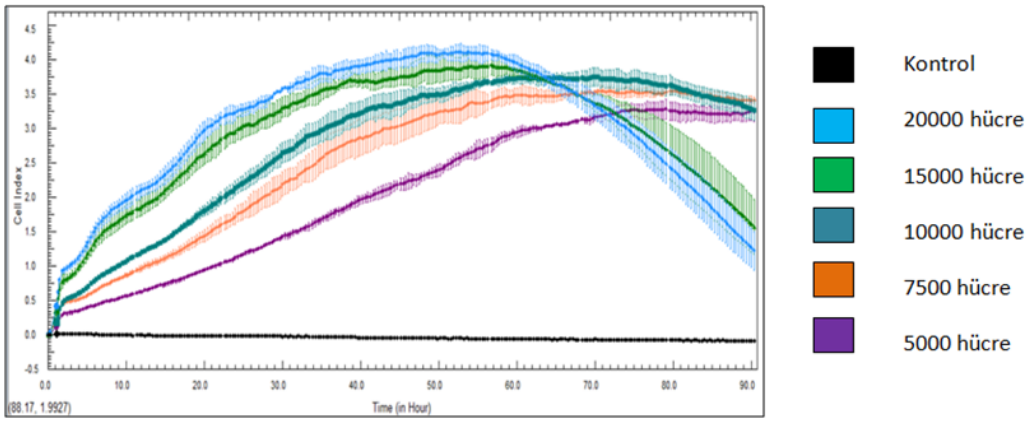
Mikoplazma kontaminasyonu PZR sonrası %2'lik agaroz jel elektroforezi ile tespit edildi. 434-468 bp arasındaki PZR ürünleri mikoplazma kontaminasyonunun varlığını göstermiştir.



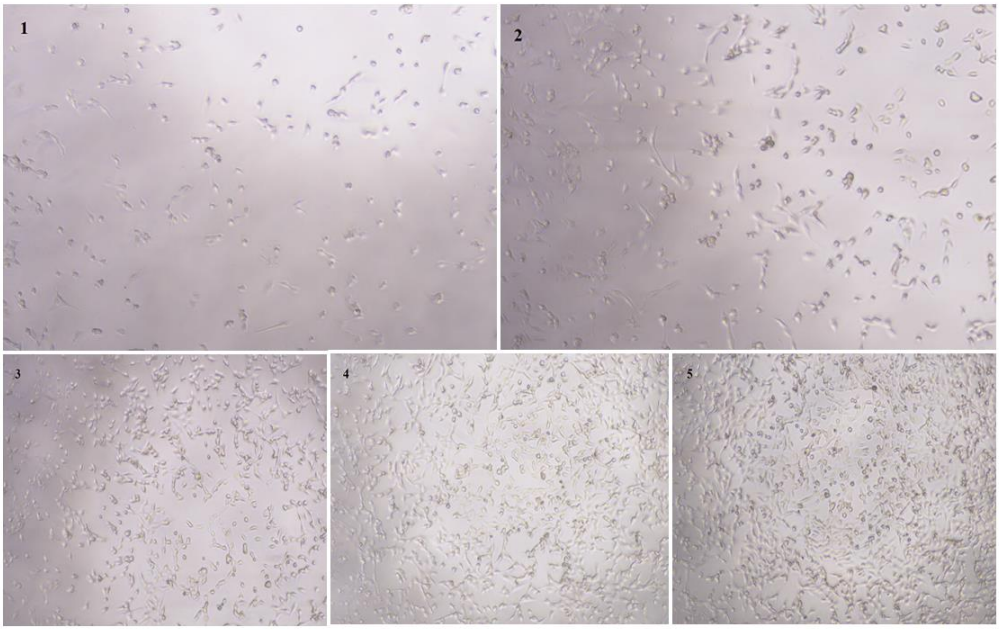
Şekil 3.3. Mikoplazma PZR reaksiyonuna ait agaroz jel elektroforez görüntüsü [1. Marker 2. Pozitif kontrol 3. A549 hücre hattı 4. BEAS-2B hücre hattı 5. Pozitif kontrol ve 6. Negatif kontrol (su)]

3.3. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi (xCELLigence) Hücre Titrasyon Deneyi Sonuçları

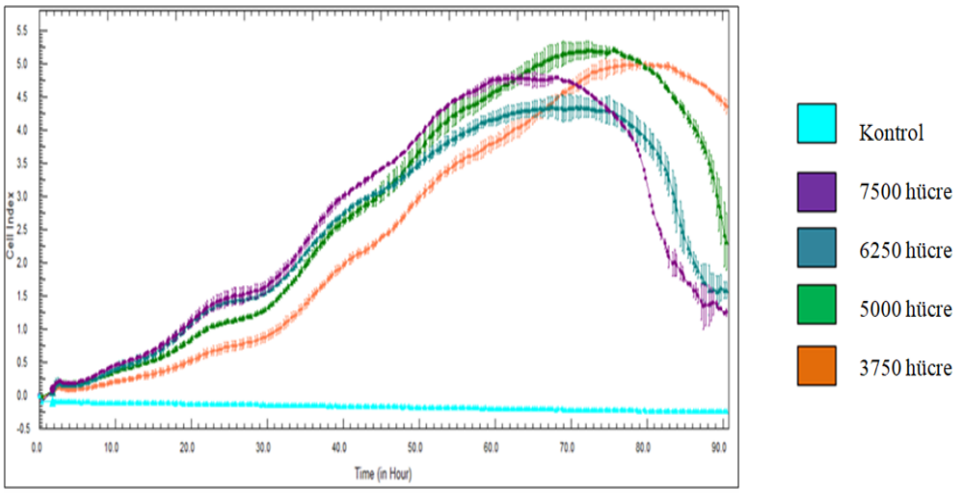
Hücre proliferasyonu yaklaşık olarak 90 saat izlendi. Borik asit uygulamasında BEAS-2B hücre hattı için hücre sayısı 5000/well; A549 hücre hattı için hücre sayısı 7500/well olarak tespit edildi (Şekil 3.4 ve Şekil 3.6). Hücreler eş zamanlı olarak mikroskopta da incelendi (Şekil 3.5 ve Şekil 3.7).



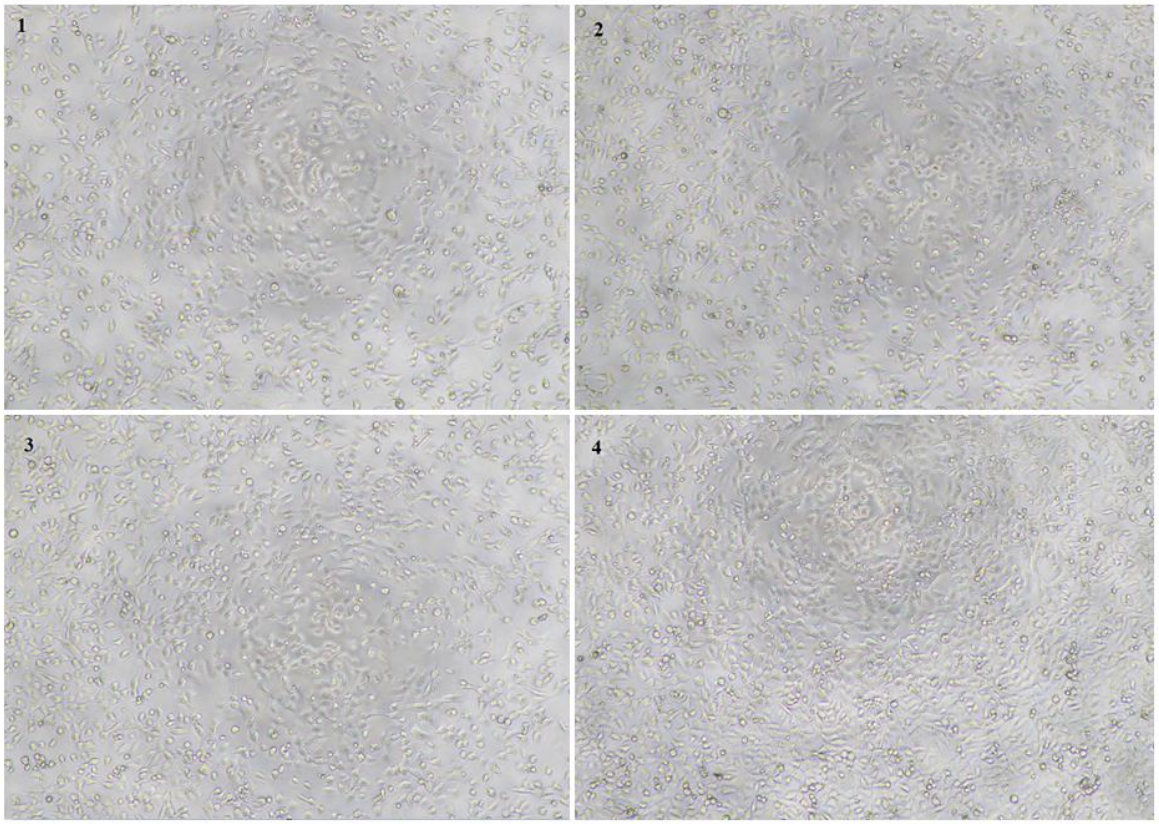
Şekil 3.4. BEAS-2B hücre hattının titrasyon deneyleri sonucu cell index ve zamana bağlı görüntüsü *Kontrol grubunda sadece medyum bulunmaktadır.



Şekil 3.5. BEAS-2B hücre hattı 24. saatteki 4x mikroskop görüntüleri (1'den 5'e kadar sırasıyla 5000, 7500, 10000, 15000, 20000 hücre)

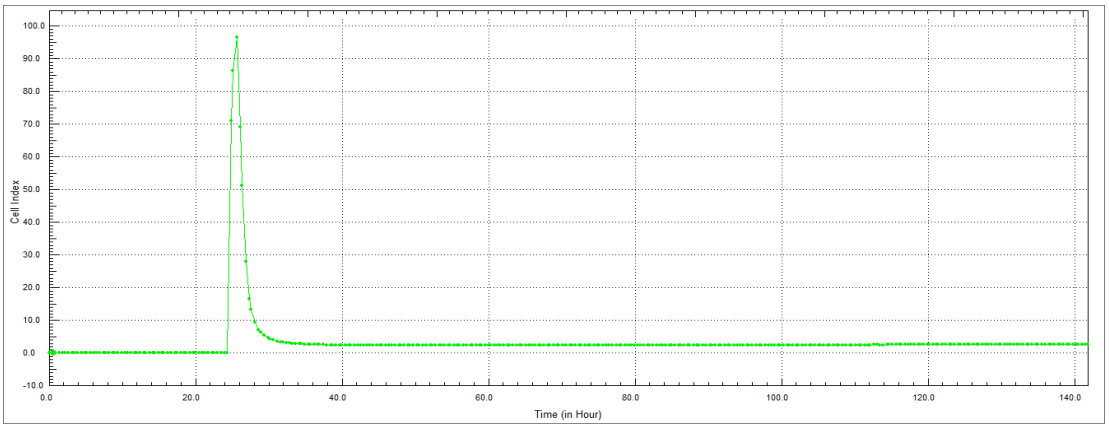


Şekil 3.6. A549 hücre hattının titrasyon deneyleri sonucu cell index ve zamana bağlı görüntüsü *Kontrol grubunda sadece medyum bulunmaktadır.



Şekil 3.7. A549 hücre hattı 24.saatteki 4x mikroskop görüntüleri (1'den 4'e kadar sırasıyla 5000, 7500, 10000, 15000 hücre)

Borik asit uygulaması için uygun hücre sayısının seçiminde, hücrelerin mikroskop görüntüleri, 24. saatteki hücre (cell) indeksi ve plato fazının süresi değerledirmeye alındı.

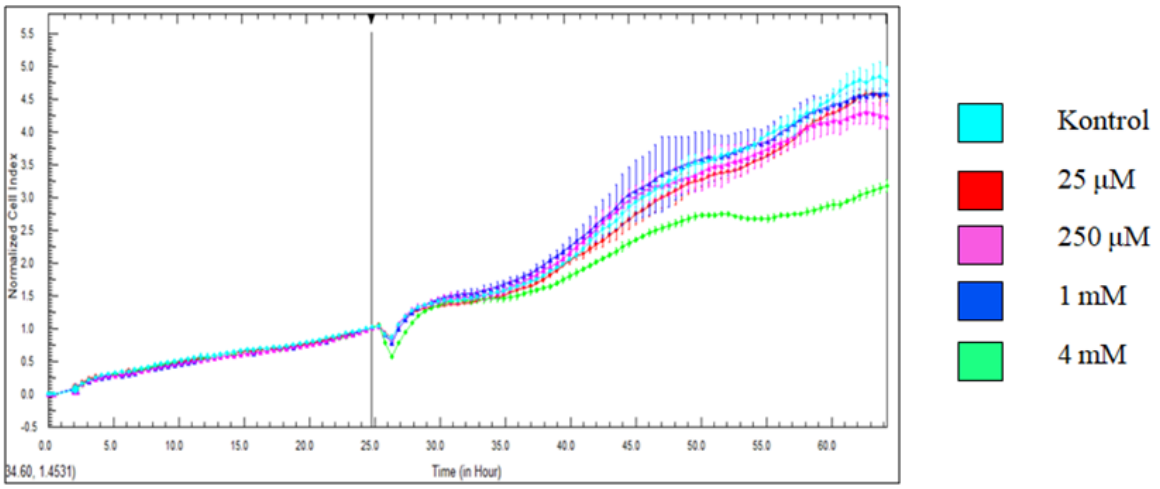


Şekil 3.8. xCELLigence sisteminde borik asit'in ışıma verip vermediğinin kontrolü

Borik asit'in xCELLigence sisteminde herhangi bir ışıma verip vermediği kontrol edildikten sonra borik asit uygulamasına geçildi. E-plate'lere hücre ekimi yapılmadan medyum birlikte borik asit çözeltisi eklendi ve yukarıda da görüldüğü gibi borik asit hiçbir ışıma vermediği gözlendi.

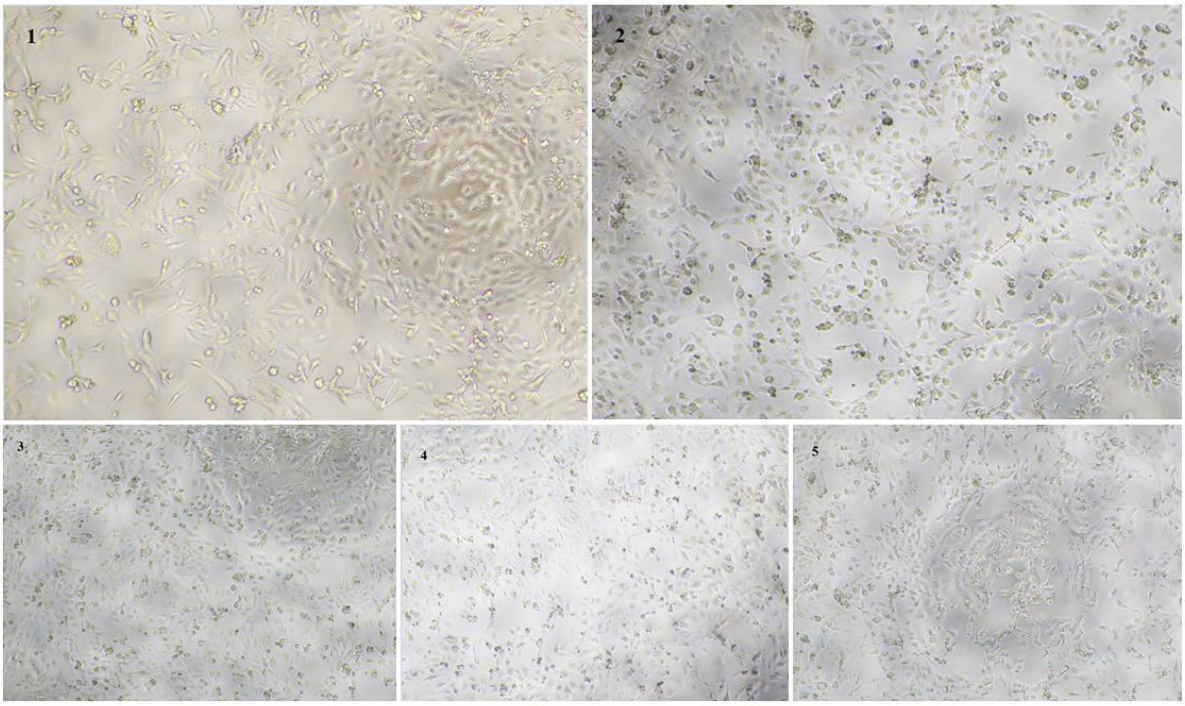
3.4. Borik Asitin A549 ve BEAS-2B Hücre Hattı Proliferayonu Üzerinde Etkisinin Sonucu

BEAS-2B hücre hattı için yapılan hücre titrasyon deney sonucuna göre 5000 hücre/well sayısının uygun olduğunu tespit ettik. 24. saatte borik asit uyguladıktan sonra gerçek zamanlı hücre analizi gerçekleştirildi.



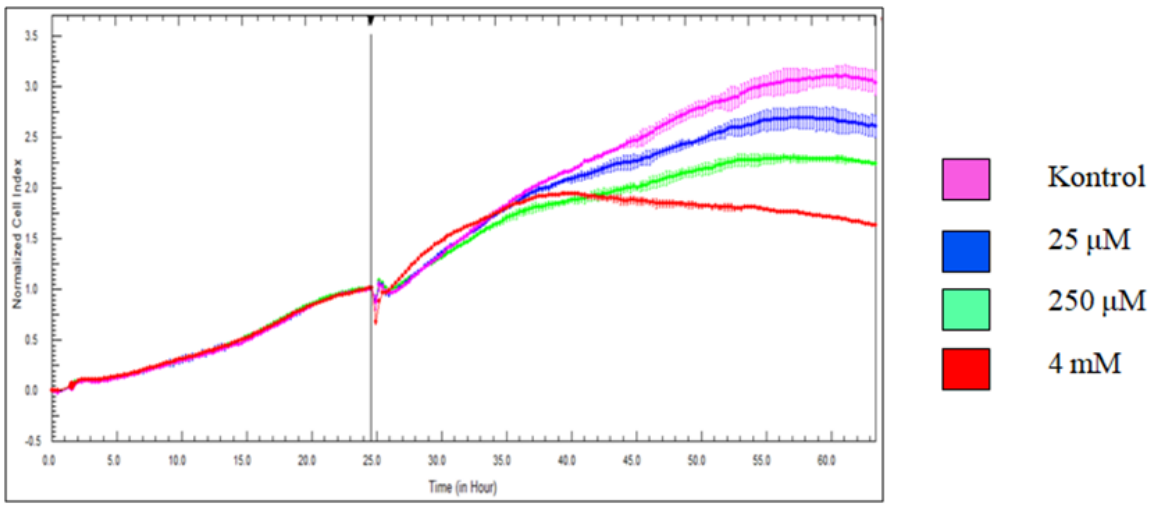
Şekil 3.9. BEAS-2B hücre hattı için yapılan proliferasyon deney grafiği

BEAS-2B hücre hattı için E-plate ile yapılan borik asit uygulaması proliferasyon deney grafiğinde, her renk farklı dozdaki borik asiti ifade etmektedir.



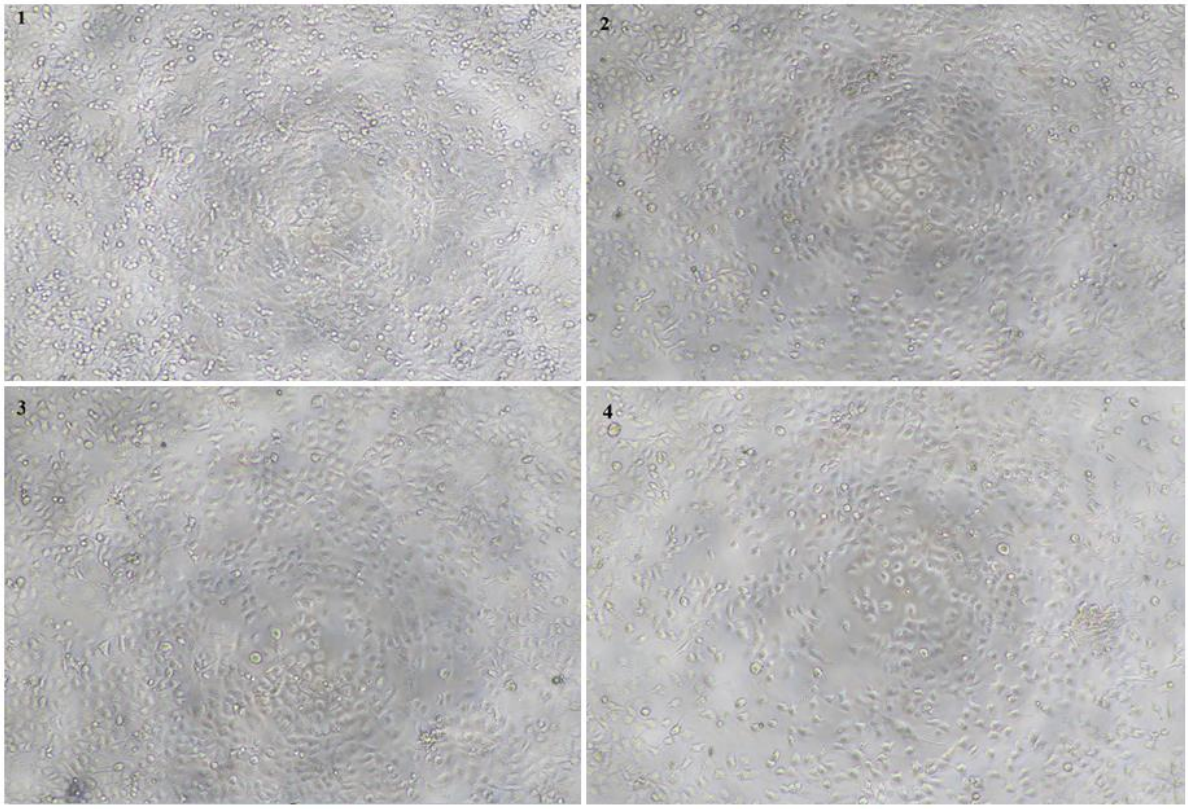
Şekil 3.10. BEAS-2B hücre hattında borik asit muamelesinden sonra 24. saatteki 4x mikroskop görüntüleri (1'den 5'e kadar sırasıyla Kontrol, 25 µM, 250 µM, 1 mM, 4mM)

A549 hücre hattı için yapılan hücre titrasyon deney sonucuna göre ise 7500 hücre/well uygun olduğunu tespit edildi. 24. saatte borik asit uyguladıktan sonra gerçek zamanlı hücre analizi gerçekleştirildi.



Şekil 3.11. A549 hücre hattı için yapılan proliferasyon deney grafiği

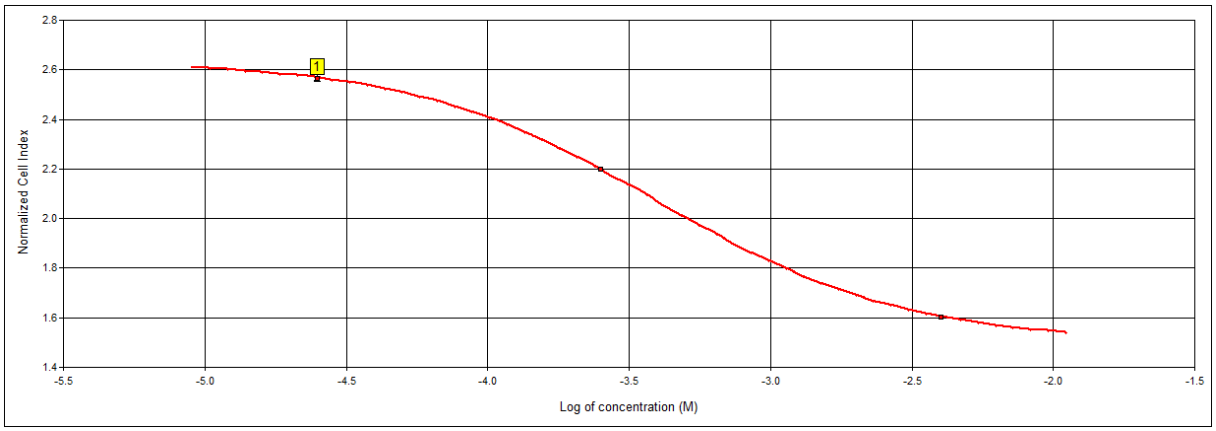
A549 hücre hattında borik asitin farklı konsantrasyonlarındaki etkisi gözlemlenmiştir. Deney grafiğine bakıldığında uygulanan borik asit dozu arttıkça hücre sayısının (proliferasyonun) azaldığı görülmektedir.



Şekil 3.12. A549 hücre hattında borik asit muamelesinden sonra 48. saatteki 4x mikroskop görüntüleri (1'den 4'e kadar sırasıyla Kontrol, 25 µM, 250 µM, 4 mM)

3.5. IC_{50} Değerinin Belirlenmesi

Borik asitin etkili olduğu doz değeri bulmak için xCELLigence cihaznın RTCA Software Version 2.0 kullanılarak IC_{50} değeri hesaplandı. Oluşan grafik sonucu IC_{50} değeri 400 µM olarak belirlendi.



Şekil 3.13. xCELLigence cihazı ile IC_{50} değerinin hesaplanması

3.6. RNA İzolasyon Sonuçları

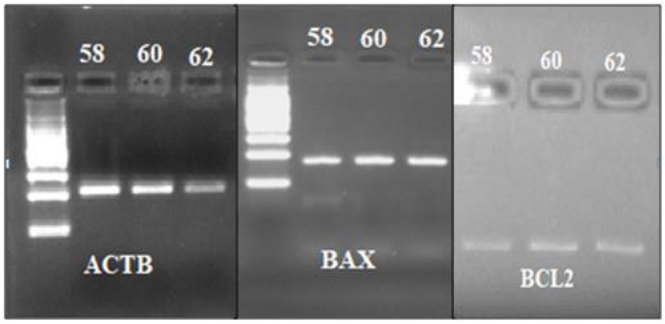
Hem kontrol gruplarından hem de borik asit uygulanmış gruplardan, 12 ve 24 saat sonunda RNA izolasyonu yapılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonu yapılan A549 ve BEAS-2B hücre hatlarının konsantrasyon ve OD değerleri Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3. İzole edilen RNA konsantrasyonları ve OD değerleri

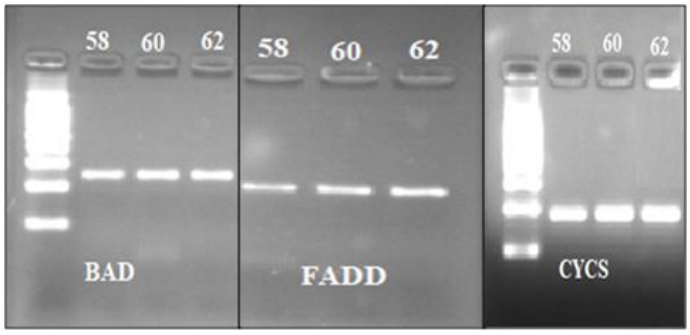
	Nükleik Asit (RNA) Değeri (ng/µl)	**OD 260\280**
A549-12H-50 µM	615	2.12
A549-12H-500 µM	538	2.08
A549-12H-2 mM	582	2.11
A549-12H-4 mM	506	2.10
A549-12H-8 mM	503	2.10
A549-12H-Kontrol	463	2.09
A549-24H-50 µM	632	2.12
A549-24H-500 µM	610	2.10
A549-24H-2 mM	601	2.12
A549-24H-4 mM	531	2.08
A549-24H-8 mM	512	2.10
A549-24H-Kontrol	499	2.10

3.7. Gradiyent PZR Bulguları

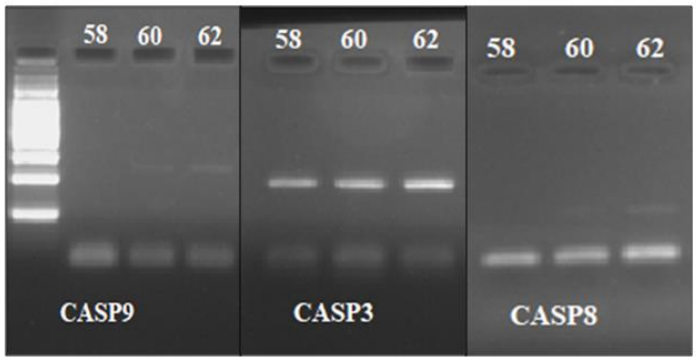
ACTB, *BAX*, *BAD*, *BCL2*, *CASP3*, *CAPS8*, *CASP9*, *CYCS* ve *FADD* genleri için 58-60-62°C sıcaklıklarda gradiyent PZR kuruldu. Gradiyent PZR sonrası ürünler jele yüklenerek bant görüntüleri elde edildi. Gradiyent PZR agaroz jel görüntüsü sonucu tüm genler için çalışma sıcaklığı 60°C karar verildi (Şekil 3.14, 3.15 ve Şekil 3.16).



Şekil 3.14. *ACTB, BAX, BCL2* genlerine ait jel görüntüleri



Şekil 3.15. *BAD, FADD, CYCS* genlerine ait jel görüntüleri

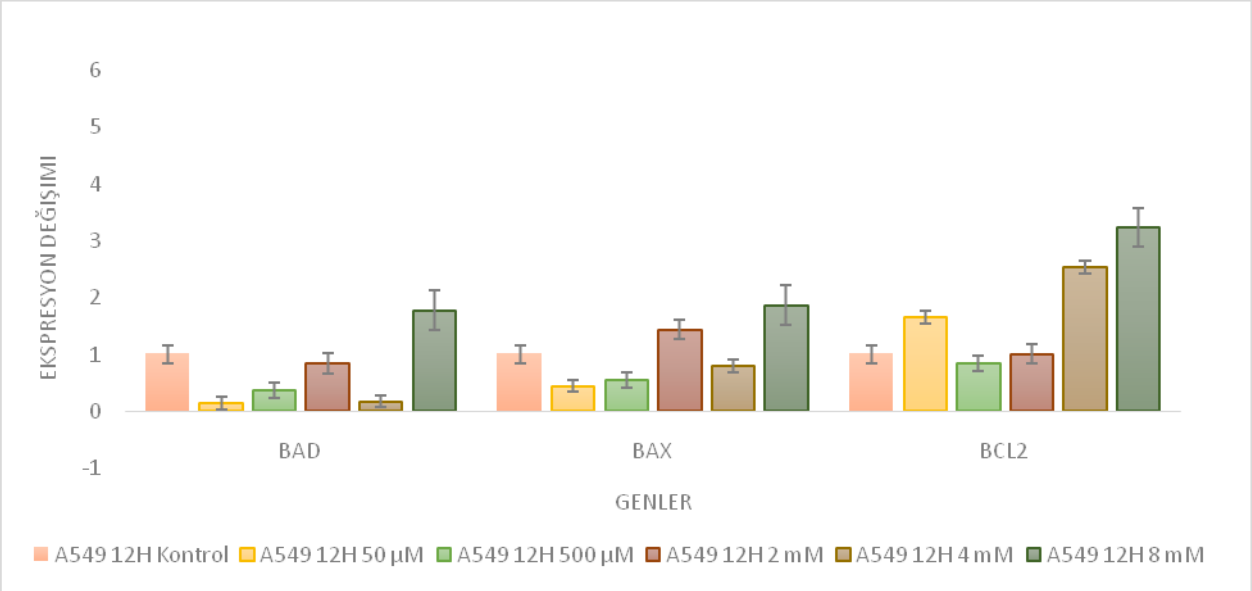


Şekil 3.16. *CASP3, CASP8, CASP9* genlerine ait jel görüntüleri

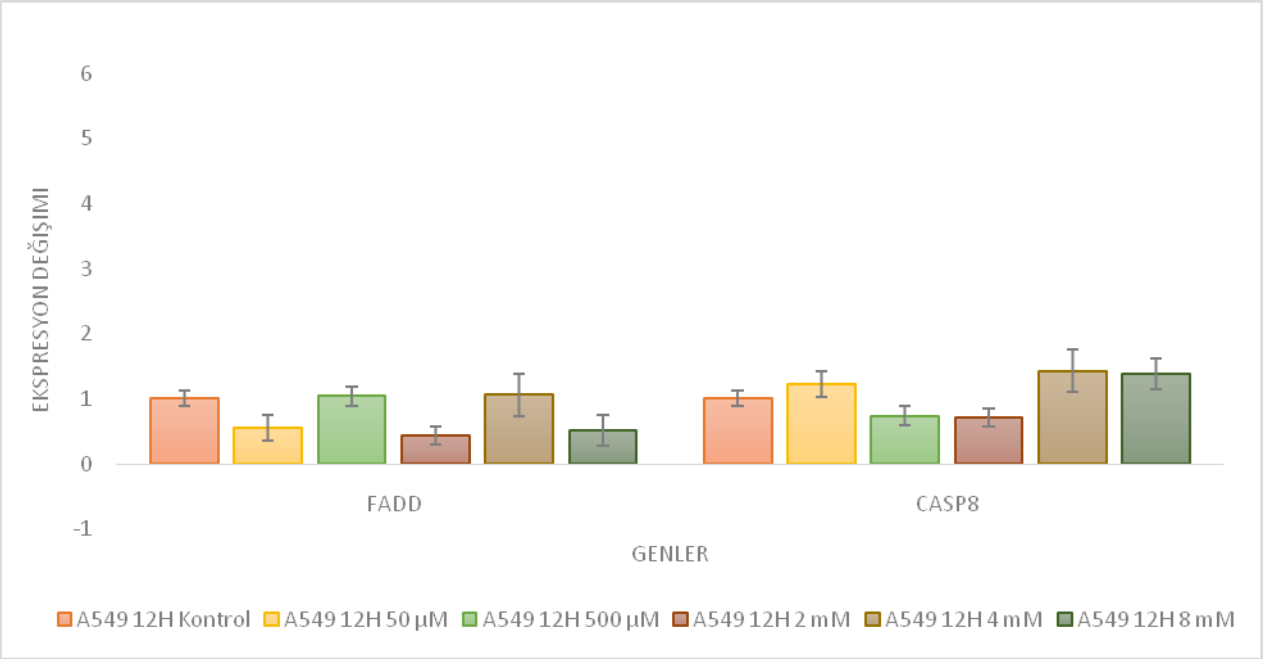
3.8. Kantitatif Real Time RT-PZR Bulguları

Borik asitin A549 hücrelerinde apoptotik yolakta görevli olan genlerin ekspresyonuna olan etkisi kantitatif gerçek-zamanlı PZR (qRT-PZR) yöntemi kullanılarak analizi yapılmıştır. A549 hücre hattında belirlenen apoptotik yolakta görev alan genlerin mRNA düzerindeki ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. *ACTB* housekeeping geni elde edilen sonuçların normalizasyonunda kullanılmıştır.

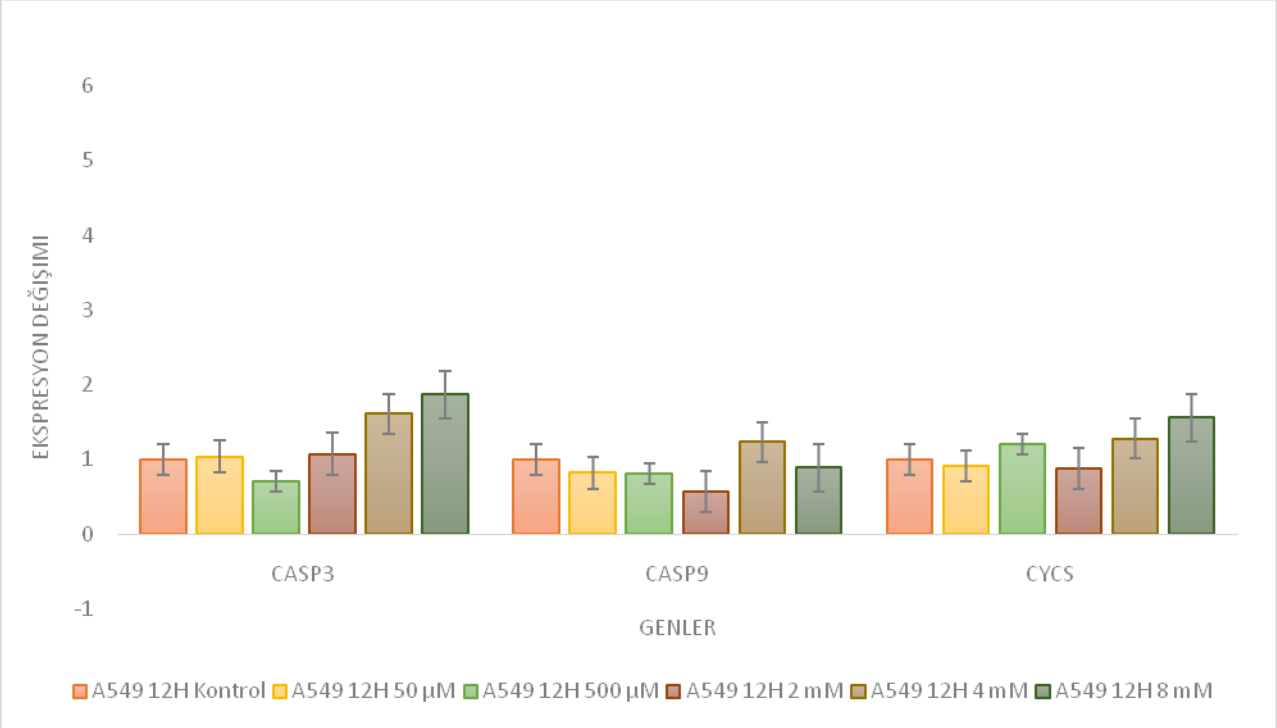
Kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta CT}$) deney grubundaki normalize edilmiş gen ekspresyonlarının, kontrol grubundaki normalize edilmiş gen ekspresyonlarına bölünmesiyle elde edilir.



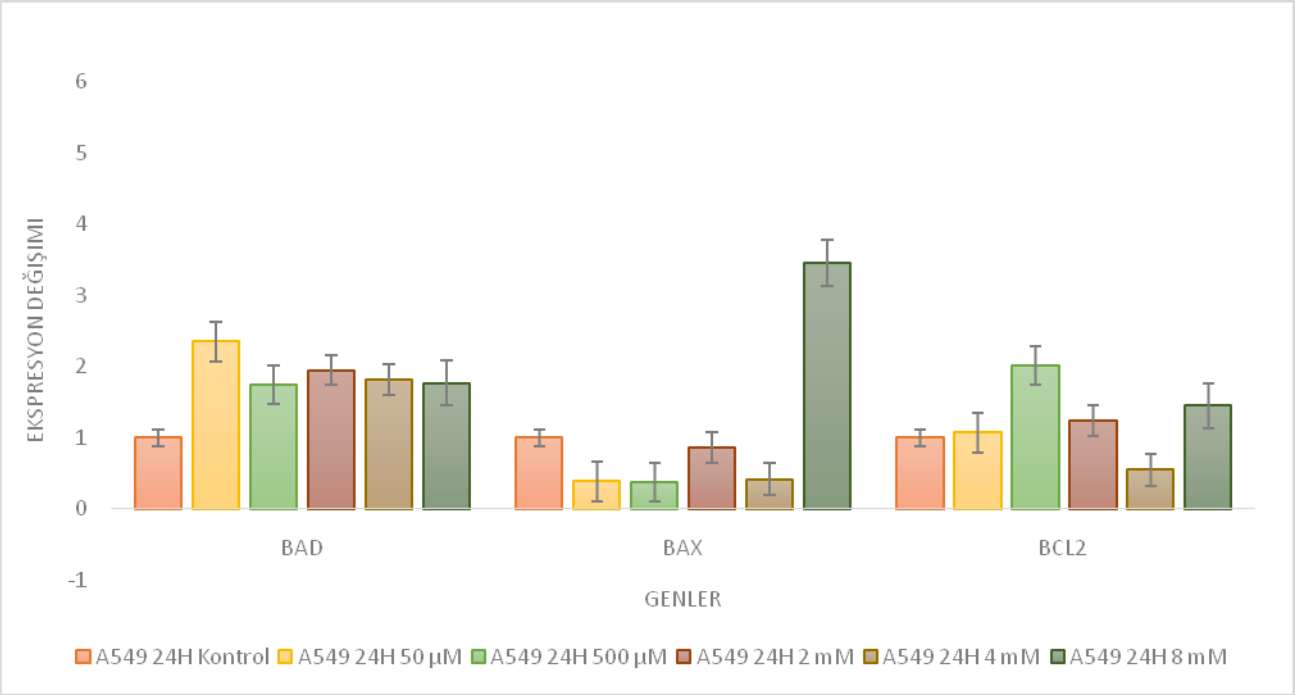
Şekil 3.17. A549 hücre hattında 12 saatlik borik asit muamelesi sonucu *BAD, BAX* ve *BCL2* genlerinin ekspresyon değişimlerinin grafiksel gösterimi



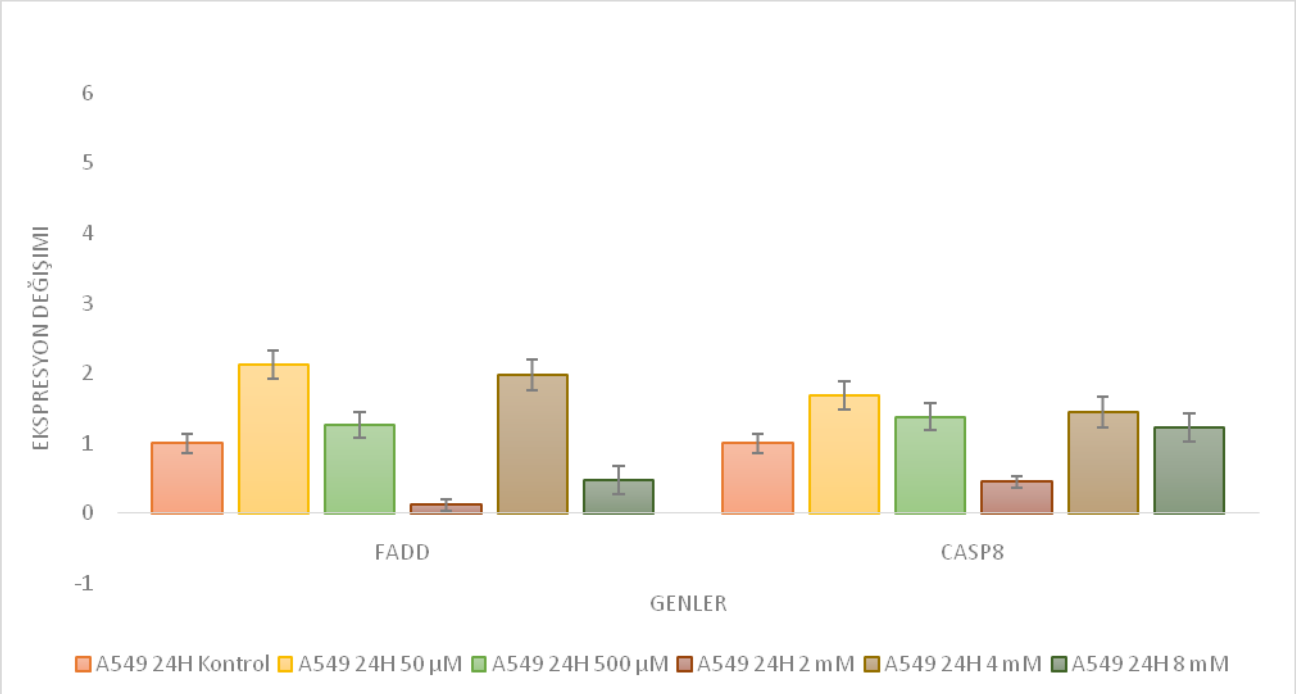
Şekil 3.18. A549 hücre hattında 12 saatlik borik asit muamelesi sonucu *FADD* ve *CASP8* genlerinin ekspresyon değişimlerinin grafiksel gösterimi



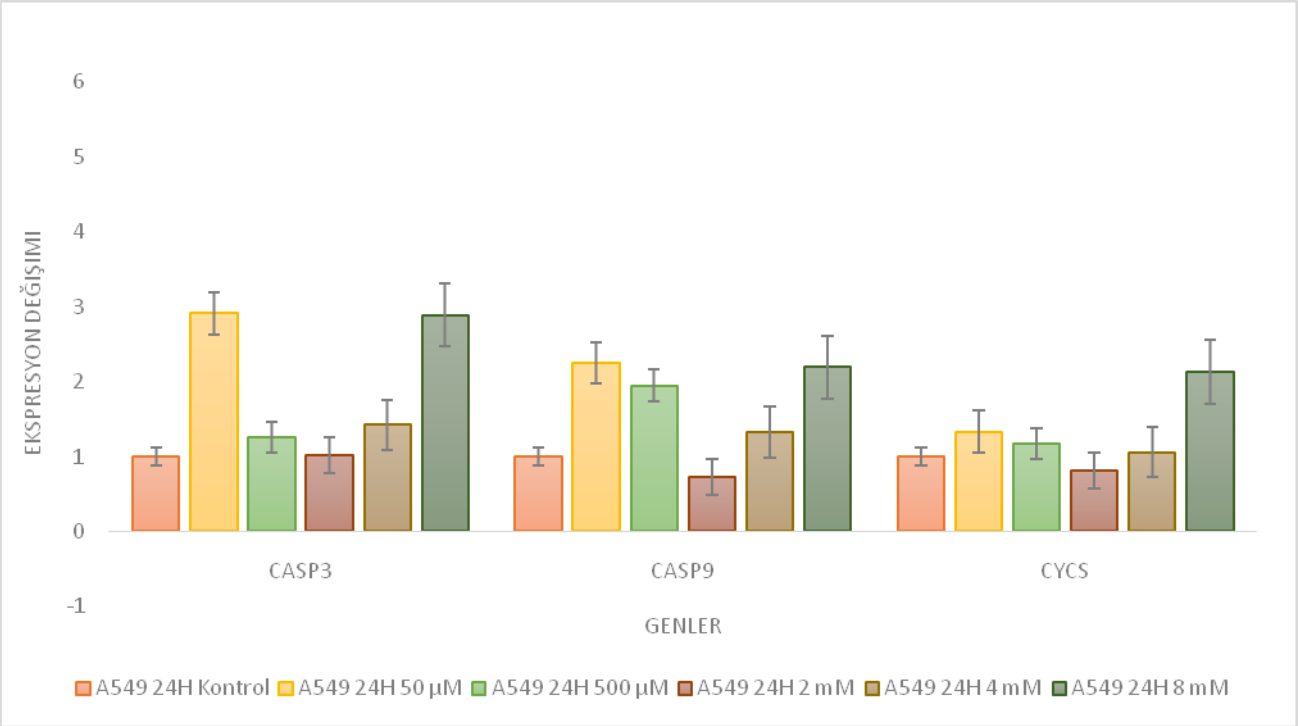
Şekil 3.19. A549 hücre hattında 12 saatlik borik asit muamelesi sonucu *CASP3*, *CASP9* ve *CYCS* genlerinin ekspresyon değişimlerinin grafiksel gösterimi



Şekil 3.20. A549 hücre hattında 24 saatlik borik asit muamelesi sonucu *BAD*, *BAX* ve *BCL2* genlerinin ekspresyon değişimlerinin grafiksel gösterimi



Şekil 3.21. A549 hücre hattında 24 saatlik borik asit muamelesi sonucu *FADD* ve *CASP8* genlerinin ekspresyon değişimlerinin grafiksel gösterimi



Şekil 3.22. A549 hücre hattında 24 saatlik borik asit muamelesi sonucu *CASP3*, *CASP9* ve *CYCS* genlerinin ekspresyon değişimlerinin grafiksel gösterimi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer kanseri, dünyadaki en yaygın kanser türü olmakla beraber tüm kanser ölümlerinin bir numaralı nedeni olmaya devam etmektedir. Akciğer kanseri, erkeklerde kansere bağlı ölümlerin ilk sırasında yer alırken kadınlarda ise meme kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır (Siegel, Miller ve ark. 2020). Kanserle ilişkili sinyal yolaklarının aktivasyonuna yol açan kanserojenik durumlar; akciğer kanserinin gelişiminde rol alan genetik, epigenetik ve çevresel faktörlere sahip onkogenler ayrıca tümör baskılayıcı genlerin düzensiz etkileşiminden kaynaklanır (Diniz, Ünlü ve ark. 2017).

Bor bakımından zengin diyetler, toprak ve suyun bor bakımından zengin olduğu bölgelerde, prostat, meme, rahim ağzı ve akciğer kanserleri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin gözlenmesi daha düşük risk teşkil ettiği yapılan birçok çalışmada bildirilmiştir. Bor bakımından zenginleştirilmiş diyetlerin prostat ve rahim ağzı kanseri riskinde önemli azalmalar sağladığını ve sigara içen kadınlarda akciğer kanseri riskini azalttığı tespit edilmiştir. Bor içeren bileşikler, serin proteazların inhibisyonu, NADH, mRNA eklenmesi ve hücre bölünmesi, apoptoz indüksiyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalara etki ederek kanser hücrelerinin fizyolojisine ve üremesinde rol oynadığı saptanmıştır (Pizzorno 2015).

Bu bilgiler ışığında, bu tez çalışmasında A549 insan akciğer kanseri hücre hattında ve BEAS-2B sağlıklı bronşial epitel hücre hattında farklı konsantrasyonlardaki borik asitin hücre proliferasyonu, hücre canlılığı ve apoptoz mekanizmasında görevli olan genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

2004 yılında Barranco ve arkadaşları yaptıkları çalışmada DU-145 prostat kanseri hücre hattında borik asiin hücre proliferasyonunu doza bağlı bir şekilde baskıladığı bildirilmiştir. DU-145 hücreleri, günlük besiyeri değişimi ile 100x20 mm doku kültürü plakaları üzerinde 0-1000 mM konsatrasyonlarındaki borik asit varlığında 8 gün boyunca kültüre edilmiş. 8. günde, hücrelerin proliferasyon sırasıyla 100, 250, 500 ve 1000 mM borik asit konsantrasyonlarında %32, %62, %87 ve %98 oranlarında baskılandığı tespit edilmiş. DU-145 hücre hattındaki bu proliferatif inhibisyon, MTT dönüşüm analizi ile gözlenmiş. Ayrıca DU-145 hücre hattında 100 mM'nin altındaki borik asit konsantrasyonlarında da değerlendirilmiş ve istatistiksel olarak anlamlı proliferatif inhibisyonun, 60 mM'a kadar düşük bir seviyede gerçekleştiği bildirilmiştir. Yine aynı çalışma da DU-145 hücre hattında propidyum iyodür DNA boyaması ile hücre döngüsü analizi yapılmıştır. Borik asit kaynaklı proliferatif inhibisyonun belirgin bir hücre döngüsünde evre kaymasına neden olmadığı

gösterilmiş. Apoptoz esnasında hücre döngüsünde sıklıkla evre kaymasına rastlandığından, bu hücre proliferasyonunun inhibisyonu, apoptoz yokluğunda meydana geldiği bildirilmiş. Apoptozun göstergesi olarak kaspaz-3 kullanılmıştır. Kaspaz-3 apoptotik hücre ölümü sırasında eksprese edilen bir sistein proteazdır. Bu olay Western Blot yöntemiyle kaspaz-3'ün saptanamaması ve DNA fragmantasyon analizi yöntemi ile 8 günlük borik asite maruz kalma konsantrasyonlarına göre DU-145 hücrelerinden izole edilen genomik DNA'da doza bağlı bir fragmantasyon saptanmaması ile desteklenmiştir (Barranco and Eckhert 2004). Yine Barranco ve arkadaşları çalışmanın devamı niteliğinde DU-145 hücre hattında çalışmaya devam etmiş ve 2006 yılında borik asitin etki mekanizmalarıyla ilgili bir çalışma yapmışlardır. DU-145 hücreleri, 7 gün boyunca 0-1000 μM konsantrasyonlarında borik asite maruz bırakılmıştır. 7. günde, 500 ve 1000 μM konsantrasyonlarında borik asite maruz kalan DU-145 hücre hatlarında Siklin A, B1, C, D1, E'nin protein ekspresyonu ve MAPK proteinin ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Tümör baskılayıcı gen olan *p53* ekspresyonunda değişiklik olmazken *p21* ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Barranco VE Eckhert 2006).

Yapılan başka bir çalışmada MDA-MB-231 meme kanseri hücre hatında borik asitin (BA) ve kalsiyum fruktoboratın (CF) hücre proliferasyonu ve apoptoz mekanizmasındaki etkilerini incelemişlerdir. MDA-MB-231 hücreleri, 24 saat boyunca 22,5 mM konsantrasyonundaki BA ve 0.45, 2.25, 5, 11.25 mM konsantrasyonlarında CF ile inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda farklı dozlardaki BA ve CF hücre canlılığı üzerine olan etkileri MTT analiz yöntemi ile incelenmiştir. Analiz sonucuna göre CF ve BA'nın MDA-MB-231 hücrelerinde konsantrasyona bağlı bir sitotoksisiteyi indüklediği gösterilmiştir. Bazı sitotoksik ilaçların kullanıldığı antikanser tedavisinde, apoptoz mekanizmasının temel unsurlarını ve hücresel stres tepkisini aktive ederek hücre ölümüne aracılık ettiği düşünülmektedir. Bundan yola çıkarsak MDA-MB-231 hücrelerinin CF ve BA'nın apoptoz mekanizması üzerine etkisi TUNEL yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Bunun sonucunda ise BA'nın apoptoz üzerinde daha az etkili olmakla beraber kullanılan iki madeninde apoptoz üzerinde etkili olabileceği gösterilmiştir. Apoptoz yolağında etkili olan BCL-2 ve kaspaz-3 proteini, tümör süpresör geni olan *p53* ekspresyon seviyeleri Western Blot yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde 2.25 mM'den daha yüksek konsantrasyonlardaki CF, BCL-2 protein ekspresyonunu aşağı regüle ederken, BA'in BCL-2 düzeyine herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. MDA-MB-231 hücrelerinde CF konsantrasyonlarının kaspaz-3 protein ekspresyonunu doza bağlı arttırıldığı gösterilirken BA konsantrasyonlarınında az da olsa ekspresyon seviyesini arttırdığı gösterilmiştir. MDA-MB-231 hücreleri, 2.25 mM'den yüksek

CF konsantrasyonlarında, p53 protein ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir. Aynı zamanda BA'nın, p53 protein ekspresyon seviyesinde önemli bir değişiklik fark edilmediği bildirilmiştir (Scorei, Ciubar ve ark. 2008).

Ceyhan ve ark. DU-145 insan prostat kanseri hücre hattında borik asitin farklı konsantrasyonlarının oksidatif stres ve apoptotoz mekanizması üzerine etkileri incelenmiştir. DU-145 hücreleri 0 ila 12.5 mM arasındaki konsantrasyonlarda borik asit ile 24 saat boyunca muamele edilmiş ve sonunda hücre canlılığı üzerine olan etkileri MTT yöntemi ile incelenmiştir. Farklı konsantrasyonda borik asit içeren hücrelerin, kontrolle kıyaslandığında hücre canlılığında istatistiksel olarak bir düşüşe neden olduğu tespit edilmiştir. DU-145 hücre hatlarındaki CASP3 ve CYCS seviyeleri, sırasıyla CASP3 ve CYCS'ye özgü bir antikorla önceden kaplanmış kolorimetrik bir kit kullanılarak ölçmüşlerdir. 24 saat boyunca 6.25, 10.77 ve 16.15 mM konsantrasyınlarındaki borik asit, DU-145 hücrelerinde apoptotik yolakları indükleyerek CYCS ve CASP3 ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını bulmuşlardır. CYCS ve CASP3 ekspresyon seviyelerinin sırasıyla yaklaşık on kat ve yedi kat arttığı tespit edilmiştir. Aynı zamanda, CYCS ve CASP3 ekspresyon seviyelerindeki artışların, 10.77 mM borik asit konsantrasyonunda en yüksek olduğu bildirilmiştir (Hacioglu, Kar ve ark. 2020).

Barranco ve ark. ABD'nin Teksas eyaletindeki prostat kanser insidans ve mortalite bilgileri bölgedeki içme suyu bor oranları ile değerlendirmişlerdir. Bunun sonucunda ise içme suyu bor oranları ile prostat kanser insidansı ve mortalite riski arasında bir azalma olduğunu göstermişlerdir. Yine bu epidemiyolojik çalışma da DU-145 prostat kanser hücre hattında borik asitin hücre proliferasyonu ve iyonize radyosyana karşı hücre duyarlılığı üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Bu amaçla DU-145 hücreleri 0, 100 ve 500 μM borik asit konsantrasyonlarında 8 gün kültüre edilmiş ve ardından hücre proliferasyonunda azalma gözlenirken iyonize radyasyona karşı duyarlılığının arttığını saptamışlardır. Ayrıca DU-145 hücreleri, günlük besiyeri değişimi ile 100x20 mm doku kültürü plakaları üzerinde 0-1000 μM konsatrasyonlarındaki borik asit varlığında 7 gün boyunca kültüre edilmiştir. Sonrasında Western Blot analiz yöntemi kullanılarak BCL-2 protein ekspresyonlarında doz bağımlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bir anti-apoptotik protein olan BCL-2'nin prostat kanseri hastalarında radyo terapiye direnç gösterdiği daha önce bildirilmiştir. Borik asitin bir taraftan BCL-2 doza bağlı ekspresyon düzeylerini azaltırken, diğer taraftan BCL-2'yi inhibe ederek kanser hücrelerinde radyasyona duyarlılığı artırması bu etkinin BCL-2 haricindeki farklı bir yolak üzerinden gerçekleştirdiğini düşündürmektedir. Aynı zamanda hücrelerin BCL-2

antisense oligonükleotitlerle muamele edildiği durumlarda bile borik asitin hücre ölümü olmaksızın proliferasyon inhibisyonu olması bu görüşü destekler nitelikte olduğunu göstermektedir (Barranco, Hudak ve ark. 2007).

Henderson ve ark. borik asitin prostat kanser hücrelerinde Ca^{+2} hareketleri üzerine olan etkilerini incelemek için DU-145 ve LNCaP hücre hatlarını kullanmışlar. Özellikle Ca^{+2} bağlayıcı proteinlerin, gen transkripsiyonu, hücre proliferasyonu, vezikül sekresyonu ve apoptoz mekanizmaları üzerindeki etkilerine vurgu yapılmıştır. Borik asitin fizyolojik seviyelerinin, doza bağımlı bir şekilde hücresel depolardan Ca^{+2} salınımını engellediğini ve hücresel depolarının Ca^{+2} düzeylerini düşürdüğünü ve bunun sonucunda ortaya çıkan etkinin çeşitli yolaklardaki tümör karşıtı etkiler oluşturabileceğini bildirmişlerdir (Henderson, Stella ve ark. 2009).

Bu tez çalışmasında A549 akciğer kanseri hücre hattında farklı konsantrasyonlardaki borik asitle 12 ve 24 saat boyunca inkübe edildi. İntrinsik *(BAD, BAX, BCL-2, CASP3, CASP9 ve CYCS*) ve ekstrinsik (*FADD, CASP3, CASP9*) yolaklarında görev alan 8 genin ekspresyon seviyelerini Real Time PZR yöntemi ile belirlendi.

BCL-2 ailesi, bulunduğu BH alanlarına göre 3 protein grubuna ayrılır. Bunlardan birincisi antiapoptotik akviteye sahip olan BCL-2 proteinleridir. BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, BFL-1/A1 proteinleri bu grupta yer almaktadır. BH alanlarının (BH1, BH2, BH3 ve BH4) hepsini kapsamaktadırlar. Antiapoptotik proteinler mitokondri membranında bulunan BAX ve BAD proapoptotik proteinlerini inhibe ederek apoptozu engeller (Kale, Osterlund ve ark. 2018). Bu tez çalışmasında yapmış olduğumuz Real Time PZR analiz sonuçlarına göre 12 saat boyunca 500 µM konsantrasyonlarındaki borik asit, *BCL-2* genindeki ekspresyon seviyesini azaltırken 24 saatteki 4 mM konsantrasyonlarındaki borik asit, *BCL-2* genindeki ekspresyon seviyesini azalttığı gözlenmiştir. 500 µM ve 4 mM konsantrasyonlarındaki ekspresyon seviyesindeki azalma göz önüne alındığında borik asitin, *BCL-2* genini inhibe ederek hücreleri apoptoza götürebileceği düşünülmüştür.

Mitokondrinin dış membranında eksprese olan BAX ve BAK proteinleri apoptotik peptidaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1) molekülüne bağlanırlar. Hücredeki iç hasar meydana geldiğinde Apaf-1 serbest kalır ve MOMP artışı ile mitokondriyumdaki sitokrom C'nin sitozole salınımı sonucu Apaf-1 ve kaspaz-9 molekülüne bağlanarak aktive eder. Aktive olan bu yapı ATP eşliğinde apoptozom kompleksini oluşturur ve böylece kaspaz kaskadı başlatılır. (Pena-Blanco ve Garcia-Saez 2018).

Bu çalışmadan elde edilen verilere göre; 12 saat boyunca 8 mM konsantrasyonlarındaki ve 24 saat boyunca tüm konsantrasyonlarındaki borik asit, A549 hücrelerindeki *BAD* geninde ekspresyon seviyesini arttırmıştır. Ayrıca 12 ve 24 saat boyunca sadece 8 mM konsantrasyonundaki borik asit, *BAX* geninde ekspresyon seviyesini arttırmıştır. Bunun yanısıra 24 saat boyunca 8 mM konsantrasyonlarında *CYCS* genindeki ekspresyon seviyesinin 2 kat arttığı tespit edilmiştir.

Mitokondri intermembran bölgesinden sitoplazmaya geçen bir diğer apoptotik faktörler arasında apoptoz tetikleyici faktör (AIF), mitokondri kaynaklı ikinci kaspaz aktivatörü (Smac), düşük pI direkt apoptozis inhibitör bağlayıcı protein (DIABLO) ve Omi/yüksek sıcaklık gereklilik proteini A (HtrA2) bulunmaktadır. Bunlar apoptoz inhibitörleri (IAP) olarak adlandırılan ve kaspaz-3, kaspaz-9 aktivasyonunu engelleyen proteinlerini bağlayıp inhibe ederler (Wong 2011). Yapmış olduğumuz tez çalışmasında A549 hücre hattındaki *CASP3* geninin, 12 saatteki 500 µM konsantrasyonu hariç, 24 saatteki tüm borik asit konsantrasyonlarında ekspresyon seviyesinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca *CASP9* geninde 12 saat boyunca 50 µM borik asit konsantrasyonunda ekspresyon seviyesi azalırken 24 saatteki 50 µM konsantrasyonunda 2 kat arttığı tespit edilmiştir. İntrinsik yolakta etkili olan genlerdeki ekspresyon seviyelerinin analiz sonuçlarına göre borik asitin farklı konsantrasyonlarında apoptozu indüklenebileceği düşünülmüştür.

FasL, TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand (TRAIL), APO-3/APO-2 ligandı ve TNF-α ölüm ligandaları arasında en çok bilinenlerdir (Pfeffer ve Singh 2018). En iyi karakterize edilmiş ligandlar ve bunların reseptörleri olarak FasL/FasR, TNF-α/TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5 yer almaktadır (Wong 2011). Ekstrinsik apoptoz yolağında en iyi tanımlanan reseptör-ligand ikilileri arasında FasL/FasR ve TNF-α/TNFR1 bulunmakatdır. Ölüm reseptörlerine adaptör protein olarak FADD ve TRADD molekülleri alınır. Bu adaptör proteinlere prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 bağlanarak ölüme neden olan sinyal kompleksini (DISC) oluşturur. Oluşan bu kompleks yapı kaspaz-8 ve kaspaz-10'u aktif hale gelir ve bunlarda cellat kaspazlar olarak adlandırılan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'yi aktive eder. Aktif hale gelen cellat kaspazlar, hücre ölümüne neden olan proteinlerin ve hücre iskeletinin yıkımına başlamaktadır (Pfeffer ve Singh 2018). Bu tez çalışmasında A549 hücre hattındaki 12 ve 24 saat boyunca 50 µM, 4 mM ve 8 mM borik asit konsantrasyonlarında *CASP8* gen ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca *FADD* geninde 12 saatteki 50 µM borik asit konsantrasyonunda ekspresyon seviyesi azalırken 24 saatteki aynı konsantrasyonda ekspresyon seviyesinin 2 kat arttığı saptanmıştır. Bu genler üzerindeki borik asitin farklı

konsantrasyonlardaki analiz sonucu doğrultusunda apoptozun ekstrinsik yolağını indüklediği düşünülmektedir.

Araştırmanın sonuçlarına göre, A549 akciğer kanseri hücre hattındaki borik asitin farklı konsantrasyonları, apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yolağında etkili olan genler üzerindeki ekspresyon seviyelerinde değişikliğe neden olması, borik asitin akciğer kanserinin apoptoz mekanizmasıyla ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Literatürden elde edilen veriler ve çalışmamızın sonuçları ışığında, borik asitin hem akciğer kanserinde hem de diğer kanser türlerinde apoptotik ve anti-proliferatif etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmamızın devamında, *in vitro* çalışmalar ile sinyal yolaklarının incelenmesi ve *in vivo* çalışmalar ile borik asitin akciğer kanseri üzerindeki etkilerinin daha kapsamlı araştırılabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Abotaleb, M., ve ark.. (2018). "Flavonoids in Cancer and Apoptosis." Cancers (Basel) 11(1).

Acerbo, A. S. and L. M. Miller (2009). "Assessment of the chemical changes induced in human melanoma cells by boric acid treatment using infrared imaging." Analyst 134(8): 1669-1674.

Amaral, J. D., ve ark.. (2010). "The role of p53 in apoptosis."

Asensi, V., ve ark.. (2017). "Role of Neutrophils Apoptosis in Osteomyelitis Pathogenesis." Clinical Microbiology: Open Access 06(01).

ATCC. "A549." from https://www.atcc.org/products/ccl-185.

ATCC. "BEAS-2B." from https://www.atcc.org/products/crl-9609.

Aysan, E., ve ark.. (2013). "Mechanism of body weight reducing effect of oral boric Acid intake." Int J Endocrinol 2013: 914651.

Baik, C. S., ve ark.. (2017). "Targeting BRAF-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: From Molecular Profiling to Rationally Designed Therapy." Oncologist 22(7): 786-796.

Barnes, H., ve ark.. (2017). "Surgery for limited-stage small-cell lung cancer." Cochrane Database Syst Rev 4: CD011917.

Barranco, W. T. and C. D. Eckhert (2004). "Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation."

Barranco, W. T. and C. D. Eckhert (2006). "Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer cells." Br J Cancer 94(6): 884-890.

Barranco, W. T., ve ark.. (2007). "Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States)."

Barranco, W. T., ve ark.. (2009). "Boric acid inhibits stored Ca2+ release in DU-145 prostate cancer cells." Cell Biol Toxicol 25(4): 309-320.

Baykara, O. (2016). "Current Modalities in Treatment of Cancer." Balıkesır Health Sciences Journal 5(3): 154-165.

Ben Safta, T., ve ark.. (2015). "Granzyme B-activated p53 interacts with Bcl-2 to promote cytotoxic lymphocyte-mediated apoptosis." J Immunol 194(1): 418-428.

Bingöl, Z. (2014). "Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi." Türkiye Klinikleri J Pulm Med-Special Topics. 2014;7(1):1-5.

Bray, F., ve ark.. (2018). "Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." CA Cancer J Clin 68(6): 394-424.

Briggs, M. (2001). "Boron Oxides, Boric Acid, and Borates."

Byers, L. A. and C. M. Rudin (2015). "Small cell lung cancer: where do we go from here?" Cancer 121(5): 664-672.

Cavalcante, G. C., ve ark.. (2019). "A Cell's Fate: An Overview of the Molecular Biology and Genetics of Apoptosis." Int J Mol Sci 20(17).

Celepli, S., ve ark.. (2020). "Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi."

Choo, Z., ve ark.. (2019). "Destined to Die: Apoptosis and Pediatric Cancers." Cancers (Basel) 11(11).

Clark, S. B. and S. Alsubait (2020). Non Small Cell Lung Cancer.

D'Arcy, M. S. (2019). "Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy." Cell Biol Int 43(6): 582-592.

Davidson, M. R., ve ark.. (2013). "The pivotal role of pathology in the management of lung cancer." J Thorac Dis 5 Suppl 5: S463-478.

de Groot, P. and R. F. Munden (2012). "Lung cancer epidemiology, risk factors, and prevention." Radiol Clin North Am 50(5): 863-876.

Dela Cruz, C. S., ve ark.. (2011). "Lung cancer: epidemiology, etiology, and prevention." Clin Chest Med 32(4): 605-644.

Denisenko, T. V., ve ark.. (2018). "Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma." Cell Death Dis 9(2): 117.

Devirian, T. A. and S. L. Volpe (2003). "The physiological effects of dietary boron." Crit Rev Food Sci Nutr 43(2): 219-231.

Di Renzo, F., ve ark.. (2007). "Boric acid inhibits embryonic histone deacetylases: a suggested mechanism to explain boric acid-related teratogenicity." Toxicol Appl Pharmacol 220(2): 178-185.

Didkowska, J., ve ark.. (2016). "Lung cancer epidemiology: contemporary and future challenges worldwide." Ann Transl Med 4(8): 150.

Dinçel, G. Ç. and O. Kul (2016). "PATOLOJİK APOPTOZİS VE TANI YÖNTEMLERİ."

Ding, L., ve ark.. (2008). "Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma." Nature 455(7216): 1069-1075.

Diniz, G., ve ark. (2017). "Histopathological and molecular features of lung cancer." The Journal of Tepecik Education and Research Hospital.

Drilon, A., ve ark. (2017). "Targeting MET in Lung Cancer: Will Expectations Finally Be MET?" J Thorac Oncol 12(1): 15-26.

Du, X., ve ark. (2018). "ALK-rearrangement in non-small-cell lung cancer (NSCLC)." Thorac Cancer 9(4): 423-430.

El-Telbany, A. and P. C. Ma (2012). "Cancer genes in lung cancer: racial disparities: are there any?" Genes Cancer 3(7-8): 467-480.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol 35(4): 495-516.

Fleischhacker, M., ve ark. (1999). "Molecular genetic characteristics of lung cancer-useful as real' tumor markers?".

Flores-Romero, H. and A. J. Garcia-Saez (2019). "The Incomplete Puzzle of the BCL2 Proteins." Cells 8(10).

Foster, K. A., ve ark. (1998). "Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism."

Gallardo-Williams, M. T., ve ark. (2004). "Boron supplementation inhibits the growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice." Toxicol Pathol 32(1): 73-78.

Geyer, M. B., ve ark. (2019). "BRAF in the cross-hairs." Expert Rev Hematol 12(3): 183-193.

Giard, D. J., ve ark.. (1973). "In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors."

GLOBOCAN (2020). "Estimated age-standardized incidence rates (World) in 2020, lung, both sexes, all ages."

Goldstraw, P., ve ark.. (2016). "The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer." J Thorac Oncol 11(1): 39-51.

Grilo, A. L. and A. Mantalaris (2019). "Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective." Biotechnol Adv 37(3): 459-475.

Hacioglu, C., ve ark. (2020). "High Concentrations of Boric Acid Trigger Concentration-Dependent Oxidative Stress, Apoptotic Pathways and Morphological Alterations in DU-145 Human Prostate Cancer Cell Line."

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The Hallmarks of Cancer."

Hecht, S. S. (2012). "Lung carcinogenesis by tobacco smoke." Int J Cancer 131(12): 2724-2732.

Henderson, K., ve ark. (2009). "Receptor activated Ca(2+) release is inhibited by boric acid in prostate cancer cells."

Henderson, K. A., ve ark. (2015). "Boric acid induces cytoplasmic stress granule formation, eIF2alpha phosphorylation, and ATF4 in prostate DU-145 cells." Biometals 28(1): 133-141.

Hirsch, F. R., ve ark. (2017). "Lung cancer: current therapies and new targeted treatments." The Lancet 389(10066): 299-311.

Howe, P. D. (1998). "A review of boron effects in the environment."

Hunt, C. D. (1998). "Regulation of enzymatic activity: one possible role of dietary boron in higher animals and humans."

Kale, J., ve ark. (2018). "BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death." Cell Death Differ 25(1): 65-80.

Kalkavan, H. and D. R. Green (2018). "MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business." Cell Death Differ 25(1): 46-55.

Kawano, O., ve ark. (2006). "PIK3CA mutation status in Japanese lung cancer patients." Lung Cancer 54(2): 209-215.

Kim-Campbell, N., ve ark. (2019). Chapter 20: Cell Death Pathways: Apoptosis and Regulated Necrosis. Critical Care Nephrology: 113-121.e112.

Korkmaz, M., ve ark. (2007). "Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells." Environ Toxicol 22(1): 17-25.

Kot, F. S. (2008). "Boron sources, speciation and its potential impact on health." Reviews in Environmental Science and Bio/Technology 8(1): 3-28.

Kuhn, E., ve ark. (2018). "Adenocarcinoma classification patterns and prognosis."

Lackmann, G. M., ve ark. (1999). "Metabolites of a Tobacco-Specific Carcinogen in Urine From Newborns."

Leonetti, A., ve ark. (2019). "Resistance mechanisms to osimertinib in EGFR-mutated non-small cell lung cancer." Br J Cancer 121(9): 725-737.

Liam, C. K., ve ark. (2015). "Lung cancer staging now and in the future." Respirology 20(4): 526-534.

Lin, J. J. and A. T. Shaw (2017). "Recent Advances in Targeting ROS1 in Lung Cancer." J Thorac Oncol 12(11): 1611-1625.

Liu, P., ve ark. (2019). "Targeting the untargetable KRAS in cancer therapy." Acta Pharm Sin B 9(5): 871-879.

Liu, Z. and T. M. Roberts (2006). "Human tumor mutants in the p110alpha subunit of PI3K." Cell Cycle 5(7): 675-677.

Mahabir, S., ve ark. (2008). "Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women." Am J Epidemiol 167(9): 1070-1080.

Malhotra, J., ve ark. (2016). "Risk factors for lung cancer worldwide." Eur Respir J 48(3): 889-902.

Martinvalet, D., ve ark. (2005). "Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis." Immunity 22(3): 355-370.

Matsuura, K., ve ark. (2016). "Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer." Int Rev Cell Mol Biol 327: 43-87.

McIlwain, D. R., ve ark. (2013). "Caspase functions in cell death and disease." Cold Spring Harb Perspect Biol 5(4): a008656.

Mo, H. N. and P. Liu (2017). "Targeting MET in cancer therapy." Chronic Dis Transl Med 3(3): 148-153.

Mohammad, T. A., ve ark. (2019). "CeL-ID: cell line identification using RNA-seq data." BMC Genomics 20(Suppl 1): 81.

Mohana-Kumaran, N., ve ark. (2014). "Targeting the intrinsic apoptosis pathway as a strategy for melanoma therapy." Pigment Cell Melanoma Res 27(4): 525-539.

Nikitovic, D., ve ark. (2013). "The roles of hyaluronan/RHAMM/CD44 and their respective interactions along the insidious pathways of fibrosarcoma progression." Biomed Res Int 2013: 929531.

Nims, R. W., ve ark. (2010). "Short tandem repeat profiling: part of an overall strategy for reducing the frequency of cell misidentification." In Vitro Cell Dev Biol Anim 46(10): 811-819.

Pena-Blanco, A. and A. J. Garcia-Saez (2018). "Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis." FEBS J 285(3): 416-431.

Perez-Moreno, P., ve ark. (2012). "Squamous cell carcinoma of the lung: molecular subtypes and therapeutic opportunities." Clin Cancer Res 18(9): 2443-2451.

Pfeffer, C. M. and A. T. K. Singh (2018). "Apoptosis: A Target for Anticancer Therapy." Int J Mol Sci 19(2).

PharmGKB. "Very Important Pharmacogene: KRAS." from https://www.pharmgkb.org/vip/PA166165417.

Pitolli, C., ve ark. (2019). "p53-Mediated Tumor Suppression: DNA-Damage Response and Alternative Mechanisms." Cancers (Basel) 11(12).

Pizzorno, L. (2015). "Nothing Boring About Boron."

PubChem. "Boric acid Chemical Structure." from https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Boric-acid.

Qureshi, S., ve ark. (2001). "Boric acid enhances in vivo Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice."

Rakers, S., ve ark. (2014). "Real-time cell analysis: sensitivity of different vertebrate cell cultures to copper sulfate measured by xCELLigence((R))." Ecotoxicology 23(8): 1582-1591.

Rami-Porta, R., ve ark. (2018). "Lung cancer staging: a concise update." Eur Respir J 51(5).

Roshan Moniri, M., ve ark. (2015). "Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA)." Cytotechnology 67(2): 379-386.

Schabath, M. B. and M. L. Cote (2019). "Cancer Progress and Priorities: Lung Cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 28(10): 1563-1579.

Schubbert, S., ve ark. (2007). "Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer." Nat Rev Cancer 7(4): 295-308.

Scorei, R., ve ark. (2008). "Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells." Biol Trace Elem Res 122(3): 197-205.

Shi, Y. (2002). "Mechanisms of Caspase Activation and Inhibition during Apoptosis." Molecular Cell 9(3): 459-470.

Shigematsu, H., ve ark. (2005). "Somatic Mutations of the HER2 Kinase Domain in Lung Adenocarcinomas."

Siddiqui, W. A., ve ark. (2015). "The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update." Arch Toxicol 89(3): 289-317.

Siegel, R. L., ve ark.. (2020). "Cancer statistics, 2020." CA Cancer J Clin 70(1): 7-30.

Singh, R., ve ark. (2019). "Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins." Nat Rev Mol Cell Biol 20(3): 175-193.

Sinha, R., ve ark. (1998). "Fried, well-done red meat and risk of lung cancer in women (United States)."

Stefanowicz-Hajduk, J., ve ark.. (2016). "Reuse of E-plate cell sensor arrays in the xCELLigence Real-Time Cell Analyzer." Biotechniques 61(3): 117-122.

Subbiah, V., ve ark. (2020). "State-of-the-Art Strategies for Targeting."

T.C. Sağlık Bakanlığı and T. K. İstatistikleri (2015). "<14. Trkiye_Kanser_statistikleri_2015.pdf>."

Taylor, R. C., ve ark. (2008). "Apoptosis: controlled demolition at the cellular level." Nat Rev Mol Cell Biol 9(3): 231-241.

Tomizawa, K., ve ark. (2011). "Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/neu gene mutations in lung cancers." Lung Cancer 74(1): 139-144.

Tuononen, K., ve ark. (2013). "Comparison of targeted next-generation sequencing (NGS) and real-time PCR in the detection of EGFR, KRAS, and BRAF mutations on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor material of non-small cell lung carcinoma-superiority of NGS." Genes Chromosomes Cancer 52(5): 503-511.

Turkez, H., ve ark. (2012). "The effects of some boron compounds against heavy metal toxicity in human blood." Exp Toxicol Pathol 64(1-2): 93-101.

Uphoff, C. C. and H. G. Drexler (2011). "Detecting mycoplasma contamination in cell cultures by polymerase chain reaction." Methods Mol Biol 731: 93-103.

Uphoff, C. C. and H. G. Drexler (2014). "Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures." Curr Protoc Mol Biol 106: 28 24 21-14.

Villalobos, P. and Wistuba, II (2017). "Lung Cancer Biomarkers." Hematol Oncol Clin North Am 31(1): 13-29.

Vineis, P., ve ark. (2007). "Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air pollution in non-smokers in different European countries: a prospective study." Environ Health 6: 7.

Wang, Y., ve ark. (2008). "Experimental study on the estrogen-like effect of boric Acid." Biol Trace Elem Res 121(2): 160-170.

Watkin, S. W. and J. A. Green (1990). "Small cell carcinoma of the bronchus: historical perspective of a treatable disease."

Wehbe, K., ve ark. (2018). "Detection of mycoplasma in contaminated mammalian cell culture using FTIR microspectroscopy." Anal Bioanal Chem 410(12): 3003-3016.

WHO. "Boron." from https://apps.who.int/iris/handle/10665/42046.

WHO (2008). "WHO REPORT on the global TOBA CCO epidemic, 2008."

Wong, R. S. (2011). "Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment."

Wood, S. L., ve ark. (2015). "Molecular histology of lung cancer: from targets to treatments." Cancer Treat Rev 41(4): 361-375.

Yang, S., ve ark. (2019). "Emerging therapies for small cell lung cancer." J Hematol Oncol 12(1): 47.

Zofkova, I., ve ark. (2013). "Trace elements and bone health." Clin Chem Lab Med 51(8): 1555-1561.

tez son 04082021 intihal2

ORİJİNALLİK RAPORU

%11	%8	%4	%6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	guncel.tgv.org.tr İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
3	oatext.com İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to Saglik Bilimleri Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	Submitted to Osmaniye Korkut Ata University (deneme) Öğrenci Ödevi	<%1
8	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
9	www.tipdergi.duzce.edu.tr	