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

AKCİĞER KANSERİNDE BORİK ASİTİN APOPTOTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

SEREN YİRMİBEŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DR. ÖĞR. ÜYESİ MURADİYE ACAR

İSTANBUL-2021

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum "AKCİĞER KANSERİNDE BORİK ASİTİN APOPTOTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ" 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.

Seren Yirmibeş

ÖZET

AKCİĞER KANSERİNDE BORİK ASİTİN APOPTOTİK ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Seren Yirmibeş

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muradiye Acar

2021

Akciğer kanseri, dünyada en çok görülen kanser türü olup, kansere bağlı ölüm sebepleri arasında birinci sırada bulunmaktadır. Akciğer kanserine çözüm bulunması amacıyla, tedaviye yönelik çalışmalar yapılmakta, farklı ilaç ve maddelerin bu hastalık üzerindeki etkileri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Apoptoz, homeostazı ve organizmanın hayatta kalmasını destekleyen önemli ve gerekli bir hücre ölüm programıdır. Ancak düzensizleştiğinde, nörodejeneratif hastalıklardan kansere kadar sayısız patolojiye yol açabilmektedir. Bu nedenle apoptoz; kanser gelişiminin inaktivasyonu için önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada, akciğer kanseri hücre dizisinde (A549) borik asit kullanımının anti-proliferatif ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Hücre titrasyon testi xCELLigence yöntemi ile; hücre canlılığı SRB testi ile incelenmiştir. Borik asitin apoptotik aktivitesi biyokimyasal (Annexin-V) ve moleküler (qRT-PCR analizi) olarak değerlendirilmiştir. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına borik asitin farklı konsantrasyonları uygulandı. SRB testi ile borik asitin hücre proliferasyonunda %50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonu yani IC_{50} dozu ve 48. ve 72. saatteki sitotoksik etkisi belirlendi. IC_{50} değerlerine en yakın olan dozlar (10 mM, 20 mM, 50 mM) seçilerek ileri analizlere devam edildi. Belirlemiş olduğumuz borik asit dozları ile 12 ve 24 saat muamele edilen hücrelerden RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldı. *CASP3, CASP8, CASP9, BCL2, BAX, BAD, FADD, CYCS* genlerinin ekspresyon seviyeleri Real Time PCR ile incelendi. Sonuçlarımız borik asitin, kontrol grubu ile kıyaslandığında dozlarla orantılı olarak A549 hücre hattında hücre canlılığını baskıladığını gösterdi. Borik asit, bazı dozlarında *CASP3, CASP8, CASP9, BAX, BAD, FADD* ve *CYCS* genlerinin ekspresyon seviyelerini arttırmış olup *BCL2* gen ifadesini azaltmıştır. Bu bulgu ile borik asitin ekstrinsik ve intrinsik yolağı tetikleyerek A549 kanser hücre hattını apoptoza teşvik ettiği saptanmıştır. Sonuç olarak, borik asitin A549 hücreleri üzerinde gösterdiği apoptotik ve anti-proliferatif etkileri nedeniyle akciğer kanseri tedavisinde bir anti-kanser ajan olarak potansiyel teşkil ettiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer kanseri, Apoptoz, Borik asit

ABSTRACT

INVESTIGATION OF APOPTOTIC EFFECT OF BORIC ACID IN LUNG CANCER

Yirmibes, Seren

Department of Medical Biology and Genetics

Advisor: Acar, Muradiye, Asst. Prof.

2021

Lung cancer is the most common type of cancer and ranks first among the causes of cancer-related death in the world. In order to find a solution to lung cancer, studies are carried out for treatment, and the effects of different drugs and substances on this disease are intensively investigated. Apoptosis is an important and necessary cell death program that promotes homeostasis and survival of the organism. But when dysregulated, it can lead to numerous pathologies, from neurodegenerative diseases to cancer. Therefore, apoptosis plays an important role in the inactivation of cancer development. In this study, we aimed to investigate the anti-proliferative and apoptotic effects of boric acid use in the lung cancer cell line (A549). Cell titration test xCELLigence method, cell viability was examined by SRB assay. Then, the apoptotic activity of boric acid was evaluated as biochemical (Annexin-V) and molecular (qRT-PCR analysis). In the study, different concentrations of boric acid were applied on the A549 and BEAS-2B cell lines. With the SRB test, the inhibitory concentration of boric acid caused a 50% decrease in cell proliferation, namely the IC_{50} dose and its cytotoxic effect at the 48th and 72nd hours were determined. Further analyzes were continued by selecting 10 mM, 20 mM and 50 mM doses, which are the closest doses that provide 50% viability. After 12 and 24 hours, RNA isolation and cDNA synthesis were performed from the cells treated with the boric acid doses we determined, and the expression levels of *CASP3, CASP8, CASP9, BCL2, BAX, BAD, FADD, CYCS* genes were examined by Real-Time PCR. Our results showed that boric acid suppressed cell viability in the A549 cell line proportionally with doses compared to the control group. Boric acid increased the expression levels of *CASP3, CASP8, CASP9, BAX, BAD, FADD*, and *CYCS* genes and decreased *BCL2* gene expression at some doses. With this finding, it was determined that boric acid triggered the extrinsic and intrinsic pathways and promoted apoptosis of the A549 cancer cell line. In conclusion, we can say that boric acid has the potential as an anti-cancer agent in the treatment of lung cancer due to its apoptotic and anti-proliferative effects on A549 cells.

Key Words: Lung cancer, Apoptosis, Boric acid

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans hayatımda danışmanlığımı yapan, tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, her türlü araştırma imkân ve olanaklarını sağlayan, laboratuvar çalışmaları esnasında eşsiz bilgi ve tecrübesiyle kendisinden çok şey öğrendiğim değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Muradiye ACAR'a,

Tezim için her türlü imkânı sağlayan Sayın rektörümüz Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e,

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Veysel Sabri HANÇER'e ve tüm hocalarıma,

İstinye Üniversitesi Moleküler Kanser Araştırma Merkezi (İSÜMKAM) bünyesinde yürütülen hücre kültürü çalışmalarımda desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya,

Bu çalışmanın uygulamaya geçirilmesi konusunda İstinye Üniversitesi Genetik Hastalıklar Değerlendirme Merkezi bünyesinde yürütülen çalışmalarda desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Zeynep OCAK'a,

Hücre kültürü deney aşamalarımda, çalışmamın planlanmasında ve yürütülmesindeki büyük katkılarının yanı sıra, gösterdikleri yakın ilgiden dolayı Öğretim Görevlisi Melda Sarıman'a ve Öğretim Görevlisi Merve Erkısa'ya,

Tezimde emeği geçen arkadaşlarım Gaye Nur VİDİNLİ ve Hakan YILMAZOĞULLARI'na,

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

Bugüne kadar olduğu gibi, bu çalışma süresince de yanımda olan ve desteğini esirgemeyen aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Seren YİRMİBEŞ

Temmuz, 2021

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 **3**
1.1. KANSER 3
1.2. AKCİĞER KANSERİ 5
1.2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi 5
1.2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörleri 7
1.2.2.1. *Sigara ve tütün kullanımı* 7
1.2.2.2. *Mesleki maruziyetler* 8
1.2.2.3. *Cinsiyet ve yaş* 8
1.2.2.4. *Beslenme* 8
1.2.2.5. *Diğer akciğer hastalıkları* 9
1.2.2.6. *Genetik faktörler* 9
1.2.3. Akciğer Kanserinin Sınıflaması 10
1.2.3.1. *Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)* 11
1.2.3.2. *Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)* 12
1.2.4. Akciğer Kanseri Evrelemesi 14
1.2.5. Akciğer Kanserinde Moleküler Değişiklikler 14
1.2.5.1. *EGFR* 15
1.2.5.2. *ALK* 16
1.2.5.3. *ROS1* 17
1.2.5.4. *HER2* 18

1.2.5.5. *FGFR-1* 19
1.2.5.6. *MET* 20
1.2.5.7. *PTEN* 21
1.2.5.8. *RET* 22
1.2.5.9. *TP53* 23
1.2.5.10. *KRAS* 24
1.2.5.11. *BRAF* 24
1.2.5.12. *NTRK* 25
1.3. APOPTOZ 27
1.3.1. Ekstrinsik (Dışsal) Apoptoz Yolu 29
1.3.2. Mitokondriyal (İçsel) Apoptoz Yolu 30
1.3.3. Apoptoz ve Kanser 33
1.4. BORİK ASİT 35
1.4.1. Borik Asit ve Kanser 37
1.5. A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI 40
2. MATERYAL VE METOD 41
2.1. MATERYAL 41
2.2. METOD 43
2.2.1. Hücre Kültürü 43
2.2.1.1. *Besiyerinin hazırlanması* 43
2.2.1.2. *Hücre hatlarının stoktan çıkartılması* 43
2.2.1.3. *Hücre hatlarının pasajlanması* 43
2.2.1.4. *Hücre hatlarının stoklanması* 44
2.2.1.5. *Hücre kültürü karakterizasyonu* 44
2.2.1.6. *Hücre hatlarında mikoplazma kontaminasyon kontrolü* 46
2.2.1.7. *Tripan mavisi yöntemi ile hücrelerin sayılması* 48
2.2.2. Borik Asit Çözeltisinin Hazırlanması 48
2.2.3. xCELLigence Teknolojisi ile Gerçek Zamanlı Hücre Analizi 49
2.2.4. Sulforhodamine B (SRB) Testi ile Canlılık Tayini 50
2.2.5. Anneksin-V Metodu 51
2.2.6. RNA İzolasyonu 52
2.2.6.1. *NanoDrop ile RNA ölçümü* 52
2.2.7. cDNA Sentezi 53

2.2.8. Primer Dizaynı 53
2.2.8.1. *Primerlerin sulandırılması* 54
2.2.8.2. *Gradiyent PCR* 54
2.2.8.3. *Agaroz jel elektroforezi* 55
2.2.9. Real-Time PCR 55
2.2.9.1. *İstatiksel analiz* 56
3. BULGULAR 57
3.1. Hücre Karakterizasyon Sonuçları 57
3.2. Mikoplazma Kontaminasyon Kontrolü PCR Sonuçları 58
3.3. xCELLigence Teknolojisi ile Gerçek Zamanlı Hücre Titrasyon Deneyi Sonuçları 58
3.4. SRB Canlılık Testi Bulguları 60
3.5. Anneksin-V Testi Bulguları 63
3.6. Gradiyent PCR Bulguları 65
3.7. Real-Time PCR Sonuçları 66
4. TARTIŞMA VE SONUÇ 71
KAYNAKLAR 80
İNTİHAL FORMU 95
ÖZGEÇMİŞ 96

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1. Kanser hücresinin başlıca özellikleri 3
Şekil 1.2. Dünya genelinde kanser çeşitlerine göre insidans ve mortalite oranları..... 4
Şekil 1.3. Akciğer kanserleri için cinsiyete göre bölgelere özgü yaşa standardize edilmiş insidans oranları 5
Şekil 1.4. Adenokarsinoma, skuamöz hücreli karsinoma ve büyük hücreli karsinomanın histolojik profili..... 12
Şekil 1.5. *EGFR* sinyal yolağı..... 15
Şekil 1.6. *ALK* füzyon onkogenlerinin şeması ve önemli aşağı akış sinyal yolakları..... 16
Şekil 1.7. *ROS1* sinyal yolağı..... 17
Şekil 1.8. *HER2* sinyal yolağı 18
Şekil 1.9. Kanserde *FGFR*'nin yapısı 19
Şekil 1.10. HGF-MET sinyal yolağı 20
Şekil 1.11. PI3K/Akt/PTEN/mTOR sinyal yolağı 21
Şekil 1.12. *TP53* sinyal yolağı 23
Şekil 1.13. MAPK/ERK yolağı..... 25
Şekil 1.14. TRK yolakları 26
Şekil 1.15. Ekstrinsik (dışsal) apoptoz yolu..... 30
Şekil 1.16. Mitokondriyal (içsel) apoptoz yolu..... 33
Şekil 1.17. A549 hücre hattının mikroskobik görüntüleri 40
Şekil 1.18. BEAS-2B hücre hattının mikroskobik görüntüleri 40
Şekil 3.1. A549 hücre hattının elektroferogram görüntüsü..... 57
Şekil 3.2. BEAS-2B hücre hattının elektroferogram görüntüsü 57
Şekil 3.3. PCR reaksiyonuna ait agoroz jel elektroforez görüntüsü. 58
Şekil 3.4. BEAS-2B hücre hattı xCELLigence titrasyon deneyleri sonucu cihaz görüntüsü .. 59
Şekil 3.5. BEAS-2B hücre hattı 24.saatteki 10x mikroskop görüntüleri 59
Şekil 3.6. A549 hücre hattı xCELLigence titrasyon deneyleri sonucu cihaz görüntüsü..... 59
Şekil 3.7. A549 hücre hattı 24.saatteki 10x mikroskop görüntüleri 59
Şekil 3.8. Borik asit ile 48 ve 72 saat muamele edilen A549 ve BEAS-2B hücre hatlarının mikroskop görüntüleri..... 61
Şekil 3.9. Doza bağlı borik asitin A549 akciğer kanseri hücre hattında canlılık üzerine etkisinin SRB testi ile gösterilmesi. 62

Şekil 3.10. Doza bağlı borik asitin BEAS-2B sağlıklı akciğer hücre hattında canlılık üzerine etkisinin SRB testi ile gösterilmesi. 62
Şekil 3.11. Borik asitin kontrol, 20 mM ve 50 mM konsantrasyonlarında A549 hücre hattında Anneksin-V analizi ile bulunan apoptotik yüzde oranlarının 12 ve 24 saatlik histogramları .. 63
Şekil 3.12. Borik asitin kontrol, 14 mM ve 50 mM konsantrasyonlarında BEAS-2B hücre hattında Anneksin-V analizi ile bulunan apoptotik yüzde oranlarının 12 ve 24 saatlik histogramları..... 64
Şekil 3.13. *ACTB, BAX, BAD, FADD, CYCS, BCL2* genlerine ait jel görüntüleri 65
Şekil 3.14. *CASP3, CASP8, CASP9* genlerine ait jel görüntüleri 65
Şekil 3.15. A549 hücre hattında 12 saatlik borik asit muamelesi sonucu *CASP8, CASP9, CASP3* ve *FADD* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi 67
Şekil 3.16. A549 hücre hattında 12 saatlik borik asit muamelesi sonucu *BAD, BAX, BCL2* ve *CYCS* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi 67
Şekil 3.17. A549 hücre hattında 24 saatlik borik asit muamelesi sonucu *CASP8, CASP9, CASP3* ve *FADD* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi 68
Şekil 3.18. A549 hücre hattında 24 saatlik borik asit muamelesi sonucu *BAD, BAX, BCL2* ve *CYCS* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi 68
Şekil 3.19. BEAS-2B hücre hattında 12 saatlik borik asit muamelesi sonucu *CASP8, CASP9, CASP3* ve *FADD* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi..... 69
Şekil 3.20. BEAS-2B hücre hattında 12 saatlik borik asit muamelesi sonucu *BAD, BAX, BCL2* ve *CYCS* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi 69
Şekil 3.21. BEAS-2B hücre hattında 24 saatlik borik asit muamelesi sonucu *CASP8, CASP9, CASP3* ve *FADD* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi..... 70
Şekil 3.22. BEAS-2B hücre hattında 24 saatlik borik asit muamelesi sonucu *BAD, BAX, BCL2* ve *CYCS* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi 70

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1. DSÖ 2015 akciğer kanseri sınıflandırması 11
Tablo 2.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin listesi 41
Tablo 2.2. Deneylerde kullanılan sarf malzemelerin listesi 42
Tablo 2.3. Deneylerde kullanılan cihazların listesi 42
Tablo 2.4. PCR reaksiyon karışımı içeriği 46
Tablo 2.5. PCR amplifikasyon süreci 46
Tablo 2.6. Elektroforez içeriği 46
Tablo 2.7. PCR reaksiyon bileşikleri 47
Tablo 2.8. PCR program aşamaları 47
Tablo 2.9. Borik asit çözeltisinin hazırlanması 48
Tablo 2.10. cDNA sentezi için hazırlanan 2.mix içeriği 53
Tablo 2.11. Dizayn edilen primer dizileri 54
Tablo 2.12. Gradiyent PCR'da kullanılan solüsyonlar 55
Tablo 2.13. Gradiyent PCR koşulları 55
Tablo 2.14. Real-Time PCR reaksiyon içeriği 56
Tablo 2.15. Real-Time PCR programı 56
Tablo 3.1. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarının STR profilleri 58
Tablo 3.2. Borik asitin 12 saat uygulanması sonrası A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında Anneksin-V analizinde bulunan verilerin yüzde değerleri 64
Tablo 3.3. Borik asitin 24 saat uygulanması sonrası A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında Anneksin-V analizinde bulunan verilerin yüzde değerleri 65
Tablo 3.4. İzole edilen RNA konsantrasyonları ve OD değerleri 66

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

7-AAD : 7-Aminoaktinomisin D
ADP : Adenozin Difosfat
AIF : Apoptozis indükleyici faktör
ALK : Anaplastik Lemfoma Kinaz
APAF-1 : Apoptotik proteaz aktive eden faktör-1
ATCC : Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
ATP : Adenozin Trifosfat
ATS : Amerikan Toraks Derneği
BCL2 : B-Hücre Lenfoma 2
BH : Bcl-2 homoloji
BHK : Büyük Hücreli Karsinoma
BNCT : Boron nötron yakalama tedavisi
BRAF : B-Raf proto-onkogen
CAD : Kaspaz Aktive Edici DNaz
CCDC6 : Coıled-Coıl Domaın-Contaınıng Proteın 6
CD74 : Cluster of Differentiation 74 (CD74 Antijeni)
CGA : Kanser Genom Atlası
CRP : C-Reaktif Protein
DEPC : Dietilpirokarbonat
DISC : Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMSO : Dimetil Sülfoksit
DNA : Deoksiribonükleik asit
DR : Ölüm reseptörleri
DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit
EGFR (ERBB1) : Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
EML4 : Echinoderm microtubule-associated protein-like 4
ERBB3 (HER3) : ERB-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 3
ERBB4 (HER4) : ERB-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 4
ERK : Ekstraselüler Sinyalle Düzenlenen Kinaz
ERS : Avrupa Solunum Derneği
FADD : Fas ile İlişkili Ölüm Alanı Proteini
FBS : Fetal sığır serumu
FGFR1 : Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü-1
FGFR2 : Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü-2
FGFR3 : Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü-3
FGFR4 : Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü-4
GWA : Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları
HER2 (ERBB2) : ERB-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 2
HGF : Hepatosit Büyüme Faktörü
HRAS : Harvey Rat Sarkom
HtrA2 : High Temperature Requirement Protein A2
IAP : Apoptoz inhibitör protein
IARC : Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

IASLC : Uluslararası Akciğer Kanseri Araştırmaları Derneği
IC_{50} : Hücre canlılığını %50 azaltan inhibitör konsantrasyon
ICAD : İnaktif kaspaz aktive edici DNaz
JAK : Janus Kinaz
KEAP1 : Kelch-Benzeri ECH-İlişkili Protein 1
KHAK : Küçük Hücreli Akciğer Kanseri
KHDAK : Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri
KIF5B : Kinesin Aile Üyesi 5B
KOAH : Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
KRAS : Kirsten Rat Sarcoma- Kirsten sıçan sarkoma 2 viral onkogen homolog
LOH : Heterozigotluk Kaybı
MAP2K1 : Mitojen-aktive edici protein kinaz 1
MAPK/MEK : Mitojenle aktifleştirilen protein kinaz
MET : Mezenşimal–epitelyal dönüştürücü
MOMP : Mitokondri dış membran permeabilizasyonu
MPT : Mitokondriyal permabiliti transisyon
mRNA : Mesajcı RNA
Mtor : Rapamisin hedefi (Mechanistic Target of Rapamycin)
NADH : Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH : Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NPBA : 3-nitrofenil borik asit
NPM : Nükleofozmin
NRAS : Nöroblastoma RAS viral onkogen homolog
NTRK1 : Nörotropik reseptör tirozinaz kinaz 1
NTRK2 : Nörotropik reseptör tirozinaz kinaz 2
NTRK3 : Nörotropik reseptör tirozinaz kinaz 3
OD : Optik Densiti
PBS : Fosfat tuz tamponu
PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K : Fosfatidilinositol 3 Kinaz
PKA : Protein Kinaz A
PKC : Protein Kinaz C
PLCγ : Fosfolipaz C Gama
PS : Fosfatidil serin
PSA : Prostata Özgü Antijen
PTEN : Fosfataz ve tensin homoloğu
PTPRD : Protein Tirozin Fosfataz Reseptör Tip D
RBM10 : RNA Bağlayıcı Motif Protein 10
RET : Rearranged during transfection
RIP : Receptor-interacting protein
RNA : Ribonükleik asit
ROS1 : ROS Proto-Onkogen 1, Reseptör Tirozin Kinaz
RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium
SMAC : İkincil mitokondri türevli kaspaz aktivatörü
SqCC : Skuamöz Hücreli Karsinoma
SRB : Sulforhodamine B

STAT : Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
STAT3 : Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü-3
STK11 : Serin/Threonin Kinaz 11
STR : Kısa Ardışık Tekrar Bölgeleri
TCA : Trikoloroasetik asit
TKI : Tirozin Kinaz İnhibitör
TNF : Tümör nekrozis faktör
TP53 : Tümör protein 53
TRADD : Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1-Associated DEATH Domain Protein
TRAIL : TNF-ilişkili apoptozis indükleyici ligand
TRK : Tropomiyosin Reseptör Kinaz
TTF-1 : Tiroid Transkripsiyon Faktörü-1

GİRİŞ

Kanser, hücresel genomdaki değişikliklerden kaynaklanan, yüksek küresel ölüm oranına sahip, insan sağlığına ciddi bir tehdit oluşturan; karmaşık, çok faktörlü bir hastalıktır. Ayrıca gelişmekte olan ülkelerde başlıca ölüm nedeni, gelişmiş ülkelerde ise ikinci önde gelen ölüm nedenidir. Kanser oluşumu esas olarak, proto-onkogenin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genin inaktivasyonu ile indüklenen anormal hücre büyümesinden kaynaklanır. Hücre proliferasyonu ile hücre ölümü arasındaki dengesizlik, tümör hücrelerinin hızlı artışını belirler (Gurunathan ve ark., 2021; Jiang ve ark., 2020).

Akciğer kanseri tüm dünyada en sık görülen malignitedir ve kansere bağlı ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer alır. Akciğer kanserinde ölüm oranı, her ülkenin ekonomik gelişme derecesine, sosyal ve yaşam tarzı faktörlerine bağlıdır. Akciğer kanseri, yüksek metastatik kapasiteye sahip olması ve yüksek tekrarlama riski taşıması nedeniyle en agresif kanser türlerinden biridir. Tüm kanser ölümlerinin yaklaşık dörtte birinden sorumludur. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) olmak üzere iki türü vardır; tüm akciğer kanseri vakalarının %85'ini KHDAK oluşturur. (Herbst ve ark., 2018; Siegel ve ark., 2020).

Akciğer kanserinin klinik belirtileri karmaşıktır. Semptomların ve belirtilerin varlığı, ciddiyeti ve görünümü; tümörün konumuna, patolojinin tipine, metastaz ve komplikasyonların varlığına/yokluğuna, hastanın tepkisine ve toleransına bağlıdır. Şu anda, akciğer kanseri için ana tedavi yöntemleri arasında cerrahi, kemoterapi, radyasyon tedavisi ve moleküler hedefli tedavi yer almaktadır (Lin ve ark., 2020).

Apoptoz; çok çeşitli uyaran ve koşullar altında hasarlı veya gereksiz hücreleri uzaklaştırarak dokulardaki hücresel bileşeni kontrol eden, homeostatik bir mekanizma olarak hücresel gelişim veya yaşlanma sırasında meydana gelen, programlanmış hücre ölümüdür. Karsinomlar başta olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Apoptoz, mitokondriyal yolun ana yol olduğu bir dizi protein ve gen düzenlemesini içerir. Apoptotik sinyalin düzensizliği ve uygun olmayan apoptoz, birçok hastalığın ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde rol oynamaktadır. Tümör hücrelerinin apoptozunu indüklemek, kanser tedavisinde bir strateji olarak kullanılmaktadır (Boraldi ve ark., 2021; Yang ve ark., 2021).

Apoptoz en çok araştırılan hücre ölüm yollarından biridir. Apoptozun azalması sonucu tümör gelişimi yani kanser meydana gelebilmektedir (Indran ve ark., 2011). Yeni ilaç ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi için apoptozun moleküler yolaklarının anlaşılması önemlidir. Kişiye ve tümöre özel bir yaklaşım olan ilaç hedefleme terapileri, apoptoz yolağını hedeflemesi nedeniyle birçok alternatif potansiyel tedavi arasından tercih edilmektedir (Gopinath ve ark., 2010).

Bor, periyodik cetvelin 5. elementi ve 3A grubu içerisinde tek ametal olup "B" simgesi ile gösterilir. Bor, silisyumdan sonra doğada en çok bulunan elementlerden biridir. Bor doğada elementel halde bulunmaz, sıklıkla borik asit veya boronax formunda bulunur. Fiziksel ve kimyasal özellikleri karbon elementine çok benzediğinden periyodik tabloda karbon elementinin yanında yer alır. Bu sebeple sağlık alanında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Bor sağlık alanının yanı sıra cam, temizlik, endüstri, tarım, gıda, kozmetik gibi birçok alanda da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Borun en geniş kaynakları dünya rezervinin %73,5'iyle Türkiye'de bulunmaktadır (Kuru ve Yarat, 2017; İdiz ve ark., 2018).

Yapılan araştırmalarla borun insan sağlığı için önemli bir element olduğu gösterilmektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak, çalışmamızda akciğer kanseri hücreleri üzerinde borik asitin anti-proliferatif ve apoptotik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

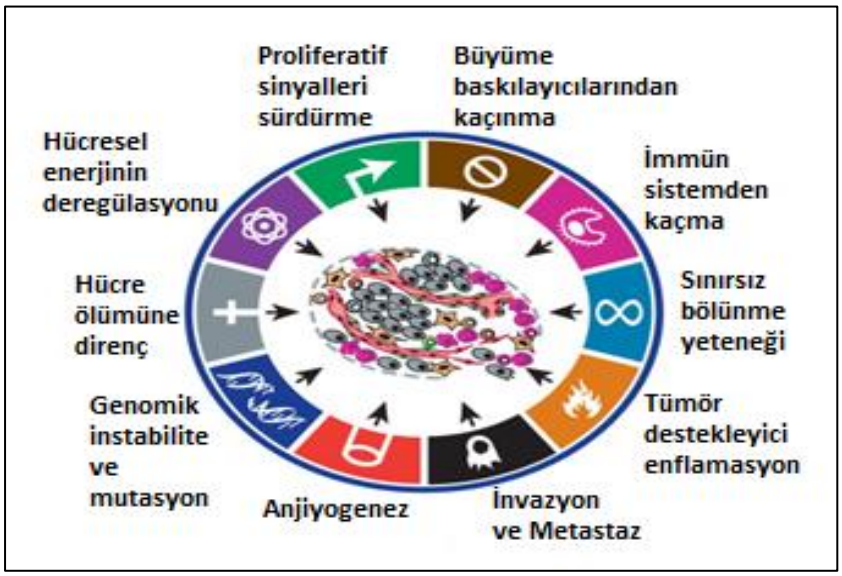
1. GENEL BİLGİLER

1.1. KANSER

Kanser en eski kayıtları M.Ö. 3000 yılına kadar dayanan ve günümüzde de insanlar arasındaki en yaygın hastalıklardan biridir. Kelime anlamı olarak Yunanca'da yengeç anlamında 'canker' veya 'carnicos' kelimesinden türemiştir. Bu tabir Romalı hekim Hipokrat (M.Ö. 460-370) tarafından ilk defa M.Ö. 3'te tümörün etrafındaki damarların şişmesini yengecin bacaklarına benzetmesi ile ortaya çıkmıştır. Bu terimi, Romalı hekim Celcus (M.Ö. 28-50) Latincede "cancer" olarak kullanmıştır. Bir diğer Romalı hekim Galen ise oluşan tümörleri belirtmek için Yunanca'da şişlik manasına gelen "oncos" kelimesini kullanmıştır (Baykara, 2015).

Kanser**,** sağlıklı hücrelerin işleyişini sağlayan mekanizmaların bozulmasıyla oluşan bir hastalıktır. Hücrelerin anormal bir şekilde büyümesi, çoğalması ve vücudun diğer bölgelerine yayılmasını engelleyen kontrol mekanizmalarındaki anomallikler kanser hücrelerinin karakteristik özelliklerindendir (Hejmadi, 2010).

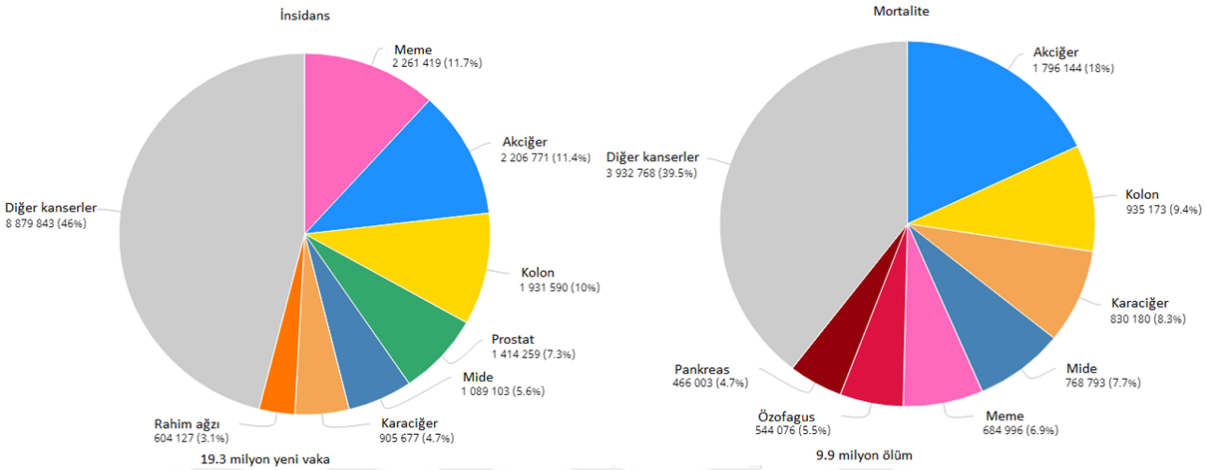
Kanserin büyüme ve metastazını etkileyen ayırt edici on özelliği vardır ve bunları anlamak kanser biyolojisinin temellerini oluşturur (Şekil 1.1.) (Hanahan ve Weinberg, 2011).



Şekil 1.1. Kanser hücresinin başlıca özellikleri

Kanser bulaşıcı olmayan dört hastalıktan biridir ve insan ölümlerinin ~%14,6'sını oluşturmaktadır. İnsan vücudunu etkilediği bilinen 100'den fazla farklı kanser türü ve kanserle ilişkili 500'den fazla gen bulunmaktadır (Pavlopoulou ve ark., 2015).

Dünya çapında ölüm nedenlerinden ikincisi kanserdir ve her 6 ölümden 1'i kanserden kaynaklanmaktadır. Kadınlarda en sık meme, kalın bağırsak, akciğer, rahim ağzı ve tiroid kanserleri görülmekte olup erkeklerde ise en yaygın olarak akciğer, prostat, kalın bağırsak, mide ve karaciğer kanserleri bildirilmiştir (Sung ve ark., 2021).



Şekil 1.2. Dünya genelinde kanser çeşitlerine göre insidans ve mortalite oranları (Sung ve ark., 2021)

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre yeni kanser vakalarında kadınlarda ilk sırada meme kanseri bulunurken, erkeklerde ise akciğer kanseri yer almaktadır. Ölümle sonuçlanan kanser vakalarında kadınlarda sırayla meme, akciğer ve kolon kanseri iken; erkeklerde akciğer, karaciğer ve kolon kanseri gelmektedir (Sung ve ark., 2021).

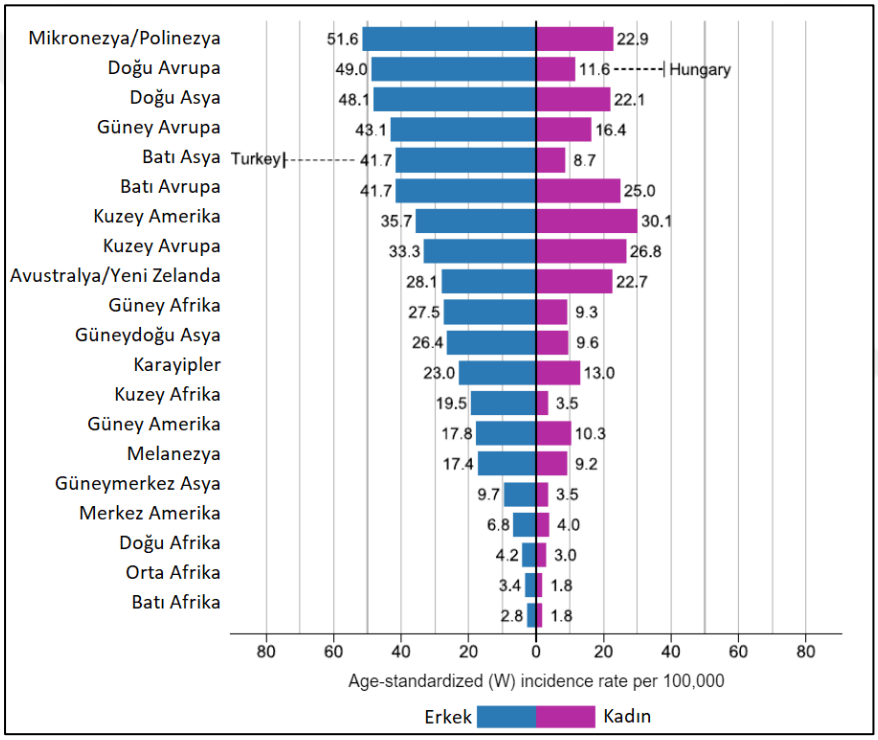
IARC (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı), kanser artışının bu şekilde devam etmesi durumunda, Dünya'da yeni kanser vakalarının 2040 yılına kadar 30,2 milyona ulaşabileceğini bildirmiştir (WHO, 2021).

1.2. AKCİĞER KANSERİ

1.2.1. Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi

Akciğer kanseri hem kadın hem de erkekler için kansere bağlı ölümlerin en sık nedenidir. Dünyada 2020 yılında 2,2 milyon hasta akciğer kanseri tanısı almış olup, akciğer kanseri nedeniyle 1,79 milyon ölüm olduğu bildirilmiştir.

GLOBOCAN verilerine göre 2020 yılında kadınlarda toplam 9,3 milyon kanser vakasının 770.828'i; erkeklerde ise 10,1 milyon kanser vakasının 1,4 milyonu akciğer kanseridir (Sung ve ark., 2021).



Şekil 1.3. Akciğer kanserleri için cinsiyete göre bölgelere özgü yaşa standardize edilmiş insidans oranları (Sung ve ark., 2021)

2020 verilerine göre Türkiye'de insidans ve mortalitede akciğer kanseri ilk sıradadır. Erkeklerde insidans ve mortalitede ilk sırada akciğer kanseri yer almaktadır. Kadınlarda ise mortalitede meme kanserinden sonra, insidansta meme, tiroid ve kolorektal kanserlerinden sonra 4. sırada bulunmaktadır. Yeni akciğer kanseri tanısı alan hasta sayısının 41.264 olduğu ve tanısı konulan bu hastaların tüm kanser vakalarının %17,6'sını oluşturduğu görülmektedir. Akciğer kanseri nedeniyle 37.070 ölüm olduğu bildirilmiştir.

Türkiye'de akciğer kanserinin hem erkek hem kadınlarda son 5 yıllık tahmini prevalansı tüm kanserler içinde %14,4 (83.973) olarak raporlanmıştır (WHO, 2021).

Akciğer kanserinin sıklıkla 50 ile 70 yaşları arasında görüldüğü bildirilmiştir. Sigaraya başlama yaşı azaldıkça ve sigara tüketimi arttıkça akciğer kanserinin görülme yaşı da düşmektedir. Türkiye'de yayınlanan bir çalışmada akciğer kanseri erkeklerde en sık 70 ile 74, kadınlarda ise en sık 80 ile 84 yaşları arasında görüldüğü belirtilmiştir (Özsu ve Özlü, 2013).

Türk Toraks Derneği tarafından 2009'da yapılan 'Türkiye'nin Akciğer Kanseri Haritası' araştırmasında her sene 29.314 yeni akciğer kanseri vakası olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre akciğer kanserlerinin %80,7'si KHDAK, %16,4'ü KHAK ve %2,9'u diğer akciğer kanseri alt tipleridir. İnsidans hızı, her iki cinsiyette de yaş ilerledikçe artmaktadır. Çalışma sonuçlarına göre Türkiye'de akciğer kanseri tanısı alan bireylerin %90,4'ü erkek olup yaş ortalaması 60'tır. Akciğer kanseri tanısı konulduğu sırada olguların sadece %16'sı cerrahi tedaviye uygun evrede teşhis edilmekte olup; %47'si metastatik evrede, %37'si ise lokal evrede olduğu görülmektedir (Göksel ve ark., 2013).

Dünyada insidans ve mortalite paternleri bazı bölgeler arasında birbirini yakından takip etmekle birlikte farklılıklar da göstermektedir. Bu durum yaş, kirlilik, radyasyon seviyesi, genetik, tütün maruziyetinin süresi, yoğunluğu, yaşam tarzı ve diğer çevresel faktörlerden kaynaklanmaktadır. ABD ve Birleşik Krallık'ta, ileri teknoloji ve farkındalık programları, akciğer kanserinin erken tanısını sağlayıp mortaliteyi azaltmaktayken; Mısır ve Hindistan gibi özel bilinçlendirme programlarının geliştirilmesi gereken ve daha etkili adımların gerekli olduğu bu ülkelerde ölüm oranı yüksektir (Dubey ve ark., 2016).

Güncel istatistik verilerine göre; akciğer kanseri insidansı erkeklerde azalma eğilimi göstermekte olup, sosyal ve kültürel sigara içme alışkanlıklarından dolayı, kadınlarda hastalık oranının yükseldiği bilinmektedir. Gelişmiş ülkelerde azalan sigara içme oranları ve tümörlerin moleküler profillemesiyle elde edilen bilgiler ile yeni risk faktörlerinin ve hastalık özelliklerinin belirlenmesi, akciğer kanseri epidemiyolojisinde değişikliklere yol açacaktır (Barta ve ark., 2019).

1.2.2. Akciğer Kanseri Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

1.2.2.1. Sigara ve tütün kullanımı

Akciğer kanserinde sigara kullanımı en büyük risk faktörü olarak gösterilmekte ve akciğer kanserlerinin %90'ından sorumlu tutulmaktadır. Tütün ürünleri ilk başlarda tıbbi ve ritüel amaçlı kullanılırken daha sonra enfiye, pipo, puro gibi şekillerde kullanılması, tütünü hastalıklara karşı risk faktörü haline getirmiştir (de Groot ve ark., 2018).

IARC, nikotininin kanserojen olmadığını ve sigara dumanında kanserojen olduğu kabul edilen polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler, N-nitrozamin, NNK ve benzen, vinil klorür, arsenik, krom gibi organik ve inorganik bileşikler dahil olmak üzere 60'ın üzerinde madde olduğunu bildirmiştir. Sigara dumanının karsinojenik etkisi, karsinojenlerin DNA'ya ulaşmasıyla birlikte hatalı kodlama ve mutasyon oluşturmasıyla ortaya çıkmaktadır (Barta ve ark., 2019).

1950 yılından bu yana yapılan çalışmalarla akciğer kanseri ve sigara arasındaki ilişki kanıtlanmış olup, 1960'lı yıllardan itibaren halk sağlığı ve diğer devlet otoriteleri tarafından kabul edilmiştir (Dela Cruz ve ark., 2011).

Uzun süreli sigara içenlerde akciğer kanseri riskinin, yaşam boyu sigara içmeyenlere kıyasla 10 ila 30 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir (Dela Cruz ve ark., 2011). Yapılan çalışmalarda, sigara içen 9 kişiden 1'inin akciğer kanserine yakalandığı görülmüştür (Jemal ve ark., 2005). Tütün kullanımının yarattığı risk birçok faktöre bağlıdır. Bunlar; sigara başlama yaşı, sigara tüketim miktarı, günlük içilen paket sayısı, soluma derecesi, filtresiz sigara kullanımı, nikotin ve katran içeriği gibi faktörlerdir (Harris ve ark., 2004).

Pasif içicilik Dünya çapında oldukça önemli bir problemdir ve çocukları %40, sigara içmeyen yetişkinleri ise %34 oranında etkilemektedir (Argüder, 2016). Akciğer kanserlerinin %1,6'sı pasif içicilikten kaynaklanmaktadır (Molina ve ark., 2008). Yapılan bir çalışmada, çocukluk döneminde pasif sigara içmenin yetişkinlikte akciğer kanseri riskini 3,6 kat artırdığı tespit edilmiştir (Vineis ve ark., 2005).

1.2.2.2. Mesleki maruziyetler

IARC tarafından asbest, radon, arsenik, kadmiyum, Bis(chloromethyl) ether, nikel, berilyum, silika, kromiyum gibi birçok mesleki karsinojen tanımlanmıştır. Tüm akciğer kanserlerinin yaklaşık %10'unun mesleki maruziyet sebebiyle olduğu düşünülmektedir (Spyratos ve ark., 2013).

Mesleki ve çevresel maruziyette en önemli ve tehlikeli madde asbesttir. Asbestin kesin olarak akciğer kanserine yol açtığını Çevresel Koruma Ajansı ve DSÖ 1980 yılında bildirmiştir. Asbest IARC sınıflamasında, kesin kanserojen (Grup 1) sınıfında yer almaktadır. Tek başına asbest maruziyeti akciğer kanseri için 5 kat risk oluşturmaktadır. Asbest ve sigara birlikte maruziyeti akciğer kanseri riskini 50 ile 90 kat artırdığı bildirilmiştir (Üzmezoğlu ve Töreyin, 2017).

1.2.2.3. Cinsiyet ve yaş

Akciğer kanseri vakalarının yaklaşık %53'ü 55-74 yaş arası bireyler olup, tanı yaşı her iki cinsiyette de ortalama 70 olarak kabul edilmektedir. Tespit edilen vakaların %37'si 75 yaş üstü, %10'u ise 55 yaşın altındadır (de Groot ve ark., 2018).

Kadınların tütünün karsinojenik etkilerine erkeklerden daha yatkın oldukları ve kadınlarda sigara ile ilişkili olmayan akciğer kanseri insidansının erkeklere göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Wakelee ve ark., 2007).

1.2.2.4. Beslenme

Çeşitli çalışmalar, obezite ve bazı diyet faktörlerinin akciğer kanseri ile bağlantılı olduğunu ortaya koymuştur. Serumda Beta karoten, C-vitamini ve alfa-tokoferolün düşük düzeyde olması akciğer kanseri gelişimiyle ilişkilendirilmektedir. Ekmek, pirinç, kırmızı et, süt ürünleri, bitkisel ve hayvansal yağlar başta olmak üzere birçok gıda akciğer kanseri gelişimi için muhtemel risk faktörleridir (Akhtar ve Bansal, 2017). Yapılan vaka kontrol çalışmalarında; meyve ve sebze (özellikle turpgiller) ağırlıklı bir diyetin akciğer kanserine karşı anti-kanser bir etkisi olabileceği belirtilmiştir (Lam ve ark., 2009).

1.2.2.5. Diğer akciğer hastalıkları

Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), pnömoni, kronik bronşit, tüberküloz, amfizem, pulmoner fibroz ve asbestozis de dahil olmak üzere bazı akciğer hastalıkları, akciğer kanseri riskiyle ilişkilendirilmiştir. Bunların başında akciğer kanseri ile ortak risk faktörü olarak sigara kullanımını paylaşan KOAH gelmektedir. Yapılan çalışmalar KOAH'ın özellikle erkeklerdeki artmış akciğer kanseri riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu hastalıkların akciğer dokusu üzerinde inflamatuar etkilere sahip olmaları, artmış akciğer kanseri riski ile aralarındaki ilişkiyi açıklamaktadır (Brenner ve ark., 2011; Ballester ve ark., 2019).

1.2.2.6. Genetik faktörler

İnsanlarda akciğer kanserine genetik yatkınlık ilk olarak 1960'ların başında bildirilmiştir (Miller, 2005). Akciğer kanserine yol açan intrinsik faktörler de bulunmaktadır. Örneğin aile öyküsü akciğer kanseri riski ile doğru orantılıdır. Sigara kullanımı olmayan ve akciğer kanseri öyküsü olanlarda riskin 1,7 kat arttığı gösterilmiştir (Lissowska ve ark., 2010).

Çalışmalar tütün kaynaklı kanserojenlerin metabolizmasıyla büyük oranda ilişkili olan spesifik genler üzerine yoğunlaşmıştır. Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarına (GWA) göre akciğer kanseri ile önemli ölçüde ilişkili olabilecek 15q24-25.1, 5q15.33 ve 6p21 kromozomlarında üç ana yatkınlık lokusu tanımlanmıştır (Brennan ve ark., 2011).

1.2.3. Akciğer Kanserinin Sınıflaması

ATS/IASLC/ERS tarafından 2011 yılında revizyonu önerilen yeni Akciğer, Plevra, Timus ve Kalp Tümörlerinin sınıflaması, 2015 yılında DSÖ tarafından kabul edilmiştir ve günümüzde halen bu sınıflama kullanılmaktadır (Travis ve ark., 2015). Bu güncellemeye göre akciğer kanserleri; epitelyal tümörler, mezenkimal tümörler, lenfohistiositik tümörler, ektopik orijinli tümörler ve metastatik tümörler olarak beş ana grupta toplanmıştır.

Akciğer kanserinin histolojik olarak sınıflandırılması, tanı ve tedaviye multidisipliner yaklaşımda önem arz etmektedir (Zheng, 2016).

Akciğer kanseri tipik olarak, bronşlar ile bronşiyoller veya alveoller gibi akciğer kısımlarını düzenleyen hücrelerde başlayan, agresif ve heterojen bir hastalıktır (Herbst ve ark., 2018). Akciğer epitelinden köken alır ve klinik, histolojik ve nöroendokrin özelliklerine göre 2 alt türe ayrılır: küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK) ve Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) (Schabath ve Cote, 2019).

Akciğer kanserlerinin çok büyük kısmı epitelyal tümörlerdir. KHAK, en agresif şeklidir ve tüm akciğer kanserlerinin %15-20'sini oluşturur. KHDAK ise akciğer kanserlerinin %80-85'ini oluşturur ve bunların yaklaşık %60'ı adenokarsinomlardır (Yıldız, 2017; Herbst ve ark., 2018).

İnsan kapsamlı moleküler karakterizasyon projeleri; akciğer kanserinde DNA alterasyonu, DNA metilasyonu, mikroRNA ekspresyonu, mRNA ekspresyonu ve protein ekspresyonu gibi moleküler özelliklerindeki farklılıklar sebebiyle yeni alt tipler tanımlamıştır (Inamura, 2017).

DSÖ'nün 2015'te yapmış olduğu Akciğer Kanseri Sınıflandırması Tablo 1.1.'de verilmiştir (Zheng, 2016).

Tablo 1.1. DSÖ 2015 akciğer kanseri sınıflandırması (Zheng, 2016)

Adenokarsinoma • Lepidik Adenokarsinoma • Asiner Adenokarsinoma • Papiller Adenokarsinoma • Mikropapiller Adenokarsinoma • Solid Adenokarsinoma • Invaziv Müsinöz Adenokarsinoma • Kolloid Adenokarsinoma • Fetal Adenokarsinoma • Enterik Adenokarsinoma • Minimal İnvaziv Adenokarsinoma	**Tükürük Bezi Tipi Karsinomalar** • Mukoepidermoid karsinoma • Adenoid Sistik karsinoma • Epitelyal-Miyoepitelyal karsinoma
Nöroendokrin Tümörler • Karsinoid Tümörler - Tipik Karsinoid - Atipik Karsinoid • Küçük Hücreli Karsinoma • Büyük Hücreli Nöroendokrin Karsinoma	**Sınıflanmamış ve Diğer Karsinomalar** • Lenfoepiteliyoma Benzeri Karsinoma • NUT Karsinoma
Skuamöz Hücreli Karsinoma	**Mezenşimal Tümörler**
Büyük Hücreli Karsinoma	**Lenfohistiyositik Tümörler**
Adenoskuamöz Karsinoma	**Ektopik Kökenli Tümörler**
Pleomorfik Karsinoma	**Metastatik Tümörler**
Mil Hücre Karsinoma	**Karsinosarkoma**
Dev Hücreli Karsinoma	**Pulmoner blastom**

1.2.3.1. Küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK)

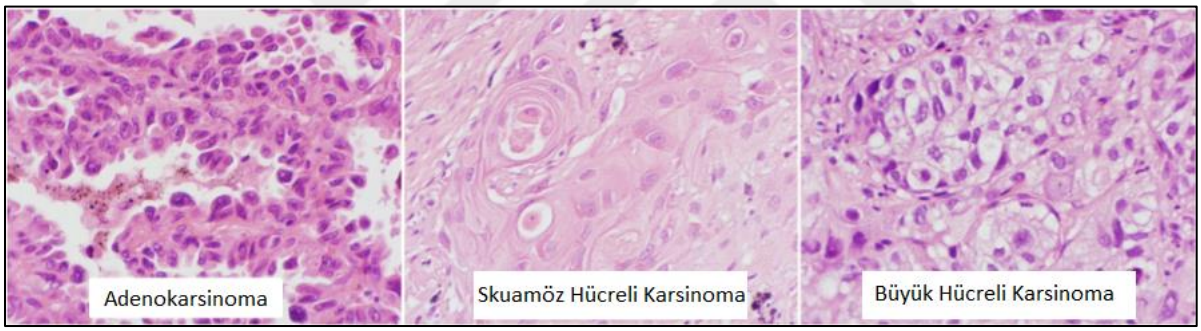
KHAK, tüm akciğer kanseri vakalarının %15'ini oluşturan, genellikle sigara ile ilişkili, birçok vakanın ileri evrede tanı konulduğu akciğer kanserlerinin en agresif türüdür. KHAK çoğunlukla akciğerlerin bronşlarında bulunur. Mikroskoptaki görünümlerinden dolayı küçük hücreli olarak adlandırılır. Tipik olarak tümör hücreleri; dar sitoplazmalı, yuvarlak veya fuziform küçük nükleuslu, yığılma artefaktı oluşturan, yüksek mitotik aktiviteye sahip ince granüler kromatin içerirler. Nekroz sık ve yaygın görülür. KHAK ana tipleri küçük hücreli karsinom ve kombine küçük hücreli karsinomdur (Travis, 2012; Travis ve ark., 2015; Pietanza ve ark., 2015).

1.2.3.2. Küçük hücreli dışı akciğer kanseri (KHDAK)

KHDAK, akciğer kanserinin en yaygın görülen tipidir ve yaklaşık %80-85' ini oluşturur. KHAK olmayan herhangi bir akciğer kanseri de KHDAK olarak kabul edilir (Detterbeck ve ark., 2015). KHDAK'lar santral bronş epitellerinden terminal alveollere kadar solunum yolunun herhangi bir bölgesinden köken alabilirler (Travis ve ark., 2015).

Erken evrelerde asemptomatik seyretmesi sebebiyle çoğunlukla ileri evrelerde tanı konulabilmektedir. Erken evrelerde tanı konulan ve cerrahi tedavi alan vakalar haricinde sağkalım oranları düşük seyretmektedir (Perez-Moreno ve ark., 2012; Miller ve ark., 2016).

KHDAK alt kategorileri genellikle adenokarsinoma, büyük hücreli karsinoma ve skuamöz hücreli karsinomadır. Adenokarsinoma ve skuamöz hücreli karsinoma diğer KHDAK alt tiplerinden daha sık görülür. Büyük hücreli karsinoma, adenoskuamöz karsinoma ve bronkoalveolar karsinoma alt tiplerine ise daha az rastlanır (Inamura, 2017).



Şekil 1.4. Adenokarsinoma, skuamöz hücreli karsinoma ve büyük hücreli karsinomanın histolojik profili (Motadi ve ark., 2007)

Adenokarsinoma, en sık görülen KHDAK türüdür. Adenokarsinoma, KHDAK'nin %60'ını, akciğer kanserlerinin %40'ından daha fazlasını ve cerrahi olarak rezeke edilen vakaların %70'inden fazlasını oluşturur (Zheng, 2016). Kökenini terminal bronşiol epitelinden alır. Tümör, histopatolojik açıdan genellikle kompleks heterojen bir yapı gösterir. Genelde sigara öyküsü olmayan kişilerde, parankimde var olan skar dokusundan oluşabilir ve "skar karsinomu'' olarak da isimlendirilir (Yener ve Apa, 2014).

Adenokarsinomalar, santral fibrozis ve plevral büzüşmeli olarak akciğerin periferine yerleşimli bir kitle meydana getirirler. Adenokarsinoma, müsin üretimi veya glandüler farklılaşma ile malign epitelyal neoplazm olarak tanımlanabilir. Bu tür morfolojik özellikler tespit edildiğinde, küçük biyopsi materyallerinde teşhis edilebilirler.

Adenokarsinoma hücreleri çoğunlukla pnömositik belirteçleri eksprese eder. Adenokarsinoma vakalarının %85'inden fazlasında Tiroid Transkripsiyon Faktörü 1 (TTF-1) ve NapsinA eksprese edilir.

Adenokarsinomalarda çoklu gen değişiklikleri meydana gelebilir ve hasta sağkalımını iyileştirmek için onaylanmış moleküler hedefe yönelik tedavi yöntemleri mevcuttur (Zheng, 2016). Adenokarsinomalarda en sık *EGFR, KRAS, MAP2K1, BRAF, ALK, ROS-1, RET, NTRK, MET* genlerindeki mutasyonlar gözlenmektedir (Detterbeck ve ark., 2015; (Travis ve ark., 2015).

Skuamöz hücreli karsinoma (SqCC), KHDAK'nin ikinci en sık görülen türü olup, akciğer kanserlerinin yaklaşık %25-30'unu oluşturmaktadır (Lemjabbar-Alaoui ve ark., 2015). Sıklıkla akciğerin orta bölümünde, ana hava yolları boyunca oluşur ve büyük bir boyuta geldiğinde boşluklar meydana getirebilir. SqCC, keratinizasyon veya hücreler arası köprü oluşumları ile karakterize olan, immünhistokimyasal belirteçlere sahip epitelyal tümörler olarak tanımlanabilir (Zheng, 2016).

SqCC, sıklıkla merkezi konumda yer alır ve bir ana veya lob bronşta ortaya çıkar. Histolojik açıdan bazaloid, keratinizasyon gösteren ve göstermeyen olmak üzere farklı alt tipleri bulunur (Dela Cruz ve ark., 2011; Travis ve ark., 2015).

FGFR-1 geninde meydana gelen amplifikasyonlar, SqCC gelişiminde en sık gözlenen genetik anomalidir (Sakashita ve ark., 2014). Ayrıca *PRKCB, PRKCA, PKN1, FGR, FGFR2* ve *FGFR3* genlerinde meydana gelen mutasyonlar da görülür (Lemjabbar-Alaoui ve ark., 2015).

Büyük hücreli karsinoma (BHK), küçük hücreli karsinoma, adenokarsinoma veya SqCC'nın sitolojik, mimari ve immünohistokimyasal özelliklerinden yoksun ve ayrıca glandüler veya skuamöz olarak farklılaşmamış bir KHDAK olarak tanımlanır (Travis ve ark., 2015).

BHK, ilk defa 1991'de Travis ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olup, KHDAK'lerinin endokrinolojik bulguları olan yüksek gradeli bir alt tipidir (Travis ve ark., 1991). Büyük hücre boyutu, bol nekroz alanları, düşük nükleer/sitoplazma oranı, yüksek mitotik hız gibi tanımlayıcı sitolojik özelliklerle küçük hücreli karsinomadan ayırt edilirler.

BHK'ların akciğer kanseri hastalarında görülme sıklığı yaklaşık %3 olarak bildirilmiştir (Fasano ve ark., 2015). Nadir görülen, agresif bir tümör olup kötü huylu potansiyele sahiptir. BHK, sigara içenlerde, erkeklerde ve ileri yaşta daha sık görülmektedir. BHK histolojik olarak heterojendir ve adenokarsinoma veya SqCC gibi diğer akciğer kanseri tipleriyle kombinasyonlar halinde de görülebilirler (Kupeli ve Koseoglu, 2018).

1.2.4. Akciğer Kanseri Evrelemesi

KHDAK evrelemesi, primer tümörün boyutu ve tümörün vücutta yayılma ölçüsünün belirlendiği süreçtir. TNM evrelemesi primer tümörün (T) özelliklerine, lenf nodu tutulumunun derecesine (N) ve metastazın (M) varlığına veya yokluğuna dayanır. TNM evreleme sistemi tedavinin yönetimine rehberlik eder, klinik ve prognoz araştırmalar hakkında bilgi verir ve uluslararası karşılaştırmalara olanak sağlar. KHAK'nde cerrahi, tedavide kısıtlı bir alana sahip olduğundan, TNM evrelemesi kullanılmamaktadır. En sık "sınırlı" ve "yaygın" şeklindeki ikili evreleme sistemi kullanılmaktadır (Tsim ve ark., 2010). Akciğer kanseri evrelemesinde, TNM sistemi ilk olarak 1946'da Denoix tarafından kullanılmıştır (Motta ve ark., 1995).

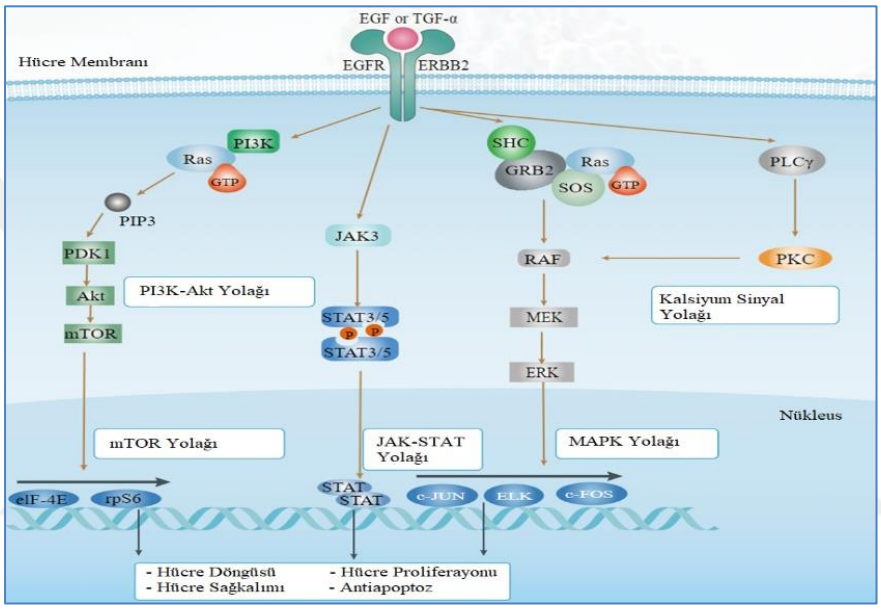
1.2.5. Akciğer Kanserinde Moleküler Değişiklikler

Kanser Genom Atlası (CGA), akciğer kanserinin patogenezinde rol oynayabilecek ve potansiyel tedavi için hedef sunabilecek çeşitli mutasyonların ve yolakların keşfedilmesine yol açmıştır. Bu genomik testler, klinisyenlerin akciğer kanserinin heterojen doğasını anlamalarına yardımcı olmuştur ve hassas onkoloji alanını genişletmiştir (2014).

Akciğer kanserinin patogenezi, uzun bir süre boyunca çoklu moleküler anomallilerin birikmesini içerir. Değişiklikler; DNA metilasyonu, DNA dizisi değişiklikleri, DNA segment amplifikasyonu/delesyonu veya tam kromozom kazanımları/kayıpları yoluyla gen susturma seviyesinde gerçekleşebilir. Bu değişiklikler, kanser hücresi özelliklerine sahip olmayan normal görünümlü dokularda erken dönemde meydana gelmektedir (Massion ve Carbone, 2003).

1.2.5.1. EGFR

Epidermal büyüme faktörü reseptörü (*EGFR*), ErbB ailesinin üyesi olan tirozin kinaz reseptörü olup çoğu epitel kanser türünde anormal şekilde aktive olur. ErbB ailesi *EGFR* (ErbB1), *ERBB2* (HER2/neu), *ERBB3* (HER3) ve *ERBB4* (HER4) içerir. *EGFR*'nün otofosforilasyonu ve aktivasyonu; hücre proliferasyonu, farklılaşması, anjiyogenez, invazyon ve metastazdan sorumlu olan PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT ve RAS/RAF/MAPK sinyal yolaklarını aktive eder (Cooper ve ark., 2013; Hsu ve ark., 2019).



Şekil 1.5. *EGFR* sinyal yolağı (Creative Biolabs, 2021)

EGFR, hücre büyümesini ve proliferasyonunu teşvik eden sinyallerin iletilmesinde merkezi bir rol oynar. *EGFR* mutasyonları akciğer adenokarsinomalarının yaklaşık %20-30'unda; SqCC'da ise nadir görülür (Diniz ve ark., 2017).

EGFR aşırı ekspresyonunun, KHDAK'nin %60'ında ortaya çıktığı ve kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Hsu ve ark., 2019).

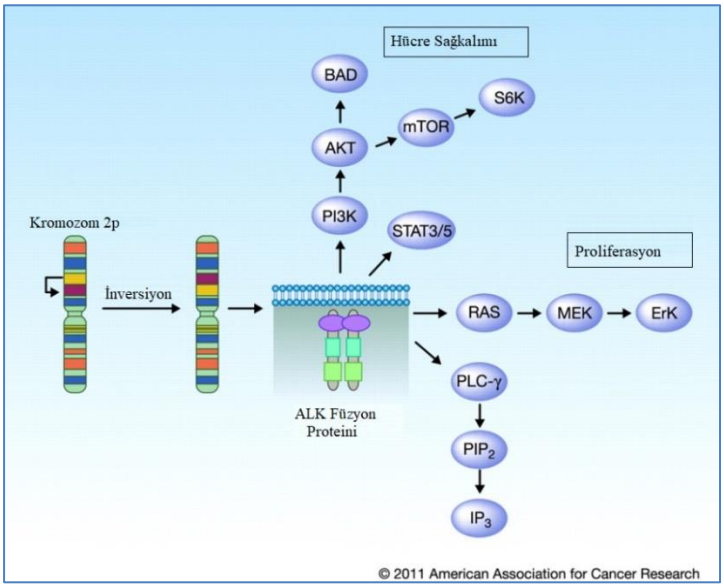
EGFR geni 28 ekzondan oluşur ve tirozin kinaz alanı, 18-21 ekzonları tarafından kodlanır., *EGFR* mutasyonlarının %90'ını, aktive edici mutasyonlar (ekzon 18), delesyonlar (ekzon 19) ve ekzon 21'de meydana gelen L858R mutasyonu oluşturur. Bu mutasyonlara sahip tümörlerin *EGFR* tirozin kinaz inhibitörlerine (TKI) cevap oranı ~%70'tir. Ekzon 20 mutasyonları daha seyrektir ve *EGFR* inhibitörlerine direnç gösterdikleri tahmin edilmektedir (Ji ve ark., 2006; Roh, 2014).

EGFR-TKI ile yaklaşık 1 yıllık tedavi gören hastaların çok büyük bir kısmında direnç gelişmesi nedeniyle relaps görülür. Bunun en önemli sebebi, bu vakaların yaklaşık %60'ında *EGFR* geninde ortaya çıkan ikinci bir mutasyondur. En yaygın ikincil mutasyon, ekzon 20'deki T790M mutasyonudur (Ji ve ark., 2006; Pirker ve ark., 2010). *FGFR1*, *MET* ve *HER2* genlerinde meydana gelen amplifikasyonlarının da *EGFR*-TKI direncinde rol oynadığı gösterilmiştir (Minari ve ark., 2016).

1.2.5.2. ALK

İnsülin reseptör proteini olan *ALK* (Anaplastik lenfoma kinaz), tirozin kinaz ailesinin üyesi ve transmembran tirozin kinaz reseptörü proteinidir (Roskoski, 2013). *ALK* ilk olarak t(2;5) kromozom yeniden düzenlemesi ile anaplastik büyük hücreli lenfomada, nükleofozmin (NPM) füzyon partneri olarak tanımlanmıştır (Soda ve ark., 2007).

ALK yeniden düzenlenmesi, *ALK* ile *EML4* geninin birleşmesine neden olan kromozom 2p'de gerçekleşen (inv(2)(p21;p23)) inversiyon sonucu ortaya çıkar ve KHDAK'nin gelişiminde rol oynar (Takeuchi ve ark., 2008). Bu translokasyon, RAS/RAF/MEK, JAK/STAT ve PI3K/AKT/mTOR gibi aşağı akış onkojenik sinyal yolaklarının anormal aktivasyonuna neden olur ve hücre proliferasyonuna, invazyonuna ve apoptozun inhibisyonuna yol açar (Reungwetwattana ve Dy, 2013). *ALK/EML4* füzyon geni ilk olarak 2007 yılında Japonya'da sigara öyküsü olan KHDAK hastasında tanımlanmıştır (Soda ve ark., 2007; Martelli ve ark., 2009).



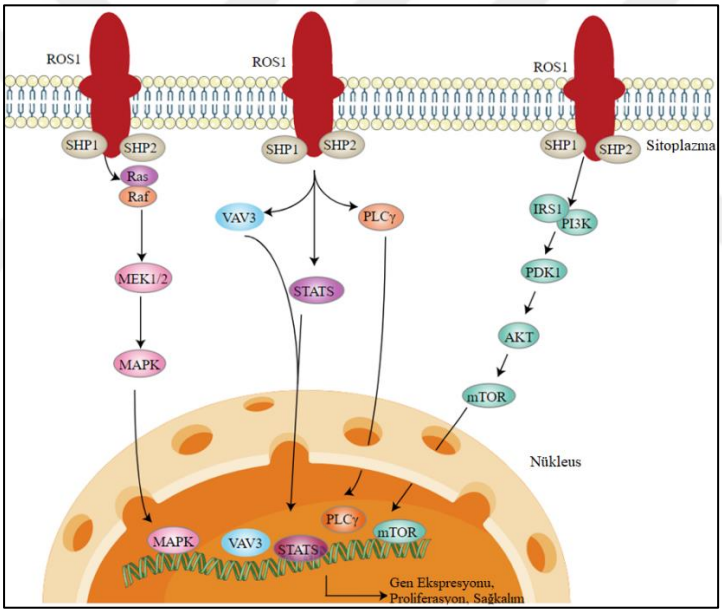
Şekil 1.6. *ALK* füzyon onkogenlerinin şeması ve önemli aşağı akış sinyal yolakları (Shaw ve Solomon, 2011)

ALK yeniden düzenlemeleri, genellikle genç, sigara içmeyen ve klinik olarak ilerlemiş akciğer adenokarsinomalı hastaların yaklaşık %4'ünde görülmektedir (Roh, 2014). KHDAK hastalarının yaklaşık %3 ile %5'inde mevcuttur (Ye ve ark., 2016).

1.2.5.3. ROS1

ROS1 (ROS Proto-Onkogen 1, Reseptör Tirozin Kinaz), kromozom 6q22.1 üzerinde bulunan insülin reseptör ailesinin transmembran tirozin kinaz reseptörlerini kodlayan bir proto-onkogendir. Protein kinaz alanı olarak *ALK*'a benzer (Cooper ve ark., 2013).

ROS1, PI3K/AKT/mTOR, RAS/MAPK/ERK ve STAT3 yolakları dahil olmak üzere hücre farklılaşması, proliferasyonu, büyümesi ve hayatta kalmasıyla ilgili çeşitli aşağı akış sinyal yolaklarını aktive etmektedir (Chin ve ark., 2012; Warth ve ark., 2014).



Şekil 1.7. *ROS1* sinyal yolağı (Creative Biolabs, 2021)

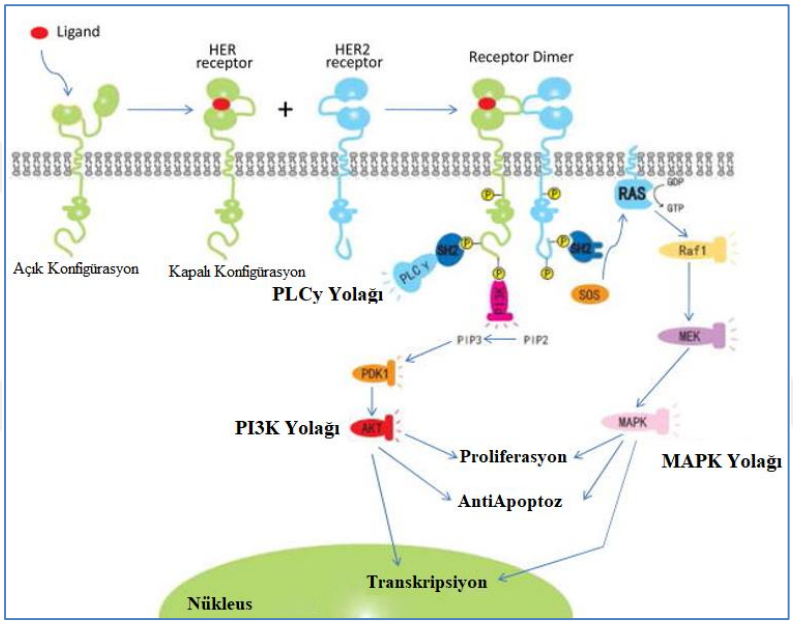
ROS1 gen füzyonları ilk olarak bir insan glioblastoma hücre hattında keşfedilmiştir ve KHDAK hastalarının %0,9-2 'sinde *ROS1* yeniden düzenlemesi tanımlanmıştır (Lin ve Shaw, 2017). Akciğer adenokarsinomalarında, *ROS1* bazı genlerle füzyon oluşturabilir, bunlardan en sık bilineni *CD74-ROS1* füzyonudur. Genç hastalar, kadınlar ve sigara içmeyenlerde *ROS1* füzyonu daha sık görülmektedir (Bergethon ve ark., 2012; Kohno ve ark., 2015).

ROS1 yeniden düzenlemeleri, *EGFR, KRAS* ve *BRAF* gibi diğer onkojenik değişikliklerle bir arada görülebilmektedir (Warth ve ark., 2014).

1.2.5.4. HER2

HER2 (Erb-B2 Reseptör Tirozin Kinaz 2), *HER1*, *HER3* ve *HER4*'i içeren insan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER) reseptör tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. Bu reseptörler, ligand bağlayıcı hücre dışı alan ve hücre içi tirozin kinaz alanından oluşur (Pillai ve ark., 2017).

HER2 anomalileri hem amplifikasyon hem de mutasyonlar dahil olmak üzere, onkojenik driver mutasyonlar olarak tanımlanmıştır (Liu ve ark., 2018). Bu anomaliler *HER2* aktivasyonuna yol açarak PI3K/AKT/mTOR ve RAS/RAF/MEK aşağı akış sinyal yolaklarını aktive etmiş olurlar (Pillai ve ark., 2017).



Şekil 1.8. *HER2* sinyal yolağı (Tai ve ark., 2010)

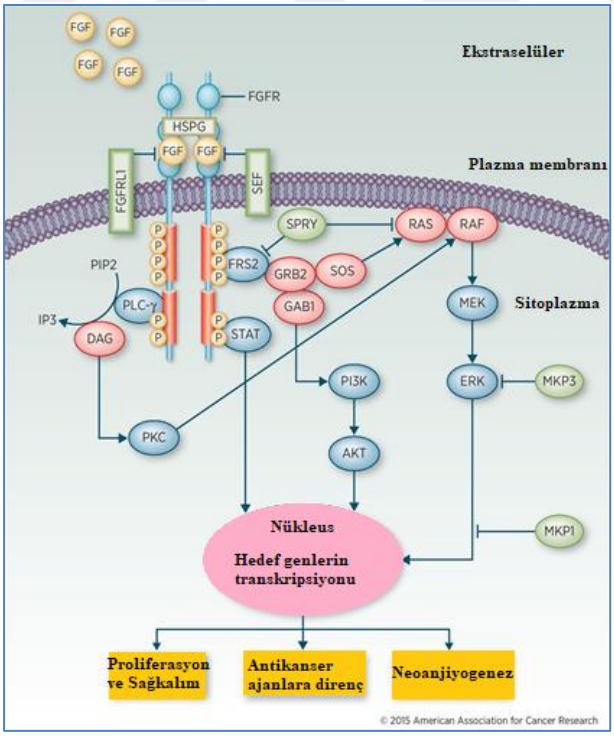
Akciğer adenokarsinomalı hastaların %2-3'ünde *HER2* mutasyonları, %2-5'inde ise *HER2* amplifikasyonları görülmektedir (Li ve ark., 2016). Akciğer kanserlerinde *HER2* somatik mutasyonları ilk olarak 2004 yılında Kanser Genom Projesi'nde raporlanmıştır. *HER2* mutasyonlarının hiç sigara içmeyen kadınlarda görülme olasılığı daha yüksek olup, hastaların genç ve medyan yaşı 60 olduğu bildirilmiştir (Pillai ve ark., 2017).

1.2.5.5. FGFR-1

FGFR (Fibroblastik Büyüme Faktörü Reseptörü) ailesi dört transmembran reseptör tirozin kinazdan oluşur; *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3* ve *FGFR4*. Bunlar, fibroblast büyüme faktörleri için hücre yüzeyi reseptörleri olarak işlev görür ve embriyonik gelişim, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre göçü kontrolünde kritik bir rol oynarlar (Russell ve ark., 2014).

FGFR geninde meydana gelen amplifikasyon, nokta mutasyonu veya translokasyonlar tümör patogenezinde önemli bir role sahiptir (Karachaliou ve ark., 2016).

FGFR tirozin kinazlar, RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT ve STAT yolakları dahil olmak üzere tümör büyümesi ve istilasında yer alan çoklu yolakları etkinleştirir. Kromozom 8p12'de yer alan *FGFR1* amplifikasyonu SqCC'de sık görülen moleküler değişikliktir (SenthilKumar ve ark., 2020). *FGFR1* amplifikasyonunun SqCC'inde %22'lik bir insidansa sahip olduğu ve aynı zamanda zayıf prognoz ve sigara içme öyküsü ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Boolell ve ark., 2015).

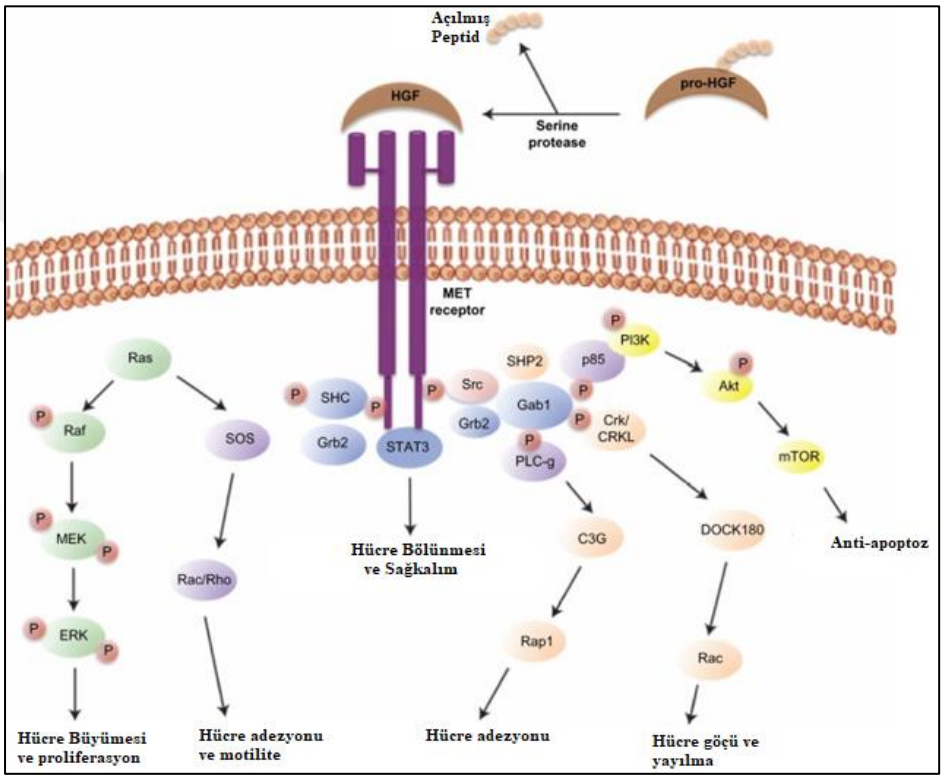


Şekil 1.9. Kanserde *FGFR*'nin yapısı (Touat ve ark., 2015)

FGFR1 amplifikasyonlarının, KHAK'lerinde yaklaşık %6 ve adenokarsinomalarda ise yaklaşık %1 oranında görüldüğü bildirilmiştir (Giacomini ve ark., 2020).

1.2.5.6. MET

MET (Mezenkimal epidermal transition), hepatosit büyüme faktörü (HGF) ligandı için transmembran tirozin kinaz reseptörünü kodlayan ve hücre proliferasyonu, hayatta kalma, istila, hareketlilik ve metastaz gibi çeşitli kanserojen süreçlerde yer alan bir proto-onkogendir. *MET*'in homodimerizasyonu ve otofosforilasyonu, RAS-RAF-MAPK ve PI3K-AKT-mTOR dahil olmak üzere çeşitli hücre içi sinyal yolaklarının aktivasyonuna yol açar (Sadiq ve Salgia, 2013; Rothschild, 2015).



Şekil 1.10. HGF-MET sinyal yolağı (Parikh ve ark., 2014)

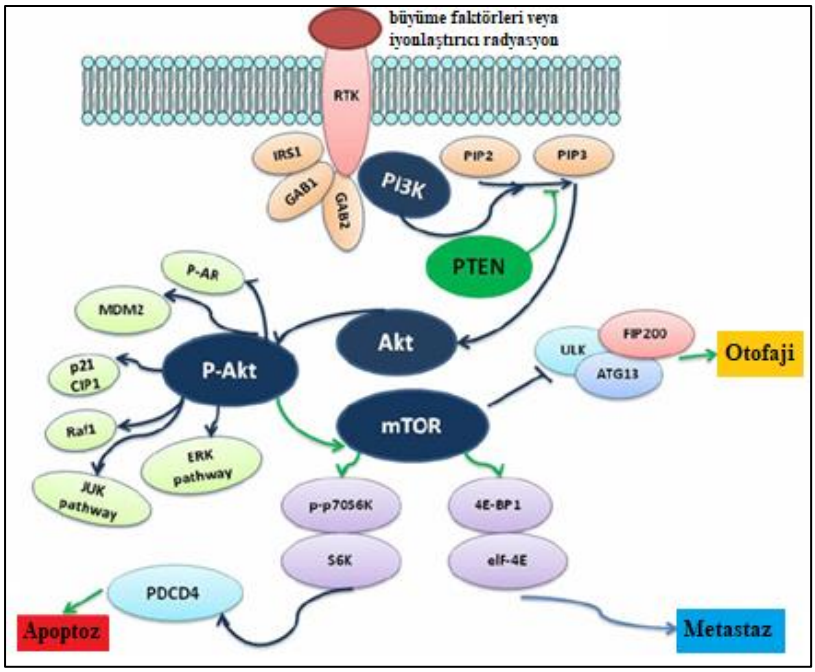
MET yolağı ilk olarak 1980'lerin ortalarında keşfedilmiş olup akciğer kanserinde meydana gelen düzensizliği 1990'larda bulunmuştur (Drilon ve ark., 2017).

MET amplifikasyonu KHDAK'inde %1-11 sıklıkta görülmektedir ve SqCC'inde adenokarsinomadan daha yaygın ortaya çıkar. Yüksek *MET* protein ekspresyonu genellikle kötü prognoz ile ilişkilidir (Roh, 2014).

1.2.5.7. PTEN

PTEN (Fosfataz ve tensin homoloğu); hücre büyümesi, hücre çoğalması ve hücre migrasyonu vb. hücresel fonksiyonlarını sağlayan, 10. kromozomun q23 bandında yer alan tümör supresör gendir (Depowski ve ark., 2001).

PTEN, tirozin-serin ve treonin-fosforile proteinlerini defosforile eden bir protein fosfatazdır. Aynı zamanda bir lipid fosfatazdır ve PI3K/AKT sinyal yolağının temel bir düzenleyicisidir (Cooper ve ark., 2013).



Şekil 1.11. PI3K/Akt/PTEN/mTOR sinyal yolağı (Chang ve ark., 2014)

PTEN geninde oluşan delesyon veya inaktive edici mutasyonlar, PI3K/AKT sinyal yolağında aşırı aktivasyonu meydana getirir ve birçok malignitede bu durum bildirilmiştir. PTEN inaktivasyonu, KHDAK hastalarında zayıf prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Pérez-Ramírez ve ark., 2015).

PTEN tümör supresör geni, çoğu kanserde mutasyon veya delesyona uğramıştır. *PTEN*'de meydana gelen heterozigotluk kaybı (LOH) ve somatik mutasyon, farklı kanserlerin oluşumunda *PTEN*'in önemli rol oynadığını göstermektedir (Kechagioglou ve ark., 2014). LOH, KHAK'inin %42'sinde ve KHDAK'inin %27'sinde gözlenmiştir ayrıca ileri tümör evresi ve metastazlarla ilişkilidir (Pérez-Ramírez ve ark., 2015).

PTEN mutasyonları, nadiren görülür ve KHDAK'inin yaklaşık %5'inde meydana gelmektedir. *PTEN* mutasyonları ve *PTEN* protein ekspresyon kaybı, SqCC'nde adenokarsinomaya göre daha yaygın görülür ve sigara içme öyküsü ile ilişkilidir (Cooper ve ark., 2013).

1.2.5.8. RET

Kromozom 10q11.21 bölgesinde bulunan *RET* geni, nöral krest kökenli dokularda ifade edilen, böbreklerin ve enterik sinir sisteminin gelişiminde işlev gören bir reseptör tirozin kinazı kodlar (Farago ve Azzoli, 2017; Takeuchi, 2019).

RET füzyonları; RET tirozin kinazın yapısal aktivasyonuna ve PI3K/AKT, MAPK ve JAK-STAT yolaklarının yanısıra PKC (Protein Kinaz C) ve PKA (Protein Kinaz A) yolaklarının da aktivasyonu ile hücre proliferasyonun artışı, sağ kalım, göç ve hücre farklılaşmasına yol açar (Bronte ve ark., 2019; Stinchcombe, 2020).

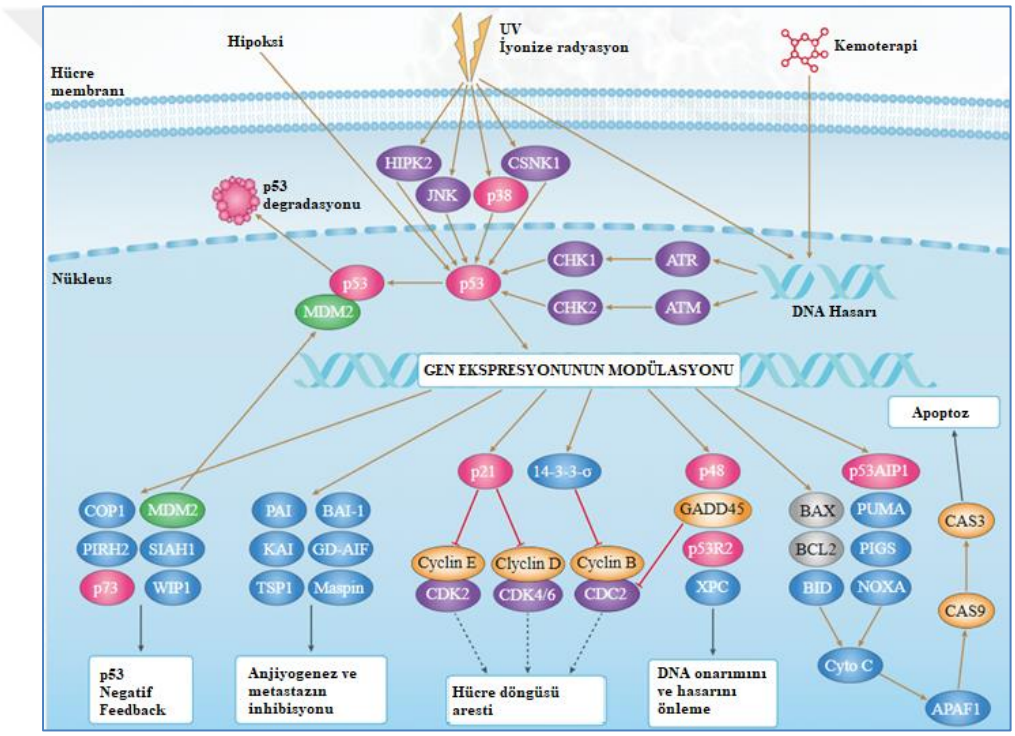
RET geninde meydana gelen translokasyon, bir dizi füzyon proteiniyle sonuçlanabilir. *RET* değişikliklerinin en sık rastlanan formu *KIF5B* (intron 15)-*RET* (intron 11) füzyonu olduğu gösterilmiştir (Kohno ve ark., 2015; Stinchcombe, 2020). Bugüne kadar, *KIF5B-RET* dahil olmak üzere KHDAK'nde en az 15 *RET* füzyonu bildirilmiştir.

RET füzyonu, insan kanser örneklerinde ilk olarak papiller tiroid karsinomasında *CCDC6-RET* formu ile tanımlanmıştır (Takeuchi, 2019). Akciğer kanserinde ise 2011 yılında adenokarsinomalı, sigara içmeyen genç bir erkek hastada *RET* yeniden düzenlemesi keşfedilmiş olup KHDAK tanılı hastaların %1-2'sinde *RET* yeniden düzenlemesi görülmektedir (Bronte ve ark., 2019). *RET* füzyonları, adenokarsinomada görülür fakat SqCC ve KHAK'inde görülmemektedir. Genellikle sigara öyküsü olmayan genç yaşlarda daha sık ortaya çıktığı bildirilmiştir (Kohno ve ark., 2015).

1.2.5.9. TP53

TP53, kromozom 17p13 bölgesinde yer almaktadır ve tanımlanan ilk tümör baskılayıcı gendir (Mogi ve Kuwano, 2011). TP53'ün temel rolü; hücre döngüsü ilerlemesi, hücre yaşlanması, DNA onarımı, hücre ölümü ve hücre metabolizması gibi olayları kontrol ederek tümör oluşumunun engellenmesini sağlamaktır (Yamamoto ve Iwakuma, 2018).

TP53 gen mutasyonları, konformasyonel bir değişikliğe bağlı olarak tümör baskılayıcı genin onkojenik transformasyonu ile sonuçlanır. Hücre büyümesi, apoptoz ve DNA onarımının düzenlenmesinin bozulması sonucu tümör hücreleri çoğalır, büyür ve metastaz yaparlar (Deben ve ark., 2017; VanderLaan ve ark., 2017).



Şekil 1.12. TP53 sinyal yolağı (Creative Biolabs, 2021)

Kanserlerde en sık görülen genetik anomali *TP53* mutasyonları olup bunların ~%80'i missense mutasyonlardır. KHDAK'lerinin ~%65'inde ve KHAK'lerinin %90'ında *TP53* inaktivasyonu meydana gelir. KHDAK'inde negatif bir prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (Mogi ve Kuwano, 2011; Cooper ve ark., 2013).

Sigara içenler ve içmeyenler arasında *TP53*'ün mutasyonel spektrumu farklılık göstermektedir (Husgafvel-Pursiainen ve ark., 2000).

1.2.5.10. KRAS

KRAS (Kirsten Rat Sarkom Viral Onkogen Homolog), RAS proto-onkogen ailesinin (*KRAS*, *NRAS* ve *HRAS*) bir üyesidir. Hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozu düzenleyen sinyal iletim yolaklarını kontrol etmekte kritik bir role sahip G-proteinini kodlamaktadır. *KRAS* proteini bir GTPazdır ve *EGFR* sinyal yolağının önemli moleküllerinden biridir. *KRAS*, GTP bağlanması yoluyla etkinleştirilir (Cooper ve ark., 2013; Kerr ve Martins, 2018; Román ve ark., 2018).

KRAS aktive olduğunda, hücre proliferasyonunu ve apoptozu aktive eden MAPK sinyal yolağı ve anti-apoptotik hücre sağkalımını yöneten PI3K sinyal yolağı etkinleşir (Molina ve Adjei, 2006).

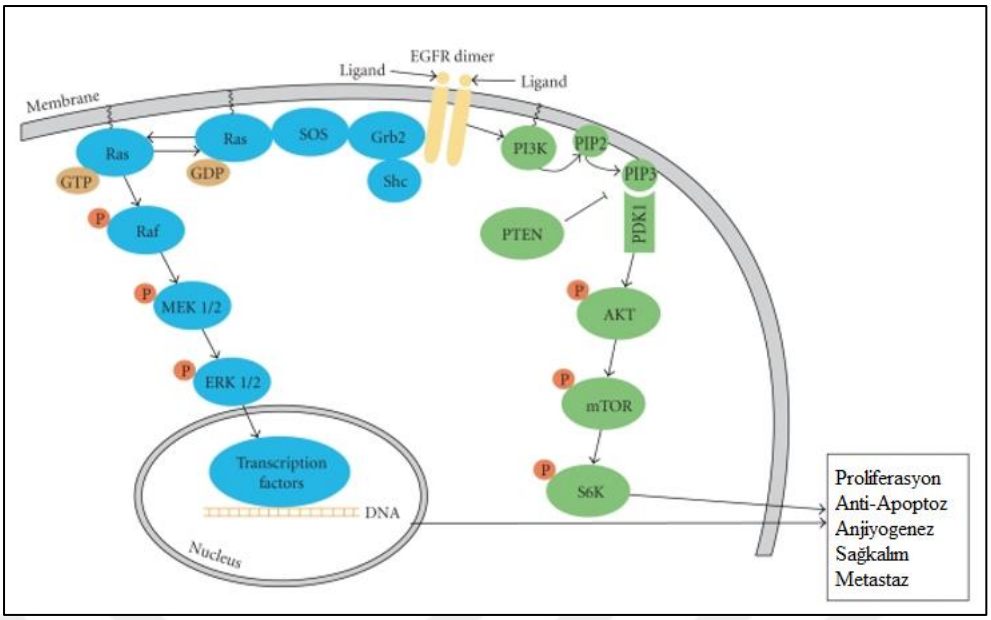
RAS genleri ile akciğer kanseri arasındaki ilişki ilk olarak 1984 yılında bildirilmiştir. *KRAS* mutasyonlarının adenokarsinomların neredeyse ayırt edici bir özelliği olduğu ve batı popülasyonlarında daha sık görüldüğü bulunmuştur (Román ve ark., 2018). *KRAS* mutasyonları adenokarsinomada en sık meydana gelen onkojenik değişikliktir ve %25-40'ında görülmektedir. SqCC ve KHAK'lerinde çok nadir rastlanmaktadır (Cooper ve ark., 2013; Adderley ve ark., 2019).

KRAS mutasyonları, kötü prognozla ilişkilidir ve KHDAK'lerinin yaklaşık %39'unda meydana gelir. En sık kodon 12 G12C, G12V, G12D ve G12A varyantları görülür. KHDAK'nde kodon 12, 13 ve 61'de en az dokuz farklı *KRAS* mutasyonu tanımlanmıştır (Ferrer ve ark., 2018; Liu ve ark., 2020). Sigara içmeyenlerde en yaygın G12D mutasyonu, sigara içenlerde ise en sık G12C mutasyonunun meydana geldiği bildirilmiştir (Kempf ve ark., 2016).

KHDAK'nde *KRAS* ile en sık *TP53* (%41), *STK11* (%28), *KEAP1* (%24), *RBM10* (%16) ve *PTPRD* (%15) mutasyonları görülmektedir (Arbour ve ark., 2018).

1.2.5.11. BRAF

BRAF (V-Raf Murıne Sarkoma Viral Onkojen Homolog B1), MAPK/ERK yolağında görev alan bir serin/treonin kinazdır. Bu yolak büyüme faktörleri ve hormonların kontrolü altında, hücre proliferasyonunu ve sağkalımını düzenler. *BRAF* genindeki mutasyonlar, kanser gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (Cardarella ve ark., 2013; Cooper ve ark., 2013).



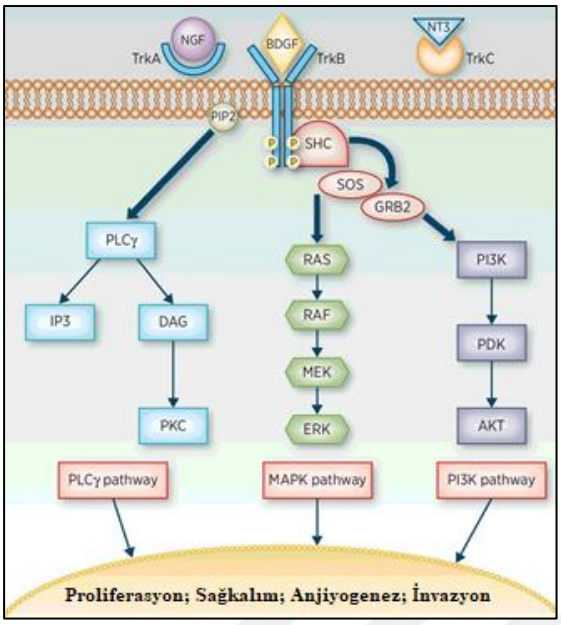
Şekil 1.13. MAPK/ERK yolağı (Jancík ve ark., 2010)

BRAF mutasyonları, tüm insan kanserlerinin %8'inde görülmektedir. Tüylü hücreli lösemilerin yaklaşık tamamında, melanomların ~%50'sinde, papiller tiroid tümörlerinin ~%45'inde, KHDAK'nin %2-4'ünde, yumurtalık tümörlerinin ~%30'unda, kolorektal tümörlerin ~%10'unda ve prostat tümörlerin ~%10'unda *BRAF* mutasyonları bildirilmiştir (Nguyen-Ngoc ve ark., 2015; Khunger ve ark., 2018; Myall ve ark., 2019).

BRAF genindeki en sık görülen değişiklik, protein seviyesinde 600. pozisyonda bulunan valin amino asidini glutamik aside değiştiren V600E adı verilen bir mutasyondur. V600 pozisyonunda gözlenen diğer mutasyonlar V600D, V600K, V600R ve V600A'dır (Roh, 2014; (Planchard ve ark., 2016).

1.2.5.12. NTRK

NTRK (Nörotropik Tirozin Reseptör Kinaz) genleri olan *NTRK1*, *NTRK2* ve *NTRK3* sırasıyla TrkA, TrkB ve TrkC tropomiyosin reseptör kinazları (TRK) kodlarlar. TRK reseptörleri, Ras/Raf/MAPK, PI3K/Akt/mTOR ve PLCγ yolakları dahil olmak üzere aşağı akış sinyal yollarının aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu şekilde TRK reseptörleri, proliferasyon, hayatta kalma ve farklılaşma gibi farklı hücresel süreçleri düzenler. TRK reseptör sinyal yolakları, nöronal farklılaşma ve gelişimde ve normal nöronal homeostazın sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır (Farago ve Azzoli, 2017; Solomon ve ark., 2019; Ekman, 2020).



Şekil 1.14. TRK yolakları (Kheder ve Hong, 2018)

NTRK1, 2 ve *3'ü* içeren gen füzyonları, potansiyel olarak onkogeneze yol açan TRK reseptörlerinin yapısal aktivasyonu veya aşırı ekspresyonu ile sonuçlanır. Bu füzyon proteinleri, kanser hücresi proliferasyonunu indükleyebilir ve aşağı akış sinyal yollarını aktive edebilir (Gatalica ve ark., 2019).

NTRK1 onkojenik füzyonunu içeren kromozomal yeniden düzenleme ilk olarak 1986'da bir kolorektal tümör örneğinde tanımlanmıştır. O zamandan beri *NTRK1* füzyonları, intrahepatik kolanjiyokarsinom, papiller tiroid kanseri, spitzoid neoplazmalar, glionöronal tümörler ve sarkoma dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde tanımlanmıştır. *NTRK2* ve *NTRK3* genlerini içeren yeniden düzenlenmeler çeşitli solid tümör malignitelerinde gösterilmiştir (Doebele ve ark., 2015; Vaishnavi ve ark., 2015).

KHDAK'nde *NTRK1*'i içeren onkojenik füzyonlar ilk olarak 2013 yılında tanımlanmıştır. Vaishnavi ve arkadaşları, yeni nesil dizileme testi ile 36 akciğer adenokarsinoma numunesinin 2 tanesinde *NTRK1*'i içeren çerçeve içi füzyon meydana geldiğini göstermişlerdir (Vaishnavi ve ark., 2013).

NTRK füzyonlarının, KHDAK hastalarının yaklaşık %0,1-3'ünde meydana geldiği tahmin edilmektedir (Farago ve ark., 2018; Elfving ve ark., 2021).

1.3. APOPTOZ

Apoptoz; genetik açıdan kontrol edilen ve yaşlanmış, fazla üretilmiş, hücre fonksiyonları bozulmuş, DNA'da hasar meydana gelmiş hücrelerin düzenli bir şekilde yok edilmelerini gerçekleştiren programlı bir hücre ölüm mekanizmasıdır.

"Apoptosis" terimi, Yunanca'da "apo" ayrılma, "ptosis" düşme olarak tercüme edilen ve sonbaharda ağaçtan düşen yaprakları tanımlamak için kullanılan eski bir kelimedir (Duque-Parra, 2005).

Tıpta "apoptoz" terimi ilk olarak 4.yy'da Hipokrat tarafından fizyolojik bir hücre/doku ölüm şeklini tanımlamak için kullanılmıştır. 1972'de Kerr ve ekibi fizyolojik açıdan ölen hücrelerin nüklesunda parçalar halinde yoğunlaşmış kromatin gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu anlayarak bunu "büzüşme nekrozu" olarak isimlendirmişlerdir (Diamantis ve ark., 2008).

Apoptoz veya tip 1 hücre ölümü, evrim boyunca yüksek oranda korunmuş ve normal fizyolojik süreçler sırasında olduğu kadar patolojik durumlarda da ortaya çıkabilen bir süreçtir (Fulda ve ark., 2010). Çok hücreli organizmalarda yaşlanma, iyileşme, doku içi homeostazın sağlanması gibi biyolojik olaylarda önemli rol oynar. Omurgalı sinir sisteminin gelişimi sırasında sinir hücrelerinin %50'den fazlasının ölmesi, apoptozun embriyonik gelişimde de görev aldığını gösterir. Bağırsak ve kemik iliğinde sürekli olarak hücre üretimi devam eder ve sıklıkla apoptoza uğrarlar (Goldar ve ark., 2015; Dasgupta ve ark., 2016).

Apoptoz, yalnızca hücre hasarı veya dış stresin bir sonucu olarak değil, aynı zamanda normal gelişim ve morfogenez sırasında meydana gelen önemli bir düzenlenmiş ölüm mekanizması olarak da tanımlanır (Nikoletopoulou ve ark., 2013).

Apoptozun etki mekanizması, tipik olarak mitokondriyal dış zar geçirgenliği (MOMP), kromatin materyalinin yoğunlaşması, çekirdekte meydana gelen DNA parçalanması, zar kabarcıkları oluşumu, hücre küçülmesi, dinamik membran kabarması ve hücre dışı matrislere yapışma kaybı ile karakterize edilir (Su ve ark., 2015; Jan ve Chaudhry, 2019).

Apoptoz, hücre içi ve/veya hücre dışı sinyallerle düzenlenir. Hücre içi sinyaller intrinsik yolu, hücre dışı sinyaller de ekstrinsik yolu aktifleştirir. Apoptozu tetikleyen hücre içi sinyaller; DNA hasarı, metabolik stres ve/veya hücre döngüsü bozuklukları, hücredeki Ca^{+2} seviyesi artışı, pH azalması, ATP/ADP ve NADPH'nin azalması ve hipoksidir. Hücre dışı sinyaller ise büyüme

ve üreme faktörlerinin yetersizliği, apoptoz reseptörlerinin aktivasyonu, sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (İskemi, toksinler, UV, kemoterapötik ilaçlar, radyasyon)'dir (Elmore, 2007).

Apoptozun temelinde; kaspazların aktivasyonu, DNA ve proteinin parçalanması ve membran değişiklikleri ve fagositik hücreler tarafından tanınması şeklinde üç farklı biyokimyasal değişiklik gözlemlenmektedir (Sharma ve ark., 2014).

Günümüzde apoptoz ile ilişkili morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler büyük ölçüde kaspazların aktivasyonu ile açıklanmaktadır ve apoptoz genel olarak kaspaz-bağımlı programlanmış hücre ölümü olarak kabul edilmektedir (Zhang ve ark., 2015).

Kaspazlar (sisteinil aspartata özgü proteazlar), hücre içinde önemli proteaz aktivitesi olmayan inaktif zimojenler olarak sentezlenir ve spesifik ölüm uyaranları alınana kadar aktif halde değillerdir (Moulin ve Arrigo, 2008; Parrish ve ark., 2013). Kaspazın, "c" harfi sistein proteazını gösterirken, "aspaz" ise enzimin aspartik asit kalıntılarından sonra parçalama özelliğini ifade eder. Aktif kaspaz, çoğu hücresel proteini uzaklaştırır, nükleer ve hücre iskeleti parçalarlar (Wong, 2011). Ayrıca DNAz'ı aktive ederler (Larsen ve Sørensen, 2017).

Kaspazlar, hem başlatıcı hem de yürütücü olarak görev yaptıkları için apoptoz mekanizmasının merkezindedirler. Apoptozla ilgili kaspazlar, etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmışlardır. Başlatıcı kaspazlar; Kaspaz-2, Kaspaz-8, Kaspaz-9 ve Kaspaz-10 iken yürütücü kaspazlar; Kaspaz-3, Kaspaz-6 ve Kaspaz-7'dir (McIlwain ve ark., 2013; Kahya ve ark., 2014). Başlatıcı kaspazlar, pro-apoptotik uyarana yanıt olarak ilk aktive edilen kaspazlardır ve yürütücü kaspazları aktive etmekten sorumludur (Adrain ve Martin, 2001).

Bir hücrenin kaspaz aktivitesini uygun şekilde modüle edememesi; karsinojenez, otoimmünite, nörodejenerasyon ve immün yetmezliğe yol açan anormal veya zamansız apoptotik hücre ölümüne neden olabilir (Li ve Yuan, 2008).

Apoptoz, mitokondriyal (içsel) veya ekstrinsik (dışsal) olmak üzere iki yoldan başlatılmaktadır. İçsel apoptoz yolu, hücre içi strese cevap olarak aktifleşir. Dışsal apoptoz yolu, ölüm ligandlarının plazma zarı üzerindeki aynı kökenli ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla aktive olur. Mitokondriyal ve ekstrinsik yolaklar farklı hücresel uyaranlara yanıt olarak indüklenirken, her iki yolak en sonunda kaspaz-3'ün aktivasyonuyla sonuçlanır (Matsuura ve ark., 2016).

1.3.1. Ekstrinsik (Dışsal) Apoptoz Yolu

Apoptozu başlatan dışsal yol, tümör nekroz faktör (TNF) gen süper ailesi üyeleri olan ölüm reseptörlerinin (DR) transmembran-reseptör aracılı etkileşimleri ile sağlanır (Locksley ve ark., 2001).

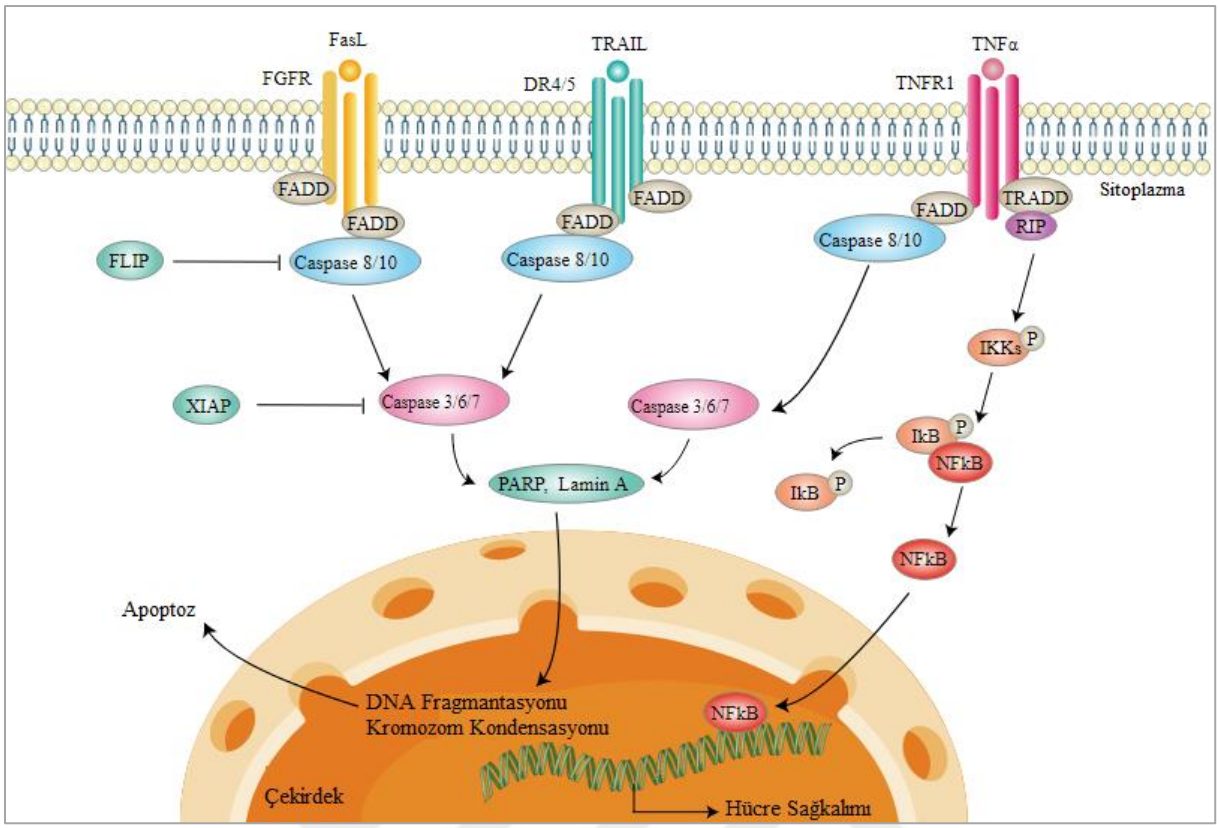
Ölüm reseptörleri; CD95 (Fas/APO-1), TNFR1, DR3 (APO3), DR4 (TRAIL R1), DR5 (TRAIL R2) ve DR6'dır. Hücre ölüm sinyalleri, hücre zarındaki TNF reseptör ailesinin grubundaki ölüm reseptörlerine bağlanarak etkili olurlar (Schulze-Osthoff ve ark., 1998; Su ve ark., 2015).

TNF ailesine ait olan reseptörler sistein amino asitince zenginlerdir. Aktif olan domaini, ölüm alanı olarak adlandırılan 80 amino asitlik sitoplazmik alana sahiptir. Bu ölüm alanı, ölüm sinyalinin hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yolaklarına iletilmesinde görev alır. En iyi karakterize edilmiş ligand/ölüm reseptörü arasında FasL/FasR, TNF-α/TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5 yer alır (Elmore, 2007).

Ligandın reseptöre bağlanması üzerine, reseptöre karşılık gelen ölüm alanlarını içeren sitoplazmik adaptör proteinleri görevlendirilir. FasL/FasR ve TNF-α/TNFR1 etkileşimi FADD, TRADD ve RIP adaptör proteinlerinin reseptöre bağlanmasına neden olur (Wajant, 2002).

FADD, ölüm efektör alanının dimerizasyonu yoluyla prokaspaz-8 ile birleşir. Bu noktada, prokaspaz-8'in oto-katalitik aktivasyonu ile sonuçlanan bir ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Kaspazın bu komplekse bağlanması, dimerizasyon ve proteolitik yarılmayı indükleyerek zimojenin olgunlaşmasını kolaylaştırır (Graf ve ark., 2014). Bu bağlanma ile prokaspaz-8 aktif kaspaz-8'e dönüşür ve kaspaz kaskadı aktivasyonu başlatılır.

Kaspaz-8 etkinleştirildiğinde efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder ve apoptozun yürütme aşaması tetiklenir. c-FLIP olarak adlandırılan protein, konsantrasyona bağlı olarak, FADD ve kaspaz-8'e bağlanarak apoptozu inhibe edebilir veya güçlendirebilir (Scaffidi ve ark., 1999).



Şekil 1.15. Ekstrinsik (dışsal) apoptoz yolu (Creative Biolabs, 2021)

1.3.2. Mitokondriyal (İçsel) Apoptoz Yolu

İçsel yol, mitokondriyal apoptoz yolu olarak da adlandırılır çünkü mitokondriden salınan faktörlere bağlıdır (Brenner ve Mak, 2009). DNA hasarı, hipoksi, yüksek sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonu, oksidatif stres, pH'da azalış, enfeksiyon gibi hücre içi uyaranlar, iç mitokondriyal yolağın başlatılmasını tetiklemektedir (Wong, 2011). Bu uyaranlardan bağımsız olarak mitokondriyal geçirgenliğin artması ve proapoptotik molekül olan sitokrom-c'nin sitoplazmaya salınmasıyla da içsel yolak başlatılabilir (Danial ve Korsmeyer, 2004).

İçsel apoptoz yolu, foliküler Non-Hodgkin lenfomada t(14;18) kromozomal kırılma noktasında bulunan *BCL2* geninin adıyla tanımlanan Bcl-2 protein ailesi aracılığıyla kontrol edilir ve mitokondriyal dış zar geçirgenliği (MOMP) tarafından yürütülür. Fizyolojik olarak, dış mitokondriyal membran 5 kDa büyüklüğündeki moleküllere karşı geçirgendir. Fakat MOMP arttığında 100 kDa'dan daha büyük proteinler de gözeneklerden geçebilmektedir (Kalkavan ve Green, 2018; Peña-Blanco ve García-Sáez, 2018).

MOMP'un artışı BCL2 ailesinin pro-apooptotik ve anti-apoptotik proteinleri tarafından düzenlenir (Kalkavan ve Green, 2018). BCL2 ailesine ait pro-apoptotik üyeler Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim, HRK, Noxa ve PUMA; anti-apoptotik üyeler Bcl-2, Bcl-x, Bcl-Xl, Bcl-W, Bfl-1, BAG ve MCL-1 proteinlerinden oluşur (Liu ve ark., 2017).

Mitokondri dış membranında bulunan anti-apoptotik proteinler, iyon transportunun düzenlenmesinden sorumludur ve sitokrom-c'nin mitokondriyal zardan geçişini bloke ederek apoptozu düzenlerken, pro-apoptotik proteinler, sitokrom-c'nin sitozole geçişine etki ederek apoptozu tetikler. Apoptozun başlatılıp başlatılmayacağını pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki oran belirlemektedir. Hücrelerde apoptozun başlaması için pro-apoptotik proteinlerin anti-apoptotiklerden yüksek olması gerekmektedir (Reed, 1997; Wong, 2011).

BCL2 ailesi üyeleri ortak BH (Bcl-2 homoloji) bölgeleri içerirler. Günümüze kadar 4 BH bölgesi (BH 1-4) tanımlanmıştır. BH bölge ekspresyonlarına göre pro-apoptotik üyeler iki sınıfta toplanırlar; Ortak BH1,2 ve 3 bölgesi içeren Bax ve Bak proteinleri; diğer alt grup ise sadece BH3 içeren Bad, Bik, Bid, Puma, Bim, Bmf ve Noxa proteinleridir. Genel olarak anti-apoptotik üyeler bu dört BH bölgesinde de ortak aminoasit dizilerini korurlar (Adams ve Cory, 2007; Shamas-Din ve ark., 2013). Yalnızca BH3 proteinleri, anti-apoptotik BCL-2 proteinlerini inhibe ederler ve apoptotik strese yanıt olarak yukarı regüle edilirler (Pfeffer ve Singh, 2018; Samali ve ark., 2010).

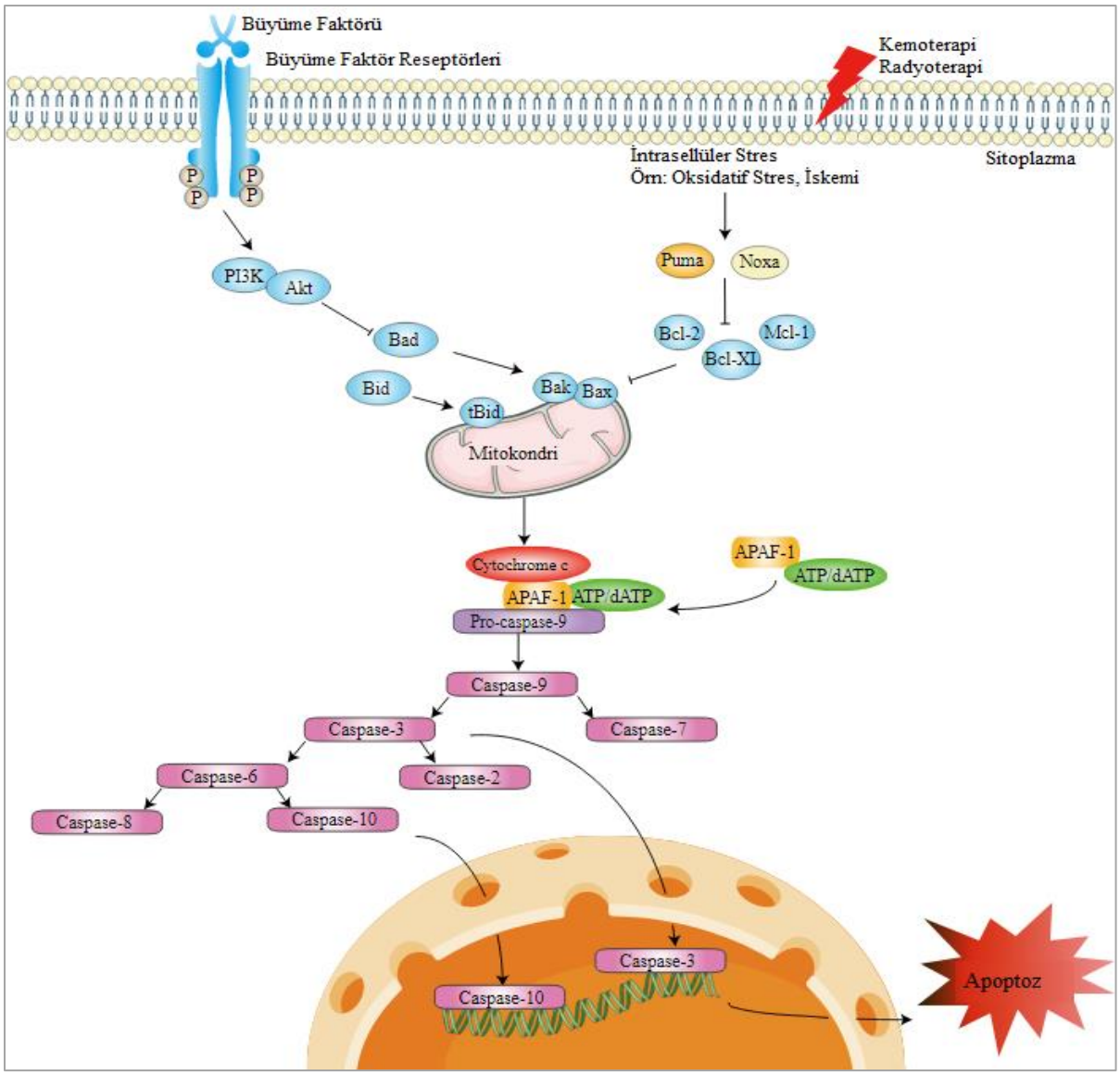
Büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinler gibi negatif sinyallerin yokluğunda apoptoz indüklenmektedir. Radyasyon, hipoksi, hipertermi, toksinler, serbest radikaller ve viral enfeksiyon gibi faktörler apoptozda pozitif sinyal olarak rol alırlar. Tüm bu uyaranlar iç mitokondriyal membranda; MPT (Mitokondriyal permabiliti transisyon) gözeneğinin açılmasına, mitokondriyal transmembran potansiyelinin kaybına ve mitokondri hücre membranlarının arasında pro-apoptotik olarak bulunan iki ana grup proteinin sitozole salınmasına yol açarlar (Elmore, 2007).

Birinci grup, Smac/DIABLO, sitokrom-c ve serin proteaz olan HtrA2/Omi proteinlerinden oluşur. Bunlar, kaspaz bağımlı insintrik yolağı aktifleştirir. Sitokrom-c proteinin oksidatif fosforilasyonda elektron taşındığı bilinmektedir. Sitokrom-c ile Apaf-1 (Apoptotik Proteaz Aktive Eden Faktör-1), ATP bağımlı bir yolla apoptozom olarak adlandırılan kompleksi oluşturur. Apoptozom, prokaspaz-9'u keserek aktif kaspaz-9'u meydana getirir (Smaili ve ark., 2000; Elmore, 2007).

Aktif kaspaz-9 ise prokaspaz-3'ü keserek kaspaz-3'ü oluşturur. Aktif kaspaz-3 apoptoza aracılık eden yaklaşık 1500 adet proteinin kesilmesi işlemini gerçekleştirmektedir. Aktifleşen kaspaz-3, normalde inaktif olan kaspaz aktif eden DNaz'ı inaktifleştirerek, kaspazları aktive eden DNaz'ın serbestleştirilmesini sağlar. Serbestleştirilmiş olan kaspazları aktive eden DNaz, çekirdekteki kromatinin yoğunlaşmasını sağlar ve DNA'nın nükleozomal küçük parçalar haline gelmesine aracılık ederek apoptozun gerçekleşmesini sağlar (Jänicke ve ark., 1998; Negara ve ark., 2018).

Kaspaz-9 aktivitesi, IAP'lar (apoptoz inhibitör proteinleri) tarafından baskılanır. Apoptozun tamamlanması için IAP'ların fonksiyonunun baskılanması gerekir. Apoptozun, apoptozom tarafından uyarımı için IAP'ların ortamda bulunması gereklidir. Bid ailesi inhibitörleri olan Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi sitoplazmaya salındığında IAP aktivitesini inhibe ederek apoptozu indüklediği bildirilmektedir (van Loo ve ark., 2002; Schimmer, 2004).

Apoptoz sırasında mitokondriden salınan ikinci pro-apoptotik protein grubu, AIF (Apoptoz İndükleyici Faktör), endonükleaz-G ve CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'dır. Bu proteinlerin salınımı hücre ölmeye karar verdikten sonra gerçekleşmektedir. AIF çekirdeğe transloke olur ve ~50-300 kb parçalar halinde DNA fragmantasyonuna ve kromatinin yoğunlaşmasına neden olur (Joza ve ark., 2001). Çekirdek yoğunlaşmasının bu erken evresi "aşama I" olarak adlandırılır (Susin ve ark., 2000). Endonükleaz-G de çekirdeğe taşınır ve oligonükleozomal DNA fragmanları oluşturmak için kromatini parçalar (Li ve ark., 2001). AIF ve endonükleaz-G'nin her ikisi de kaspazdan bağımsız bir şekilde işlev görür. Aktif kaspaz-3 de ICAD'ı (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz) inaktifleştirerek CAD'ı serbestleştirir. CAD daha sonra mitokondriden salınır ve çekirdeğe geçer, burada kaspaz-3 tarafından kırpıldıktan sonra oligonükleozomal DNA fragmentlerinin daha fazla parçalanmasına ve ileri kromozom kondensasyonuna yol açar (Enari ve ark., 1998). Daha belirgin ve gelişmiş olan bu kromatin yoğunlaşması, "aşama II" olarak isimlendirilir (Susin ve ark., 2000).



Şekil 1.16. Mitokondriyal (içsel) apoptoz yolu (Creative Biolabs, 2021)

1.3.3. Apoptoz ve Kanser

Apoptoz düzensizlikleri sıklıkla hastalıklarla ilişkilendirilir. Aşırı apoptoz dejeneratif hastalıklara yol açarken, yetersiz apoptoz neoplastik hastalıklara sebep olabilir. Bu bakımdan kanser hücreleri, hücre ölüm mekanizmasını ekarte ederek apoptoza uğramazlar ve hayatta kalma avantajı elde ederler (Matsuura ve ark., 2016).

Apoptoz, uygulayıcı ve düzenleyici farklı molekül grupları tarafından düzenlenen hücresel bir prosedürdür ve bunların anormal işlevi, tümörlerin büyümesi ve antikanser ilaç direncinin gelişmesine yol açar. Bu nedenle apoptoz, özellikle kanser gibi hastalıklar için yeni ilaç keşfi ve var olan ilaçların geliştirilmesi için başlıca moleküler hedeflerden biri haline gelmiştir (Goldar ve ark., 2015).

Kanser hücreleri, proapoptotik BCL-2 aile üyelerini transkripsiyonel veya post-transkripsiyonel olarak inhibe ederken, anti-apoptotik BCL-2 ailesi proteinlerini aşırı ifade ederek veya stabilize ederek sıklıkla apoptozdan kaçarlar.

Kanser hücrelerinin apoptozdan kaçmak için kullandığı mekanizmalardan biri *P53*'ün fonksiyon kaybıdır. Apoptozda *P53* ve *BCL2* ters çalışırlar. Biri apoptozu aktive ederken diğeri inhibe eder (Sherr McCormick 2002). *P53*, hücre sitoplazmasında bulunur ve çeşitli stres uyarıcılarına yanıt olarak hücre döngüsünü durdurma veya apoptozu indükler. Hücre büyümesi, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptozda aktif görev alır (Weisz ve ark., 2007).

P53, Bax, Apaf-1, Fas gibi genlerin aktivasyonu, *Bcl-2, Bcl-X* genlerin inaktivasyonuna yol açarak apoptozu tetikler. Hücrede DNA yapısının degrade veya hücre defekti olması durumunda p53 hücrenin ne derecede stres altında olduğunu belirler ve hücrenin tamire veya apoptoza gitmesini sağlar. Hücrenin DNA hasarı onarılabilecek düzeyde ise hücre bölünmesinde normal olarak görev alan p53, hasarlı bölge tamiri için hücre bölünmesini G1 fazında durdurur. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek boyutta ise Bax aktive olur ve mitokondriyal yolak ile hücrede apoptozu başlatarak hasarlı hücrenin ortadan kaldırılmasını sağlamış olur (Vermeulen ve ark., 2003; Bharatham ve ark., 2011).

Kanser apoptozunun indüksiyonu ve normal hücre ölümünün sınırlandırılması kanser gen tedavisi veya immünoterapide ana yaklaşımlar arasındadır. Kemoterapiye yanıt olarak apoptozu tetikleyen olaylar zincirini anlamak ve apoptoz sürecinin disfonksiyonu, kansere karşı moleküler hedefli spesifik tedavilerin geliştirilmesine yönelik yeni etkili terapötik yaklaşımlar açısından fikir vermektedir (Jan ve Chaudhry, 2019).

1.4. BORİK ASİT

Bor; kimyasal sembolü “B”, atom numarası 5 ve atom ağırlığı 10.811 olan bir elementtir. Periyodik tabloda Grup III A’da bulunan Bor, grubun metal olmayan tek elementidir (Ediz Özdağ 2001).

Bor, doğada temel formda bulunmaz ve oksijene bağlanarak %98,4'ü borik asit, %1,6'sı borat halinde bulunur (Henderson ve ark., 2009). Borik asit, borun çözünür formları içinde en sık olarak görülür. Borik asit (H_3BO_3); renksiz, kokusuz ve suda kolayca çözünebilen şeffaf kristal yapıda veya beyaz granüllü toz halinde bulunan, karbona benzer yapısal özelliklere sahip hafif organik Lewis asididir ve özgül ağırlığı 1.43 gr/cm^3 tür (Bhami ve Das, 2015; Ghanizadeh ve ark., 2020). Volkanik sularda ve kaplıcalarda doğal mineral sassolit olarak bulunur (Dieter, 1994).

Bor, genellikle vücut dokularında ve sıvılarda borik asit olarak bulunur. Borik asit vücuda solunum ve gastrointestinal sistemi tarafından alındıktan sonra hızlı bir şekilde emilir ve pasif difüzyon aracılığıyla tüm vücut sıvılarına dağılır. Borik asit metabolize edilmez ve vücuttan idrar yoluyla atılır. Bazı çalışmalarda, borik asit muamelesi sonucu hem insan hem de sıçanlarda kandaki ve dokudaki bor konsantrasyonunun 1:1 oranında olduğunu tespit edilmiştir. Vücuttaki yarı ömrü yaklaşık bir gündür ve yumuşak dokularda birikim göstermediği bildirilmiştir. Ancak borik asitin özellikle kemik dokusundaki konsantrasyonunun dört kat artmış olması, bu dokuda birikim yaptığını göstermiştir (Howe, 1998; Hunt, 1998; Qureshi ve ark., 2001).

Borik asit, ATP (adenozin trifosfat), NADH (nikotinamid adenin dinükleotid), NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) ve RNA dahil olmak üzere çeşitli temel biyolojik moleküllerin bir bileşeni olan riboz için yüksek afiniteye sahip bordan türetilir. Aşırı miktarda bor, protein sentezini ve mikroorganizmada mitokondriyal disfonksiyona neden olan ve hücre bölünmesini ve gelişiminde görev alan serin-proteaz, β-laktamaz ve amino-açil tRNA sentetaz gibi enzimlerin aktivitelerini bozabilir. Artan bor konsantrasyonu, mikroorganizmalarda hayati bir mekanizma olan çoğunluk algılanması (quorum sensing)’nı etkileyebilir. Borun hücre zarı yapısının ve işlevinin korunmasında gerekli olduğu, fazla miktardaki borun ise zar işlevini, bütünlüğünü, konformasyonunu ve taşıma kapasitesini negatif yönde etkilediği bildirilmiştir (Adriztina ve ark., 2018).

Borun hayvan hücresi replikasyonu ve gelişimi için önemli olduğu bilinmekte olup ancak altta yatan mekanizmalar belirsizliğini korumaktadır. Borik asit, alabalıkta embriyonik büyümeyi uyarır ve zebra balıklarının blastula öncesi bölünme aşamasında gerekli olduğu tespit edilmiştir (Barranco ve Eckhert, 2004).

Borun reaktif oksijen türleri, kalsiyum metabolizması, potasyum, ksantin oksidaz, sitokrom b5 redüktaz ve vitamin D üzerinde de etkili olduğu bildirilmiştir (Barth, 2009). Ek olarak, yaralı karaciğer, kalp kası, böbrek, beyin, kemik kırığı ve akciğerde etkinliği gösterilmiştir (Kızılay ve ark., 2016).

Borun kemik sağlığı üzerine yaralı olabileceğini belirten ilk rapor 1981'de ortaya çıkmıştır. Bor, kemik oluşumunda (osteogenez) önemli bir yere sahiptir ve eksikliğinde kemik gelişiminin ve yenilenmesinin negatif yönde etkilediği bildirilmiştir. Yapılan bir araştırmada, yüksek miktarda D vitamini ile beslenen civcivlerde bor yoksunluğunun büyük kemik anomalliklerine yol açtığı bulunmuştur (Pizzorno, 2015; Nielsen, 2017).

Borun kemik büyümesini ve korunmasını faydalı bir şekilde etkileyebileceğini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Borun insan diş germ kök hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını (Taşlı ve ark., 2013) ve kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşmasını arttırdığı gösterilmiştir (Movahedi Najafabadi ve Abnosi, 2016).

Yapılan bir projede, 100 osteoporoz hastası altı ay süresince tükettikleri sebze, meyve ve margarine 6 mg bor bazlı bir besin takviyesi olan kalsiyum fruktoborat ilave edilerek beslenmiştir. Hastaların 66'sında kemik yoğunluğunun düzeldiği bildirilmiştir (Scorei ve Rotaru, 2011).

Bildirilen bir başka çalışmada ise borun, yara onarımı ve doku mühendisliği için kritik olan anjiyogenezi (kan damarı oluşumu) arttırdığı bildirilmiştir (Haro Durand ve ark., 2014).

Borun düşük atom ağırlığına sahip olması ve organik moleküller ile bileşik oluşturabilmesi sebebiyle; hücre zarı işlevlerinde ve kararlılığında, hormon reseptörleri ve transmembran sinyaller üzerinde etki gösterebileceği tahmin edilmektedir (Kabu ve Akosman, 2013).

Borun inflamatuar yanıtın düzenlenmesi üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir (Pizzorno, 2015). 1990'da yapılan bir araştırmada, eklem iltihabı endikasyonu olan 15 bireye 2 ay süresince 6 mg/gün bor (sodyum tetraborat dekahidrat halinde) diyeti uygulanmış olup eklemlerde görülen ağrının ve iltihabın azaldığı gösterilmiştir. İnflamasyon üzerine yapılan başka bir klinik araştırmada 2 hafta süresince, sağlıklı gönüllülere günde iki defa içeriğinde 2,91 mg bor

bulunan kalsiyum fruktoborat diyeti uygulanmış ve araştırmanın sonucunda kandaki C-Reaktif Protein (CRP) seviyesinin %37 azaldığı raporlanmıştır (Mogoşanu ve ark., 2016).

Bor diyetinin plazmada östradiol ve testosteron düzeylerini yükselttiği, steroid hormon metabolizmasını olumlu yönde etkilediği bilinmektedir. Borun, steroid hormonlarının üretiminde, hidroksil grubunun bağlanmasını kolaylaştırdığı tahmin edilmektedir (Pizzorno, 2015). Yapılan klinik araştırmada; 1 ay süresince her gün, içeriğinde 10 mg bor bulunan sodyum tetraborat diyeti uygulanmış ve bu araştırmanın neticesinde bor diyeti ile serumdaki testesteron ve östradiol seviyelerinin arttığı gözlenmiş ve bununla birlikte borun, damar sertliğinde (ateroskleroz) önleyici rolü olabileceği düşünülmüştür (Naghii ve Samman, 1997).

Bor ve DNA hasarı arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada, insan birincil epitel hücre hattına (HS-2) bor uygulamaları sonucu DNA çift sarmal kırıklarının oluşumunu azalttığı ve yara iyileşme sürecini hızlandırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle borik asidin önemli terapötik etkinliğe sahip olduğu, oksidatif stres ve yara iyileşme sürecinde önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Ayrıca iltihaplı hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği ve DNA hasarlarına karşı koruyucu etkisinin olabileceği düşünülmektedir (Tepedelen ve ark., 2016).

Borik asit sağlık alanındaki kullanımının yanı sıra, endüstriyel, tarımsal, ilaç ve kozmetik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Ince ve ark., 2012).

1.4.1. Borik Asit ve Kanser

Kanser tedavisi açısından, doğal bileşikler önemli potansiyel kaynaklardır. Bu kaynaklardan biri de bor ve bileşikleridir. Bor, meyve, sebze ve içme suyunda bulunmaktadır ve bu sebeple günlük diyetin bir parçasıdır. İnsanlarda diyet ile ortalama 15 μM borik asit alındığı düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, kemoterapotik ajan olarak borik asitin kullanılabilirliğini ortaya koymaktadır. Borik asit, kanser tedavileri için umut verici bir farmasötik ajan yapan birçok ayırt edici özelliğe sahiptir. Borik asit karbona benzer yapısal özelliklere sahip zayıf bir organik Lewis asitidir. Bu sebeple karbon içerikli çoğu enzim substratın inhibitörü olarak görev alabilmektedir. Proteazom, peptidaz, proteaz, arjinaz, transpeptidaz ve nitrik oksit sentaz gibi çoğu enzimin, borik asit bu özelliği ile baskılanmasını sağlayabilmektedir. Borik asidin kullanım kolaylığı, düşük toksisite düzeyi, 24 saat içinde idrarla metabolize edilmeden atılımı gibi farmakolojik özellikleri onu ilgi çekici bir kanser tedavi adayı haline getirmektedir.

Birçok epidemiyolojik çalışmalar sonucunda borik asitin anti-kanserojen etkilere sahip olabileceği gösterilmektedir. 2004 yılında yapılan bir çalışmada, diyet ile alınan borun prostat kanseri üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Cui ve ark., 2004). *İn vitro* çalışmalarda da borun kültürlenmiş prostat kanseri hücre türlerinde büyüme veya çoğalma üzerine engelleyici etkisi bildirilmiştir (Barranco ve Eckhert, 2004; Cui ve ark., 2004; Barranco ve Eckhert, 2006).

Deneysel çalışmalar borun prostat kanserine karşı koruyucu özelliğe sahip olduğunu göstermektedir. PSA (Prostata Özgü Antijen), prostat kanserinin iyi bilinen bir belirtecidir. NPBA (3-nitrofenil borik asit) ve borik asitin, PSA'nın enzimatik aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur. Borik asitin tümör ilerlemesi ve metastazını da engellediği görülmüştür. Elde edilen sonuçlar, PSA aktivitesinin azaltılması amacıyla bor bileşiklerinin kullanılabileceğini göstermiştir (Gallardo-Williams ve ark., 2003).

İmmün sistemi baskılanmış farelerde oluşturulan insan prostat adenokarsinom modelinde, bor takviyesinin mitotik figürlerde ve tümörlerde büyümeyi azalttığı bulunmuştur. Elde edilen sonuçlara göre, uygun konsantrasyonlarda borik asitin prostat kanseri riskini azalttığı düşünülmüştür (Gallardo-Williams ve ark., 2004).

2007'de ABD Teksas'ta yapılan bir araştırmada, yeraltı sularındaki bor konsantrasyonlarının, prostat kanserine yakalanma ve ölüm oranlarıyla ters bir korelasyona sahip olduğunu göstermiştir (Barranco ve ark., 2007).

Hepatoma hücre hattına (HepG2) borik asit muamelesi sonucu; DNA hasarı, hücre döngüsünün durması ve apoptoz aktivitesinin artışı gözlenmiştir (El-Hefny ve ark., 2020; Tombuloglu ve ark., 2020).

İnsan cilt melanom hücre hatlarında, yüksek BA konsantrasyonlarının anti-proliferatif bir etkiye sahip olduğu ve apoptozu indüklediği raporlanmıştır (Acerbo ve Miller, 2009).

Korkmaz ve arkadaşlarının Balıkesir ilinde yaptıkları çalışmada, bor açısından fakir ve zengin bölgelerde yaşayan kadınlardan alınan smear örnekleri karşılaştırılmıştır. Bor zengini bölgelerde yaşayan kadınların diyetle aldıkları günlük ortalama bor miktarı 8,41 mg iken bor bakımından fakir kesimde yaşayan kadınlar için 1,26 mg olarak bildirilmiştir. Bor bakımından zengin kesimde yaşayan 472 kadında servikal kanserin sitopatolojik belirtileri görülmezken, bor açısından fakir bölgelerdeki 587 kadından 15'inde sitopatolojik olarak serviks kanseri bulgularına rastlanmıştır (Korkmaz ve ark., 2007).

Yüksek bor alımı, erkeklerde prostat kanseri, kadınlarda ise akciğer kanseri riskinin daha düşük olmasıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Mahabir ve ark., 2008; Henderson ve ark., 2015).

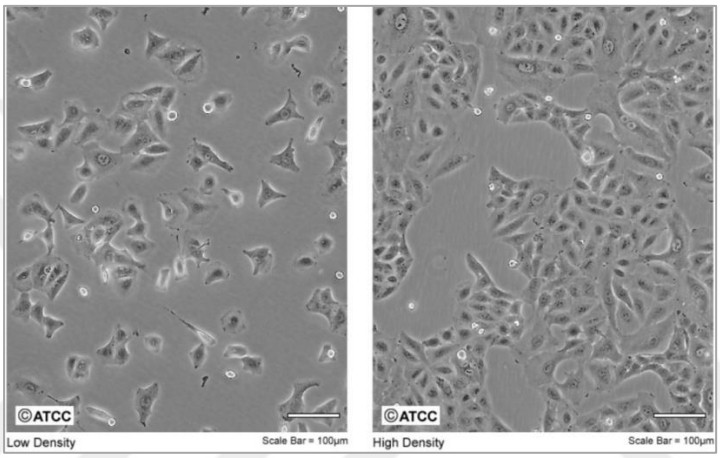
Borun karbon atomuna olan fiziksel ve kimyasal özellikleri bakımından benzerliği sebebiyle biyo uyumunun yüksek olması ve küçük atom çapı nedeniyle hücre porlarından rahatça geçerek hücre içine girme özelliği nedeniyle anti-kanser tedavide ilaç taşıyıcı olarak yaygın kullanılmaktadır. Bunun en bilinen örneği BNCT (boron nötron yakalama tedavisi)'dir ve bu tedavi 50 yıldan fazla bir süredir uygulanmaktadır (İdiz ve ark., 2018).

Kanser tedavisinde son zamanlarda kullanılan BNCT yöntemi ile radyoaktif olmayan ve ^{10}B taşıyan bor bileşiği damar içinden enjekte edilir ve hedef tümör hücreleri tarafından seçimli olarak hücre içine alınması gerçekleştirilir. Hücre içine alınan bor bileşiği, nötron kaynağından gelen nötronları yakaladıktan sonra parçalanır ve yüksek enerji yüklü parçacıklar açığa çıkar. Bu yüksek enerji yüklü parçacıklar hareket yetenekleri kısıtlı olduğundan dolayı çok uzağa hareket edemezler ve tümör hücresine tüm enerjilerini bırakırlar, böylece tümör hücresindeki DNA'nın zarar görmesini sağlayarak hücrelerin yeniden üremesini engellemiş olurlar. Özellikle beyin kanserinin tedavisinde kullanılan bu yöntemde hedef doğrudan tümör hücreleri olduğundan sağlıklı hücrelere verilecek zararın minimum düzeyde olması nedeniyle tercih edilebilir (Barth ve ark., 1999; Coderre ve ark., 2003).

Sonuç olarak bor ve bor içeren moleküllerin günlük diyette doğal anti-kanser ajanı olarak kullanılabileceğini ve borun, kanser tedavisi amaçlı, potansiyel ilaçlar için kaynak olarak sunulabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, borun uygun bir şekilde kullanılabilmesi için, etki mekanizmaları ve toksisite riski anlaşılabilmesi için hem *in vivo* hem de *in vitro* olarak daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

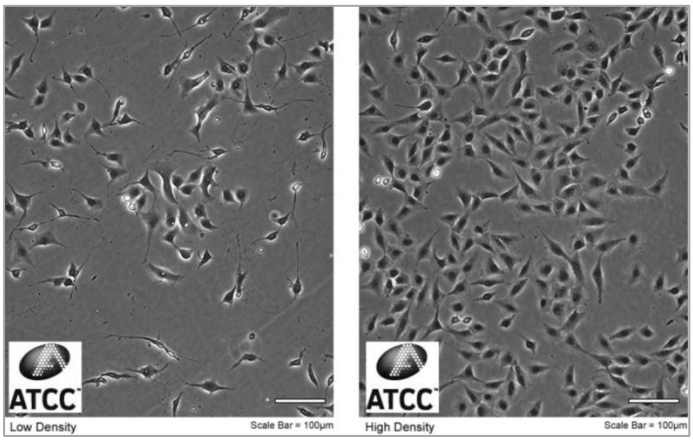
1.5. A549 VE BEAS-2B HÜCRE HATLARI

A549 hücre dizisi, 1972 yılında D.J. Giard ve ekibi aracılığıyla 58 yaşındaki Kafkas bir erkeğin *KRAS* G12S mutant ve *EGFR* wild tip olduğu bilinen adenokarsinomik akciğer dokusundan biyopsi yapılarak alınmıştır. A549 hücreleri, 66 kromozomlu hipotriploid alveolar bazal epitel hücreleridir. A549 hücreleri, immünoperoksidaz boyama ile keratin için pozitiftir. Hücreler, sitidin difosfokolin yolunu kullanarak, sitoplazmada lipit damlacıkları olarak ortaya çıkan fosfolipidleri (lesitinler) sentezleyebilir. (Huang ve ark., 2013; Leung ve ark., 2018, ATCC, 2021).



Şekil 1.17. A549 hücre hattının mikroskobik görüntüleri (ATCC)

BEAS-2B hücre hattı ise ilk olarak 1989'da R. R. Reddel ve arkadaşları tarafından kanserli olmayan bireylerin otopsisinden elde edilen normal insan bronşiyal epitelinden izole edilmiştir. Hücreler, bir adenovirüs 12-SV40 virüs hibridiyle (Ad12SV40) enfekte edilip klonlanmıştır (ATCC, 2021).



Şekil 1.18. BEAS-2B hücre hattının mikroskobik görüntüleri (ATCC)

2. MATERYAL VE METOD

2.1. MATERYAL

Tablo 2.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin listesi

Kimyasal Maddeler
Gentra Puregene, Qiagen
%0,25 Tripsin-EDTA in HBSS (1x) with Phenol Red, Cegrogen biotech
1x PBS, Gibco
Taq DNA Polymerase, Thermo Scientific
Etanol, ISOLAB
AmpFLSTR® Identifiler® plus PCR Amplification Kit, Applied Biosystems
Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems
GeneScan™-500LIZ™, Applied Biosystems
RPMI 1640, +L-Glutamine, Biological Industries
Foetal Bovine Serum, Biological Industries
Penisilin-Streptomisin (10.000U/ml), Gibco
Dimetil sülfoksit (DMSO), Sigma
Tripan mavisi (%0,4), Sigma
Borik Asit, Sigma
Sulforhodamine B sodium salt, Chemcruz
Asetik asit, Merck
Trikoloroasetik asit, Sigma
Trizma Base, Sigma
Muse® Annexin V & Dead Cell Kit, Merck Millipore
Trizol, Invitrogen
Kloroform, Sigma
2-propanol, ISOLAB
DEPC Water, BIO BASIC
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific
1X TE BUFFER, Thermo Scientific
DreamTaqTM Green PCR Master Mix (2X), Thermo Scientific
10x TBE BUFFER, BIOBASIC
Agaroz, Sigma
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

Tablo 2.2. Deneylerde kullanılan sarf malzemelerin listesi

Sarf Malzemeler
Santrifüj tüpleri (0,2-0,5-1,5-2 mL), Axigen
Serolojik pastör pipet (5-10-25-50 mL), Costar
Pipet uçları (10-100-200-1000 µl), Axigen
25cm^2 ve 75cm^2'lik flask, Granier Bio-One
5 mL ve 10 mL'lik enjektörler, Genject
6 ve 96 kuyulu plate, TPP
Steril santrifüj tüpleri (15-50 mL), CELLSTAR
Steril tek kullanımlık filtre (0,2 mikron), ISOLAB
Cryotup 2 mL, NEST
Thoma lamı neubauer improved, ISOLAB
xCELLigence 16 well E-plate, Agilent

Tablo 2.3. Deneylerde kullanılan cihazların listesi

Cihazlar
NanoDrop2000/2000c Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific
SimpliAmp^{TM} Thermal Cycler, Applied Biosystems
3500Xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems
Plate Reader-Spektrofotometre, BMG Labtech, Spectrostar
Muse Cell Analyzer Cihazı, Merck
T100 Thermal Cycler, BIO-RAD
Elektroforez GÜÇ KAYNAĞI, THERMO SCİENTİFİC
Corbett Research RG-6000 Real-time PCR Thermocycler Qiagen Roto-Gene Q
10-200-1000 µl pipet setleri, EPPENDORF
200 µl çok kanallı pipet, Brand
-80°C Buzdolabı, AUCMA
-20°C Buzdolabı, Profilo
+4 °C Buzdolabı, REGAL
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
Mikrodala Fırın, ALTUS
xCELLigence RTCA DP, Agilent

2.2. METOD

2.2.1. Hücre Kültürü

Deneylerde A549 insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattı ve BEAS-2B normal insan bronşiyal epitel hücre hattı kullanıldı. Hücre hatları Prof. Dr. Engin Ulukaya'nın nazik katkılarıyla İstinye Üniversitesi Moleküler Kanser Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir.

2.2.1.1. Besiyerinin hazırlanması

A549 ve BEAS-2B hücreleri için kullanılan besiyeri, RPMI içerisine %10 FBS ve %1 Penisilin-Streptomisin eklenerek hazırlandı.

2.2.1.2. Hücre hatlarının stoktan çıkartılması

Donmuş halde bulunan stok hücrelerini çoğaltmak için kriyovialler -85°C'den alınarak hızlı bir şekilde 37°C'de 2 dk sıcak su banyosunda çözdürüldü. Çözülen hücre süspansiyonu; 15 ml'lik falkon tüplerindeki %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin içeren 8 ml RPMI 1640 besiyerine alındı. Tüpler 5 dk 800 rpm santifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak pellet üzerine 1 ml besiyeri eklendi ve hücrelerin süspansiyon haline gelmesi sağlandı. 25 cm^2'lik flaskların içine 7 ml besiyeri ve üzerine 1 ml'lik hücre süspansiyonu eklendi. Hafif karıştırılarak 37°C'de, %5 CO_2'lik etüvde kültüre edildi. 24 saat sonra besiyeri 37°C'de ısıtılan 8 ml besiyeri ile değiştirilerek, tutunmayan ve ölü hücreler ortamdan uzaklaştırılmış oldu.

2.2.1.3. Hücre hatlarının pasajlanması

Hücrelerin pasajlanması işlemi hücre hatlarının flask yüzeyini %80-90 oranında kapladıklarında (konfluent olduklarında) gerçekleştirildi. İlk olarak flask içerisindeki besiyeri aspire edildi ve hücre atıklarından ve serumdan arındırılması için 1x PBS (3 ml) eklenerek hücre yüzeyinin yıkanması sağlandı. PBS aspire edilerek ortamdan uzaklaştırıldı ve hücrelere 1 ml %0,25 Tripsin-EDTA eklenerek, 37°C ve %5 CO_2'de 3-5 dk inkübe edildi. Bu şekilde flask yüzeyine yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılmaları sağlandı. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskop ile kontrol edildikten sonra tripsinin aktivitesini inhibe etmek amacıyla tripsinin 5-8 katı olacak şekilde besiyeri eklendi. Besiyeri eklenirken flask yüzeyi birkaç kez yıkanarak hücreler toplandı ve 15 ml'lik falkon tüpe alındı ve 5 dk 800 rpm'de santrifüj yapıldı.

Süpernatant kısmı uzaklaştırılıp kalan pellet 1 ml besiyerinde çözündükten sonra 12 ml besiyeri ilave edildi. 13 ml'lik hücre süspansiyonu 75 cm^2 flasklara ekilerek, 37°C ve %5 CO_2 ortama sahip inkübatörde kültüre edildi ve istenilen yoğunluğa ulaşana kadar hücrelerin çoğalmaları sağlandı.

2.2.1.4. Hücre hatlarının stoklanması

A549 ve BEAS-2B hücreleri konfluent duruma geldiklerinde, flask içerisindeki besiyeri aspire edildi ve 1x PBS ile yıkaması yapıldı. PBS uzaklaştırıldı ve flask yüzeyine yapışan hücrelerin kaldırılması için 3 ml %0,25 Tripsin-EDTA eklenerek hücreler 37°C, %5 CO_2 içeren ortamda 3-5 dk inkübasyonu sağlandı. Hücrelerin yüzeyden ayrıldığı mikroskop ile kontrol edildikten sonra tripsinin aktivitesini inhibe etmek amacıyla tripsinin 5-8 katı olacak şekilde besiyeri eklendi. Besiyeri eklenirken flask yüzeyi birkaç kez yıkanarak hücreler toplandı ve 15 ml'lik falkon tüpe alındı ve 5 dk 800 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant kısım aspire edilerek, karanlık ortamda pellet üzerine her bir kriyovial için $1x10^6$ hücre olacak şekilde 1 ml dondurucu medium (%5 DMSO + %95 FBS) eklendi. Kriyovial tüpler 15 dk +4°C'de, 30 dk -20°C'de bekletildikten sonra -85°C'ye kaldırıldı.

2.2.1.5. Hücre kültürü karakterizasyonu

Hücre hatları bilimsel araştırmada önemli bir araçtır. Bu sebeple hücre dizilerinin kontaminasyonu ve yanlış tanımlanması ciddi bir sorundur. Science'da yer alan bir yayın birçok hücre kültürü çalışması yapılan, önemli bir laboratuvarın hücre dizilerinin yanlış tanımlanmasını ortaya çıkarmıştır (Chatterjee, 2007). Hücre kültürleri, etiketleme hataları, patologlar tarafından yanlış sınıflandırma ve diğer hücre tipleri ile çapraz kontaminasyon nedeniyle başından beri yanlış tanımlama riski altındadır. Bu ve buna benzer makalelerden sonra laboratuvarlarda hücre dizilerinin STR analizi ile doğrulanması gerektiği bildirilmiş ve standartlar oluşturulmuştur (Barallon ve ark., 2010).

DNA İzolasyonu

Hücre hatlarının DNA izolasyonu Qiagen Gentra Puregene kiti ile firma talimatlarına uygun olarak gerçekleştirildi. Hücreler tripsin ile kaldırıldı. 10^6/ml hücre ile DNA izolasyonuna başlandı. Hücreler 1,5 ml ependorf tüpe alındı. 5 dk 300 g'de santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 200 µl 1x PBS ile çözdürüldü. 300 g'de 5 dk santrifüj edildi. 20 µl kalacak şekilde üstteki süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı. Vorteks ile hücreler çözdürüldü. Hücrelere 300 µl Cell Lysis solüsyonu eklendi ve yüksek hızda 10 sn vorteks yapıldı. Daha sonra 1,5 µl RNase A solüsyonu eklendi. 37°C'de 10 dk inkübe edildi. Ortamdaki proteinleri çöktürmek için 100 µl Protein Precipitation Solüsyonu eklendi. 20 saniye yüksek hızda vorteks yapıldıktan sonra 13000 g'de 1 dk santrifüj yapıldı. Pellete dokunmadan süpernatant dikkatlice çekilerek ependorf tüpüne (1,5 ml) aktarıldı ve 300 µl izopropanol ilave edildi. Yaklaşık 50 defa ters yüz edilerek DNA'nın görünür hale gelmesi sağlandı ve 13000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. 300 µl %70'lik etanol ile DNA pelleti yıkandı. 13000 g'de 1 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Tüpün kapağı açık bir şekilde 5 dk oda sıcaklığında alkolün uzaklaşması sağlandı. 100 µl DNA Hydration solüsyonu eklendi. 65°C'de 10 dk inkübe edilerek DNA'nın çözüldü. DNA'lar -20°C'de saklandı.

DNA Miktar Tayini

İzole edilen DNA'ların konsantrasyonu ve saflığının değerlendirilmesi için NanoDrop cihazı kullanılmıştır.

Nükleik asit ölçümü yapılmadan, öncelikle referans bir çözeltinin cihazda okutularak spektrofotometre ölçeğinin sıfırlanması gerekmektedir. Daha sonra 2 µl DNA numunesi pedestal üzerine konulduktan sonra ölçüm yapıldı ve DNA'ların konsantrasyon ve OD (260/280 ve 260/230) değerleri hesaplandı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA Amplifikasyonu

Genotipleme AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR Amplification kiti ile yapılmıştır. Reaksiyon eş zamanlı 15 ayrı STR bölgesini çoğaltarak, 60-550 bp büyüklüğünde amplikonlar oluşturabilen multipleks PCR çalışmasını kapsamaktadır. Bu reaksiyonda ticari olarak satın alınan, AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR Amplifikasyon kiti kullanılmıştır. PCR reaksiyon karışımı ve PCR programı Tablo 2.4. ve 2.5. göre hazırlandı. PCR için SimpliAmp^{TM} Thermal Cycler cihazı kullanıldı.

Tablo 2.4. PCR reaksiyon karışımı içeriği

Solüsyonlar	**Hacim**
AmpFLSTR® Identifiler® Plus Master Mix	10 µl
AmpFLSTR® Identifiler® Plus Primer Set	5 µl
DNA (1 ng)	1 µl
NF Su	9 µl

Tablo 2.5. PCR amplifikasyon süreci

Sıcaklık	**Süre**	
95°C	11 dk	
94°C	20 sn	29 döngü
59°C	3 dk	
60°C	10 dk	
4°C	∞	

Kapiller Elektroforezi

PCR ürünlerinin elektroforezi 24-kapillerli Applied Biosystems 3500XL Genetic Analyzer cihazında yapıldı. Elektroforez içeriği Tablo 2.6.'ya göre hazırlandı. Örnekler cihaza yüklendi. Örneklerin elektroforez aşamasında yürütme koşulları AmpFLSTR® Identifiler® Plus PCR Amplifikasyon kit protokolüne göre yapıldı. Kit için önerilen GS STR POP7 (1 mL) G5 modülü kullanıldı. Analiz GeneMapper Software 5 sistemi ile yapıldı.

Tablo 2.6. Elektroforez içeriği

Solüsyonlar	**Hacim**
Hi-Di™ Formamide	20 µl
GeneScan™-500LIZ™	0.3 µl
PCR ürünü	2 µl

2.2.1.6. Hücre hatlarında mikoplazma kontaminasyon kontrolü

Mikoplazma hücre hattı kontaminasyonu, biyolojik deneylerde inatçı ve ciddi bir sorundur. Mikoplazma boyutları nedeniyle görselleştirilemez ve bu nedenle hücre deneylerinin sonuçlarını fark edilemeyecek şekilde etkileyerek hatalı veya yanıltıcı sonuçlara yol açabilir (Wan ve ark., 2020).

Mikoplazmalar, 0.1-0.8 mikron boyutlarında çok küçük organizmalardır, hücre duvarı yoktur ve bu nedenle birçok antibiyotiğe dirençlidir. Özel boyama yolları ve tekniklerle varlıkları tespit edilebilir (Boslett ve ark., 2014).

Hücre kültüründe Mikoplazma kontaminasyonunu tespit edebilmek için PCR-tabanlı testler çok popüler bir yöntem haline gelmiştir. Yöntem son derece hassas ve hızlı sonuç açısından, araştırmacılar tarafından son zamanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır.

Hücre hatlarının mikoplazma kontaminasyonu açısından değerlendirilebilmesi için PCR bileşenleri Tablo 2.7.'ye göre hazırlandı ve PCR koşulları Tablo 2.8.'e göre yapıldı.

Tablo 2.7. PCR reaksiyon bileşikleri

Solüsyonlar	**Hacim**
10X Buffer	5 µl
$MgCl_2$ (50 mM)	1,5 µl
Oligo Myc (F)	2,5 µl
Oligo Myc (R)	2,5 µl
Tag (IU)	0,25 µl
dNTP (2 mM)	5 µl
DNA	2 µl
Su	31,25 µl
Total	50 µl

Tablo 2.8. PCR program aşamaları

Sıcaklık	**Süre**	
95 °C	5 dk	
94 °C	1 dk	30 döngü
60 °C	1 dk	
72 °C	2 dk	
72 °C	10 dk	
4 °C	∞	

2.2.1.7. Tripan mavisi yöntemi ile hücrelerin sayılması

Hücrelerin sayımı için, tripsin ile kaldırılan hücrelerden 10 µl alınarak ependorf tüpe aktarıldı. Tüpe aynı oranda Tripan Mavisi boyası eklenerek iyice karışması sağlandı. Bu karışımdan 10'ar µl alınıp Thoma lamının her iki tarafına (neubauer sayım lamı) konularak lamın ortasında bulunan her iki 16 bölmede boyanmamış (canlı) hücreler sayılarak hücre konsantrasyonu ve % canlılık oranları aşağıda verilen formüller ile hesaplandı.

Hücre konsantrasyonu (hücre/ml) = Sayılan hücre sayısı x 10^4
Canlılık oranı (%) = Sayılan canlı hücre miktarı/Sayılan toplam hücre miktarıx100

2.2.2. Borik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan borik asit medium içerisinde çözülerek konsantrasyon 2 M olacak şekilde stok solüsyonu hazırlandı (25 ml medium içerisinde 3,092 gr borik asit çözüldü ve 0,22 µm'lik enjektör filtresinden geçirildi). Her hücre borik asitin farklı konsantrasyonu (10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 35 mM ve 50 mM) ile muamele edildi.

Tablo 2.9. Borik asit çözeltisinin hazırlanması

2M stok çözelti	Medyum	Konsantrasyon	Final Konsantrasyon
25 µl	2475 µl	20 mM	10 mM
37,5 µl	2462,5 µl	30 mM	15 mM
50 µl	2450 µl	40 mM	20 mM
62,5 µl	2437,5 µl	50 mM	25 mM
87,5 µl	2412,5 µl	70 mM	35 mM
125 µl	2375 µ	100 mM	50 mM

2.2.3. xCELLigence Teknolojisi ile Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

xCELLigence testi ile hücre büyümesi, çoğalması ve morfolojik etkileri gerçek zamanlı olarak analiz edilebilmektedir (Yah ve Simate, 2020).

Bu teknoloji, doku kültürü ortamı gibi elektriksel olarak iletken bir çözelti varlığında, bir mikrotitre plakasının alt yüzeyinde bulunan altın mikroelektrotlar arasında iletilen elektron akışını ölçerek çalışır. Hücreler, plaka yüzeyine yapışır ve dizi boyunca xCELLigence yazılımı tarafından ölçülen ve kaydedilen elektrik empedansını etkiler. Empedans ölçümü; hücrelerin durumu (sayısı, morfolojisi, canlılığı ve hareketi) ilişkin kantitatif veri sağlar. Empedans değerleri, yazılım tarafından Hücre İndeksine (CI) dönüştürülür (Kho ve ark., 2015; Hamidi ve ark., 2017).

xCELLigence sisteminde; hücreler tabanı altın mikroelektrotlarla kaplamış olan ve "E-plate" denen özel 16 kuyucuklu kültür kabına ekilir. Bu elektrotlar; kuyucuklar içerisindeki besiyerinin iyonik çevresi ile etkileşim halinde olduğundan elektrotları saran hücrelerin sayısı, morfolojisi ve yapışma gücüyle sürekli olarak değişiklik gösterebilir.

Borik asit muamelesine doğru hücre sayısı ile başlayabilmek için her bir hücre hattına titrasyon deneyleri yapıldı. Hücre titrasyon deneyleri sonucunda belirlenen hücre sayılarına göre hücreler ekilerek borik asit ile muamele edildi.

Her hücre hattının çoğalma süresi (doubling time) farklı olduğundan yapılacak ekimler hücrelerin çoğalma sürelerine bağlı olarak belirlendi. Bundan dolayı farklı sayıda hücreler E-plate'lere ekildi zamana bağlı değişimleri izlendi. BEAS-2B hücre hattı için her bir kuyucukta 5000, 7500, 10000, 15000 ve 20000 hücre; A549 hücre hattı için ise her bir kuyucukta 3500, 5000, 6500, 7500 ve 10000 olacak şekilde titrasyon deneyleri yapıldı.

Harvest işlemi uygulanarak hücreler kaldırıldı. Hücre sayımı gerçekleştirildi. E-plate'in her bir kuyucuğuna 100 µl medyum eklendi ve background ölçümü yapıldı. 16 well E-plate'lere her bir hücre sayısı için üçer tekrar olacak şekilde 100 µl hücreler ekildi. Ekimin ardından 30 dakika oda sıcaklığında (Biyogüvenlik kabini içinde) E-plate'ler inkübe edildi. E-plate'ler RTCA-DP sistemine yerleştirildi ve 15 dk'da bir empedans ölçecek şekilde program kurularak deney başlatıldı. Hücre proliferasyonundaki zamana ve hücre sayısına bağlı değişiklikler incelendi ve borik asit muamelesi için uygun hücre sayısı belirlendi.

2.2.4. Sulforhodamine B (SRB) Testi ile Canlılık Tayini

SRB metodu, 1990 yılında geliştirilmesinden bu yana, hücre bazlı çalışmalarda sitotoksisite tarama deneylerini düşük maliyetle gerçekleştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Vichai ve Kirtikara, 2006). SRB boyası, hafif asidik şartlarda stokiyometrik olarak proteinlere bağlanır ve bazik şartlarda çözünür forma getirilir. Daha sonra renk yoğunluğu kolorimetrik olarak ölçülür. Yöntem dört temel aşamadan oluşur: tedavinin hazırlanması, seçilen tedavi ile hücrelerin inkübasyonu, hücre fiksasyonu sonrası SRB boyanması ve absorbans ölçümü (Orellana ve Kasinski, 2016).

100 ml %1 asetik asit ve 400 mg SRB ile %0,4 (m/v) SRB boyası hazırlandı ve +4°C'ye kaldırıldı. Steril distile su ile %50 (m/v) oranında Trikoloroasetik asit (TCA) hazırlandı ve 4°C'ye kaldırıldı. Kuyucuk başına 100 µl besiyeri içerisine A549 için 5000 hücre, BEAS-2B için 7500 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildi. Kör olarak kullanılacak kuyulara 200 µl besiyeri eklendi. Negatif kontrole borik asit muamelesi yapılmamış olup sadece besiyeri ile A549 ve BEAS-2B hücre hatları eklendi. 37°C %5 CO_2 ortamında hücreler 24 saat inkübe edildi. Kuyucuklara tutunmuş olan hücreler üzerine borik asit bileşiğinin 6 farklı konsantrasyonu (10-15-20-25-35-50 mM) uygulandı. 48 ve 72 saatlik muamele süresi sonunda hücresel proteinleri fikse etmek için, her bir kuyuya 50 µl %50 (w/v) soğuk TCA ilave edildi ve +4°C'de 1 saat bekletildi. Fiksasyondan sonra plate ters çevrilerek TCA akıtıldı ve kuyucuklar 5 defa distile su ile yıkanılarak, kurutuldu. Yıkama sonrasında her bir kuyucuğa 50 µl %0,4 SRB solüsyonu ilave edildi ve karanlık ortamda normal şartlar altında 30 dk inkübasyon yapıldı. Daha sonra plate ters çevrilerek kuyucuklardan boya uzaklaştırıldı ve bağlanmamış boyayı uzaklaştırmak için kuyular %1 asetik asit (1 ml asetik asit+ 99 ml steril distile su) ile 5 defa yıkandı. Plate tamamen kurutulduktan sonra proteinlere bağlanan boyanın çözünebilmesi için her bir kuyucuğa 10 mM 150 µl Tris Bazı (121 mg tris bazı+100 ml steril distile su, pH:10) ilave edildi ve 100 rpm hızda orbital çalkalayıcıda 10 dk bırakıldı. Daha sonra hücrelerdeki optik yoğunluk (absorbans) 530 nm dalga boyunda spektrofotometre okuyucusunda ölçülerek ve elde edilen verilerle hücrelerin canlılık oranları hesaplandı.

Borik asit uygulanmamış kontrol grubundaki hücrelerin canlılığı %100 olarak belirlendi ve borik asit eklenen hücrelerin canlılığı için aşağıda verilen formül kullanıldı. Çalışmada kullanılan her konsantrasyon için üç farklı kuyucukta deney tekrar edildi.

% Canlılık = [100 × (Borik asit uygulanan hücrelerin absorbans ortalaması – Kör absorbans ortalaması) / (Kontrol grubunun absorbans ortalaması – Kör absorbans ortalaması)]

2.2.5. Anneksin-V Metodu

Fosfatidilserin (PS), sağlıklı hücrelerde hücre membranının iç yüzeyinde bulunur. Apoptozun erken evresinde kaspaz aktivasyonuna bağlı olarak PS'ler, aktif hale gelen Xkr8 aracılığıyla membranının dış tarafına transloke olurlar. Anneksin V, PS için yüksek afinite ile Ca^{+2} bağlayıcı ve lipid için seçiciliği yüksek bir proteindir ve hücre membranında geçememektedir (Mariño ve Kroemer, 2013; Kupcho ve ark., 2019).

Anneksin V, apoptotik hücreleri FITC ile işaretleyerek incelenebilmesine imkân sağlamaktadır. Yöntem Ca^{+2} varlığında fosfatidilserinlerin bu madde ile bağlanmasıyla hücre ölüm yüzdesi belirlenmektedir. Bu analizde sağlam membrandan geçemeyen DNA boyası olan 7-Aminoaktinomisin D (7-AAD), erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz evrelerinin belirlenmesini sağlamaktadır. 7-AAD, DNA'ya sıkı bağlanma yapabilen floresans bir moleküldür. Geç apoptotik veya nekrotik evrede membran yapısı degrade olmuş hücrelerdeki DNA'nın GC içeriği yüksek bölgelerine bağlanmaktadır.

Bu yöntemde hücrelerin boyalara bağlanıp bağlanmasına göre hücrenin hangi evrede olduğu belirlenebilmektedir.

	Non-Apoptotik	Erken Apoptotik	Geç Apoptotik	Nekrotik
Anneksin-V	-	+	+	-
7- AAD	-	-	+	+

Anneksin-V Metodu için;

A549 ve BEAS-2B hücre sayımı yapılarak $10^2 \times 10^3$/ml olacak biçimde 6'lı well platelere hücreler ekildi. 24 saat 37˚C ve %5 CO_2 ortamda hücreler kültüre edildi. 24 saat sonunda hücrelerin üzerindeki besiyeri tamamen atılarak 1 ml yeni besiyeri ve A549 hücre hattına 20-50 mM borik asit, BEAS-2B hücre hattına ise 14-50 mM borik asit 1 ml besiyeri içerisinde olacak şekilde eklendi. 37˚C ve %5 CO_2 ortamda hücreler 12 ve 24 saat kültüre edildi. Daha sonra borik asit uygulanan kuyuların ve kontrol kuyularının besiyeri, 15 ml'lik falkon tüplere toplandı. 6 kuyulu hücre kültür kaplarına 1 ml 1x PBS eklenerek hücreler yıkandı ve aynı falkon tüplerine toplandı.

Hücreleri kaldırmak için 500 µl %0,25 Tripsin EDTA eklendi ve 37˚C ve %5 CO_2 ortamda 3-5 dk inkübe edildi. Hücrelerin kalktığı mikroskop ile kontrol edildikten sonra kuyulara 1 ml besiyeri eklenerek hücreler 15 ml falkonlara alındı ve 5 dk 800 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı ve pelletin üzerine 100 µl %1 FBS içeren 1x PBS eklendi ve 100 µl hücre karışımı ependorfa (1,5 ml) alındı. Ependorflara 100 µl Muse™ Annexin V & Dead Cell solüsyonu ilave edildi. Orta seviyede ~5 saniye vorteks yapılarak homojen hale getirildi. Oda ısısında 20 dk karanlıkta inkübe edildikten sonra Muse™ Cell Analyzer ile okuma gerçekleştirildi.

2.2.6. RNA İzolasyonu

6 kuyulu well plate'e 2000 µL besiyeri içerisinde titrasyon sonucu belirlenen sayılarda hücreler ekildi. 24 saat sonra 1000 µL medyum atıldı ve uygulanacak madde 1000 µL içerisinde tekrar verildi (Toplam Hacim: 2000 µL). 6'lı well plate'deki besiyerinin tamamı uzaklaştırıldı ve hücreler 1 ml 1x PBS ile 2 defa yıkandı. Çeker ocak içerisinde 1000 µl Trizol eklenir. Trizol uygulamasından sonra kalkan hücreler 1,5 ml'lik ependorf tüplerine alındı. Ependorflara 200 µl Kloroform eklendi ve renk değişene kadar 2-3 dk sallandı. 4°C 12000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi. Tüpler santrifüjden sonra buza alındı. Üstteki şeffaf kısım yeni 1,5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı. 500 µl 2-propanol eklendi. Sallanarak karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. 4°C 12000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Tüpler santrifüjden sonra buza alındı. Süpernatant RNA'ya zarar verilmeden dikkatlice atıldı. %75'lik etanolden 1000 µl eklendi ve hafifçe sallandı. 4°C 12000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve alkolün uzaklaştırılması için 10-15 dk oda sıcaklığında tüplerin kapakları açık bir şekilde bekletildi. Alkol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra 40 µl DEPC Water eklenerek RNA pipetaj ile çözdürüldü.

2.2.6.1. NanoDrop ile RNA ölçümü

İzolasyonu gerçekleşmiş numunelerin RNA konsantrasyonları NanoDrop 2000/2000c 1.3.1 spektrofotometre cihazı ile ölçüldü. RNA numunelerinin 260 nm ve 280 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesi ile OD değerleri elde edilerek kalite tayini yapıldı.

2.2.7. cDNA Sentezi

Tüm RNA'lar 800 ng'a eşitlendi. Hesaplama işlemi şöyle yapıldı: izole ettiğimiz RNA değeri 500 ng/µl olsun. 1 µl'de 500 ng RNA varsa 800 ng RNA için kaç µl lazım? Oran-orantı formülü ile 1,6 µl'de 800 ng RNA olduğu bulunur. Alınacak RNA miktarı: 1,6 µl Hesaplamalar yaptıktan sonra çalışmaya geçildi. Örnek sayısı kadar 0,2 ml'lik PCR tüpü çıkartıldı. Her tüpe 1µl oligo$(dT)_{18}$ konuldu. Her bir örnek için hesaplanan miktarda RNA sırasıyla ependorf tüplere konuldu. Her bir örnek için hesaplanan miktarda su ependorf tüplere konuldu (örneğin RNA 1,6 µl ise 11,4 µl'ye tamamlayacak şekilde yani 9,8 µl su tüpe konuldu). 65°C'de 10 dk inkübasyon edildi.

Ayrı bir temiz ependorf tüpün içinde Tablo 2.11.'e göre 2.mix hazırlandı. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde hazırlanan mix, örnek tüplerine 8,6 µl olacak şekilde dağıtıldı.

Tablo 2.10. cDNA sentezi için hazırlanan 2.mix içeriği

5X Reaction Buffer	4 µl
Protector Rnase Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl
Deoxynucleotide Mix (10mM)	2 µl
DTT	1 µl
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	1,1 µl

30 dk 50˚C'de; 5 dk 85˚C'de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra spin attırıldı. Elde elden cDNA'lar -20°C'de saklandı.

2.2.8. Primer Dizaynı

Primerlerin dizaynı için NCBI Primer Blast ve SnapGene programları kullanıldı. Primerler oluşturulurken; 18-25 bp aralığında bulunması, erime sıcaklıklarının (TM) 3°C'den az veya fazla olması, dizinin GC içeriğinin %40-%60 arasında olması, son dizinin C veya G bazı olması, dizide dörtten çok baz tekrarı veya dinükleotid tekrarı olmaması göz önünde bulunduruldu. Primerlerin istenilen bölgeye bağlanıp bağlanmadığı ve diğer bölgelere spesifik olmayan bağlanma yapıp yapmadığı Primer Blast ile kontrol edildi.

Tablo 2.11. Dizayn edilen primer dizileri

Gen	Primer Dizisi	TM (°C)	Uzunluk (bp)
ACTB	F: TTCCTGGGCATGGAGTCCT	60	204
	R: AGGAGGAGCAATGATCTTGATC	57	
BAD	F: CCCAGAGTTTGAGCCGAGTG	60	249
	R: CCCATCCCTTCGTCGTCCT	61	
BAX	F: CTGACGGCAACTTCAACTGG	59	172
	R: CAACCACCCTGGTCTTGGATC	60	
BCL2	F: TCATGTGTGTGGAGAGCGTC	60	254
	R: TCACTTGTGGCCCAGATAGG	59	
CASP3	F: CTGGTACAGATGTCGATGCAGC	61	215
	R: CAGGTCAACAGGTCCATTTGTTC	60	
CASP8	F: TCCAAATGCAAACTGGATGATGAC	60	147
	R: GTCGTTGATTATCTTCAGCAGGC	60	
CASP9	F: GACCATGGGTTTGAGGTGG	58	243
	R: CTGCTCAAAGATGTCGTCCAG	59	
CYCS	F: CCGCCAATAAGAACAAAGGCATC	60	186
	R: ATAAGGCAGTGGCCAATTATTACTC	59	
FADD	F: CTCAAGTTCCTATGCCTCGGG	60	233
	R: GCTGCACACAGGTCTTCTTCC	61	

2.2.8.1. Primerlerin sulandırılması

Firmadan liyofilize halde alınan PCR primerleri, 1xTE (Tris-EDTA) ile sulandırılarak primer konsantrasyonları 100 µM veya 100 pmol/ml olacak şekilde ana stoklar hazırlandı. Elde edilen stok çözeltiler -20°C'de saklandı. PCR işleminde kullanılmak üzere stoktan 10 pmol primerler hazırlandı.

2.2.8.2. Gradiyent PCR

Real Time PCR'da kullanılacak olan primerlerin çalışma sıcaklığını bulmak için Tablo 2.13.'deki solüsyonlar ile gradiyent PCR yapıldı. Gradiyent PCR Biorad T100 cihazı kullanılarak Tablo 2.14.'deki koşullara göre gerçekleştirildi.

Tablo 2.12. Gradiyent PCR'da kullanılan solüsyonlar

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

Tablo 2.13. Gradiyent PCR koşulları

Sıcaklık	**Süre**	
95°C	5 dk	
95°C	30 sn	36 döngü
58-62°C	30 sn	
72°C	30 sn	
72°C	5 dk	
4°C	∞	

2.2.8.3. Agaroz jel elektroforezi

PCR sonrası istenen bölgenin amplifiye olup olmadığını kontrol etmek için %2'lik agaroz jelde PCR ürünleri yürütüldü. 2 g Agaroz Jel 100 ml 1x TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu içerisinde çözdürüldü. Mikrodalga fırında homojen olana kadar ısıtıldı. Çözelti soğutulduktan sonra, jele 2 mg/ml etidyum bromür 2 µl eklenerek karıştırıldı ve jel tablasına döküldü. Daha sonra tablanın tarakları yerleştirilerek jelin katılaşması beklendi ve katılaştıktan sonra, taraklar tabla üzerindeki jele zarar verilmeden yavaşça yerinden çıkartıldı.

Agaroz jel, tabla ile elektroforez tankına yerleştirildi üzerine 1x TBE tamponu ilave edildi. 5 µl PCR ürünü ve 1 µl 6xLoadING dye yükleme boyası karıştırıldı ve kuyucuklara yüklendi. İlk kuyucuğa yüklenen Hibrigen 100 bç'lik DNA ladder ile PCR ürünleri 125 Volt'luk sabit akımda 15 dakika boyunca yürütüldü. Çoğaltılan hedef DNA 302 nm dalgaboyunda UV ışık altında görüntülendi.

2.2.9. Real-Time PCR

Real-Time PCR reaksiyon karışımı Tablo 2.15.'e göre hazırlandı. Amplifikasyon için Tablo 2.16.'daki program şartlarında, "Corbett Research RG-6000 Real-time PCR Thermocycler Qiagen Roto-Gene Q" cihazı kullanıldı.

Tablo 2.14. Real-Time PCR reaksiyon içeriği

Solüsyonlar	**Miktar**
2X SYBR Green Reaksiyon Karışımı	10 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
cDNA	2 µl
NF Su	6 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo 2.15. Real-Time PCR programı

Sıcaklık	**Süre**	
94°C	4 dk	
95°C	30 sn	30 döngü
60°C	30 sn	
72°C	30 sn	
72°C	10 dk	
4°C	∞	

2.2.9.1. İstatiksel analiz

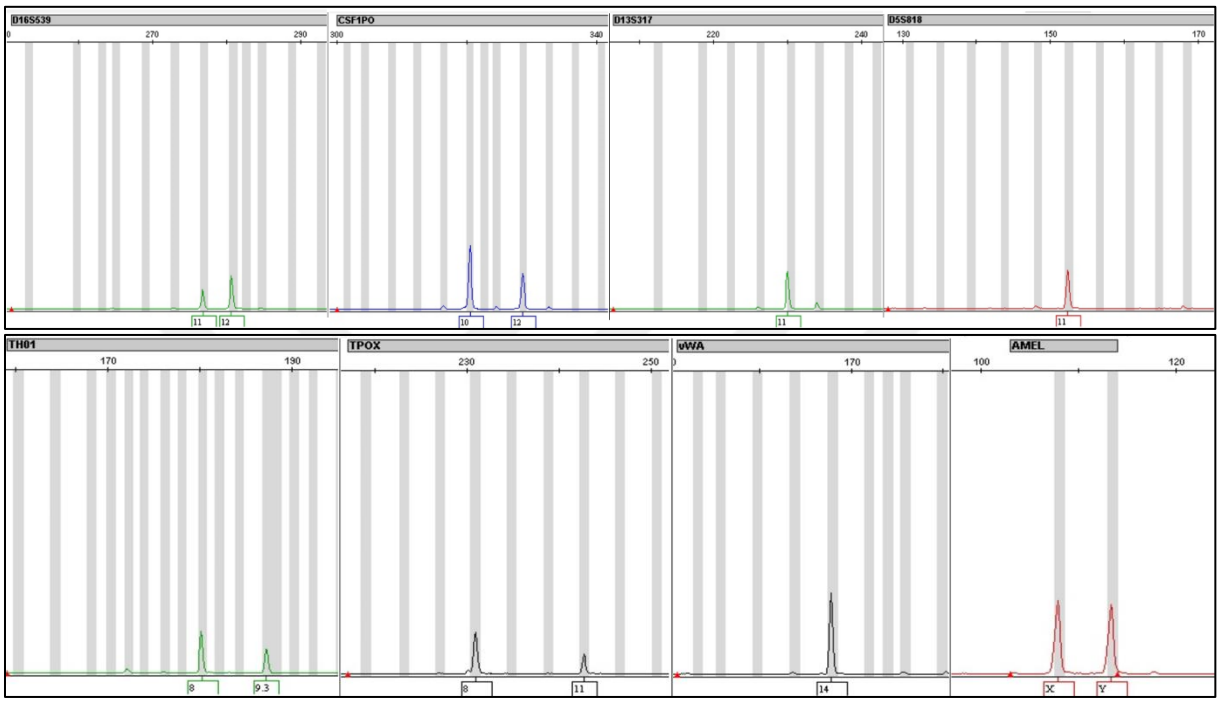
Real-Time PCR deneylerinde kontrol ve doz gruplarının karşılaştırılmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı. ΔΔCT değerleri aşağıda verilen formüle göre hesaplandı.

$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{housekeeping gen}})_{\text{deneysel grup}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{housekeeping gen}})_{\text{kontrol grup}}$

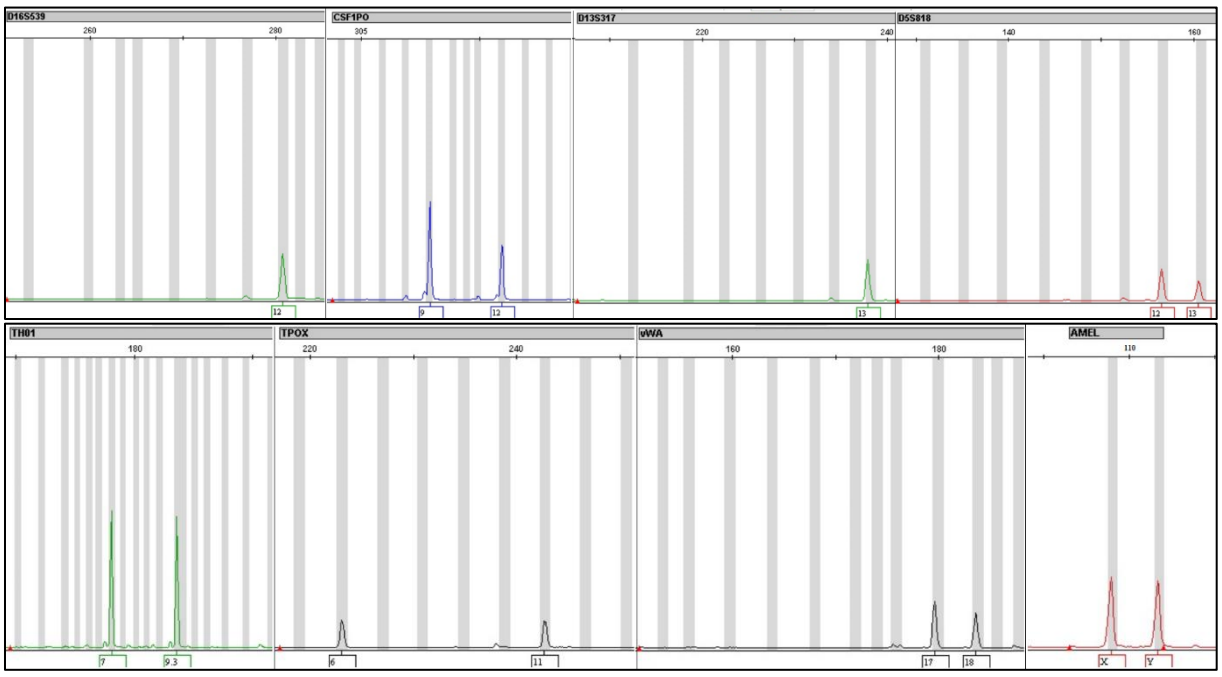
3. BULGULAR

3.1. Hücre Karakterizasyon Sonuçları

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



Şekil 3.1. A549 hücre hattının elektroferogram görüntüsü



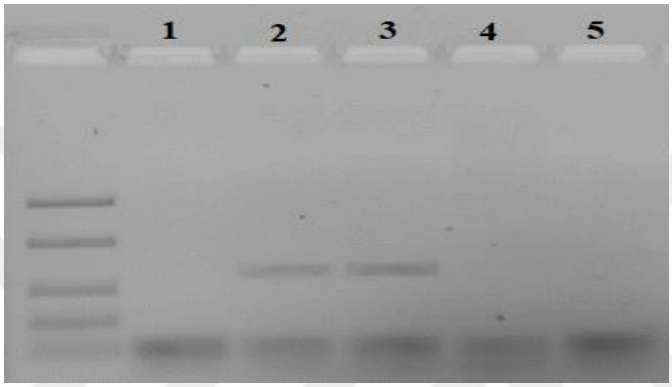
Şekil 3.2. BEAS-2B hücre hattının elektroferogram görüntüsü

Tablo 3.1. A549 ve BEAS-2B hücre hatlarının STR profilleri

	Amelogenin	CSF1PO	D13S317	D16S539	D5S818	TH01	TPOX	vWA
A549	XY	10,12	11	11,12	11	8,9.3	8,11	14
BEAS-2B	XY	9,12	13	12	12,13	7,9.3	6,11	17,18

3.2. Mikoplazma Kontaminasyon Kontrolü PCR Sonuçları

Mikoplazma kontaminasyonu kontrolü PCR sonrası %2'lik agaroz jel elektroforezi ile tespit edildi. Jelde görülen 434-468 bp PCR ürünü mikoplazma varlığını göstermiştir.

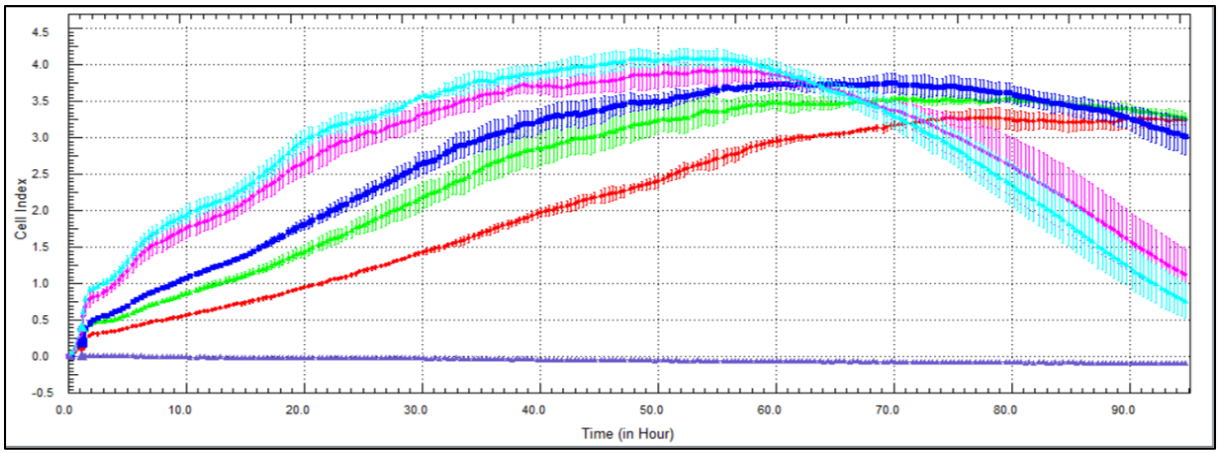


Şekil 3.3. PCR reaksiyonuna ait agoroz jel elektroforez görüntüsü. [1. A549 hücre hattı 2 ve 3. Pozitif kontrol 4. BEAS-2B hücre hattı ve 5. Negatif kontrol (su]

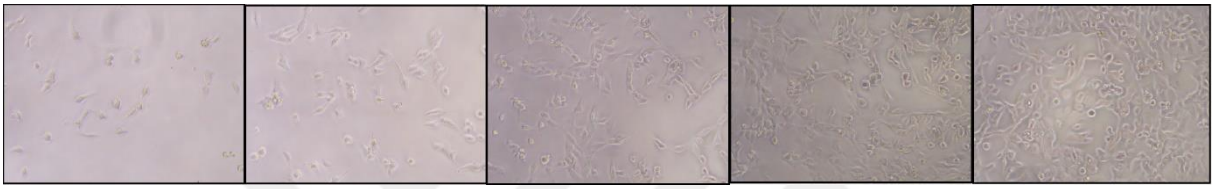
3.3. xCELLigence Teknolojisi ile Gerçek Zamanlı Hücre Titrasyon Deneyi Sonuçları

Hücre titrasyonunun belirlenmesi için gerçekleştirilen deney yaklaşık olarak 90 saat izlendi. Yapılan deneyler sonucunda BEAS-2B hücre hattı için kullanılacak hücre sayısı 7500/well; A549 hücre hattı için kullanılacak hücre sayısı 5000/well olarak belirlendi (Şekil 3.4 ve Şekil 3.6). Hücreler 24. saatte eş zamanlı olarak mikroskopta da incelendi (Şekil 3.5 ve Şekil 3.7).

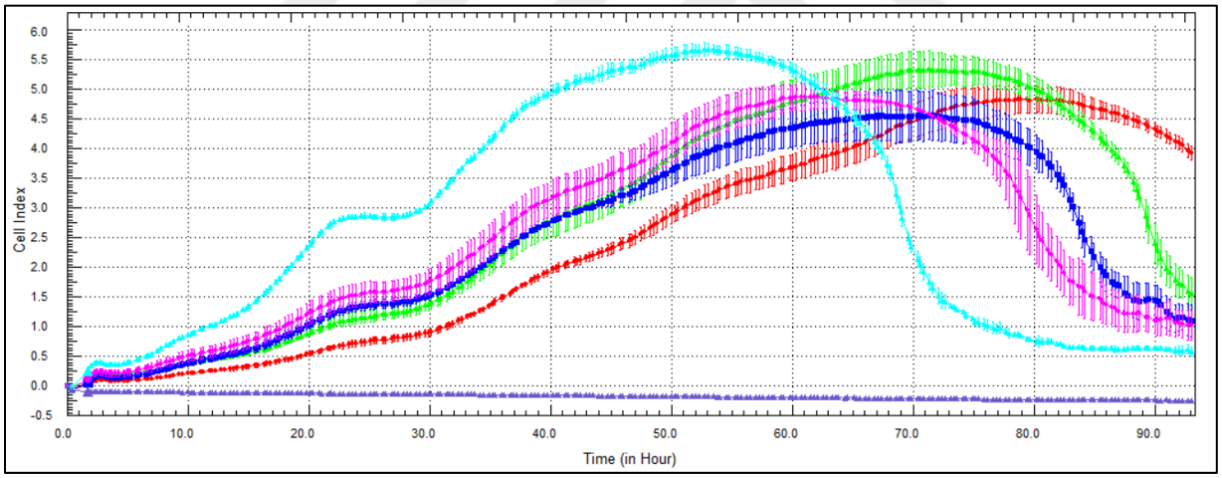
Hücre sayısı seçimi, 24. saatteki hücre indeksi, plato fazının uzun olması ve hücre görüntüleri dikkate alınarak gerçekleştirildi.



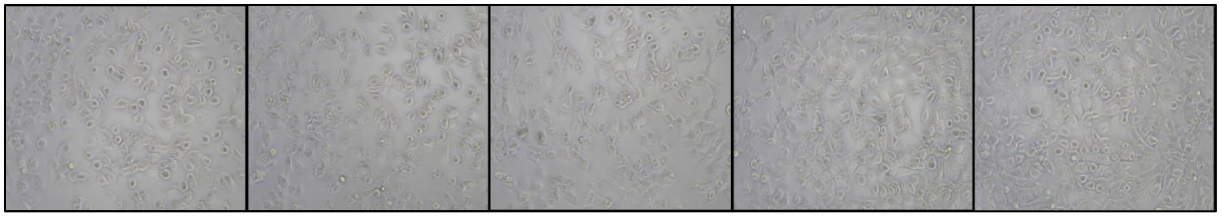
Şekil 3.4. BEAS-2B hücre hattı xCELLigence titrasyon deneyleri sonucu cihaz görüntüsü (Kontrol, 5000 hücre, 7500 hücre, 10000 hücre, 15000 hücre, 20000 hücre)



Şekil 3.5. BEAS-2B hücre hattı 24.saatteki 10x mikroskop görüntüleri (soldan sağa 5000, 7500, 10000, 15000, 20000 hücre)



Şekil 3.6. A549 hücre hattı xCELLigence titrasyon deneyleri sonucu cihaz görüntüsü (Kontrol, 3500 hücre, 5000 hücre, 6500 hücre, 7500 hücre, 10000 hücre)



Şekil 3.7. A549 hücre hattı 24.saatteki 10x mikroskop görüntüleri (soldan sağa 3500, 5000, 6500, 7500, 10000 hücre)

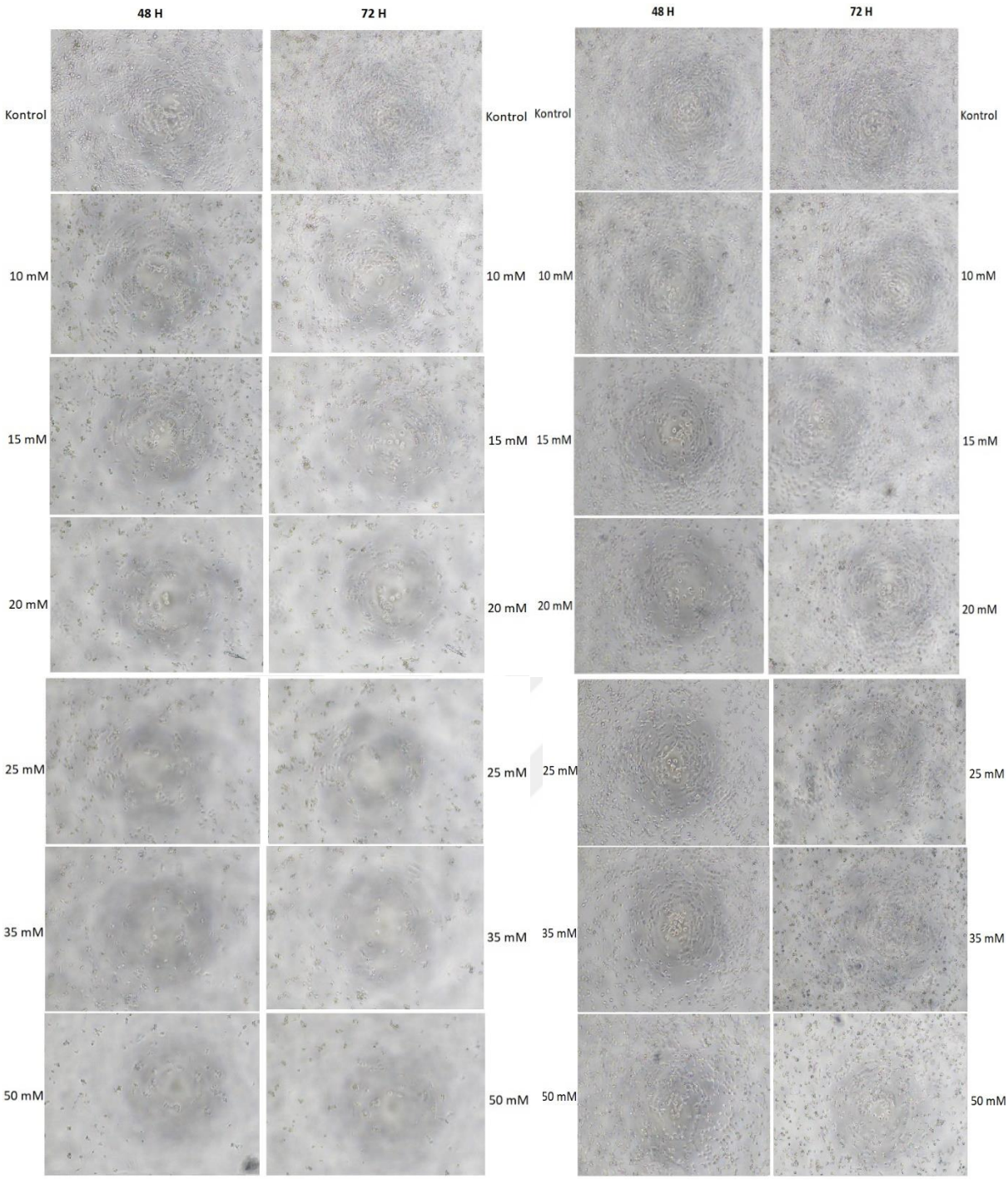
3.4. SRB Canlılık Testi Bulguları

A549 ve BEAS-2B hücre hatlarına 48 ve 72 saat süresince farklı konsantrasyonlarda (10-15-20-25-35-50 mM) borik asit bileşiği uygulanarak hücre canlılığı SRB testi ile belirlendi. Hücre hatlarında 48 ve 72 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda borik asit uygulaması sonrasındaki mikroskop görüntüleri Şekil 3.8.'de gösterilmiştir.

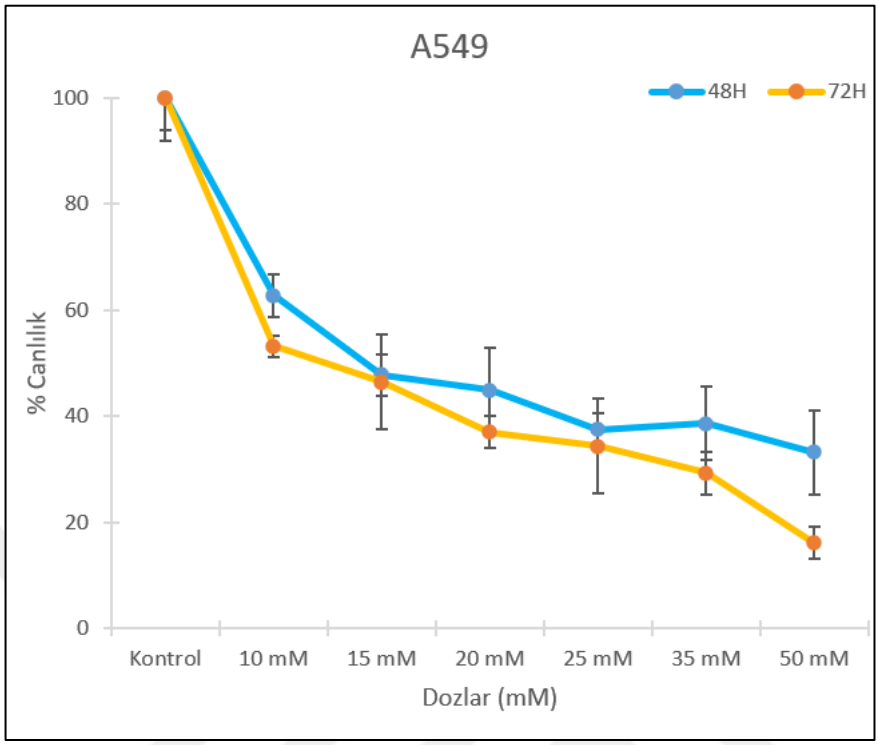
Negatif kontrol kuyucuklarındaki A549 ve BEAS-2B hücrelerinde beklenilen yoğunlukta proliferasyon gözlemlenmiştir.

SRB analizi sonucunda borik asit bileşiğinin, uygulanan dozla ters orantılı olarak hücrelerin canlılık yüzdesinde mikroskop fotoğraflarıyla uyumlu bir şekilde azalmaya neden olduğu belirlendi. SRB testi bulgularına göre, borik asidin uygulanan tüm konsantrasyonlarda anti-proliferatif etki gösterdiği belirlendi (Şekil 3.9. ve Şekil 3.10.).

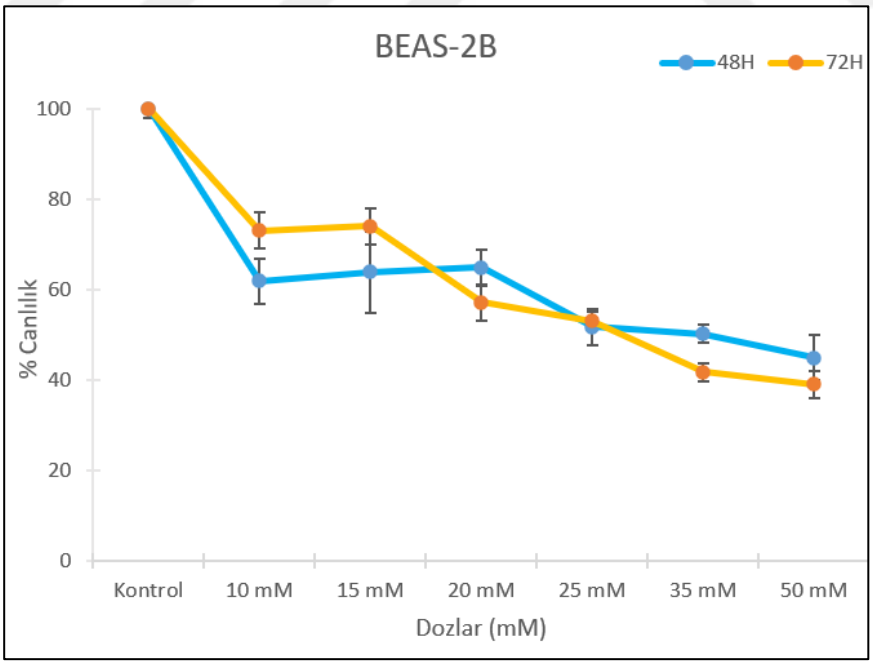
Bu deneyde A549 ve BEAS-2B hücrelerinin %50'sini öldüren dozun belirlenmesi (IC_{50}) amaçlandı. 48 saatlik borik asit muamelesi ile A549 hücreleri için IC_{50} değeri 20 mM; BEAS-2B hücreleri için ise 35 mM olarak bulundu. 72 saatlik borik asit muamelesi ile A549 hücreleri için IC_{50} değeri 17 mM; BEAS-2B hücreleri için ise 27 mM olarak bulundu. %50 canlılık sağlayan en yakın dozlar olan 10 mM, 20 mM, 50 mM dozları seçilerek ileri analizlere devam edildi.



Şekil 3.8. Borik asit ile 48 ve 72 saat muamele edilen A549 ve BEAS-2B hücre hatlarının mikroskop görüntüleri



Şekil 3.9. Doza bağlı borik asitin A549 akciğer kanseri hücre hattında canlılık üzerine etkisinin SRB testi ile gösterilmesi.

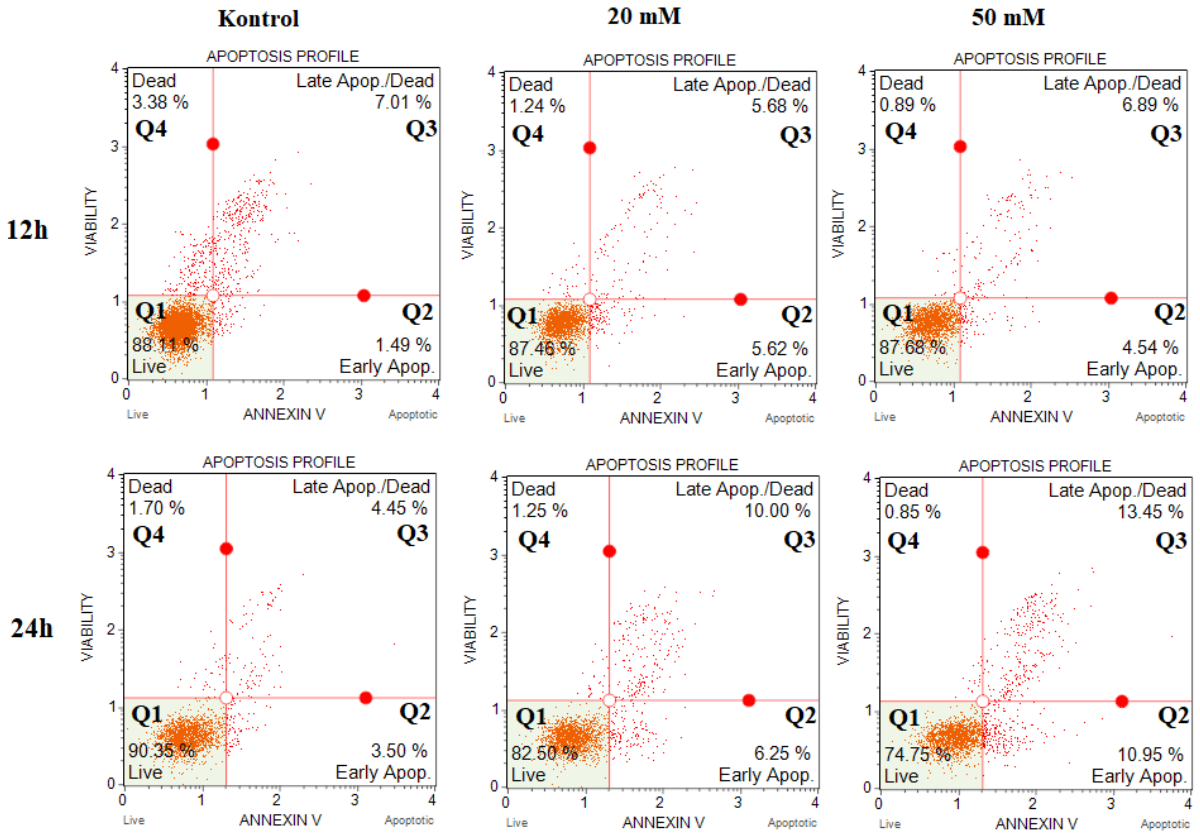


Şekil 3.10. Doza bağlı borik asitin BEAS-2B sağlıklı akciğer hücre hattında canlılık üzerine etkisinin SRB testi ile gösterilmesi.

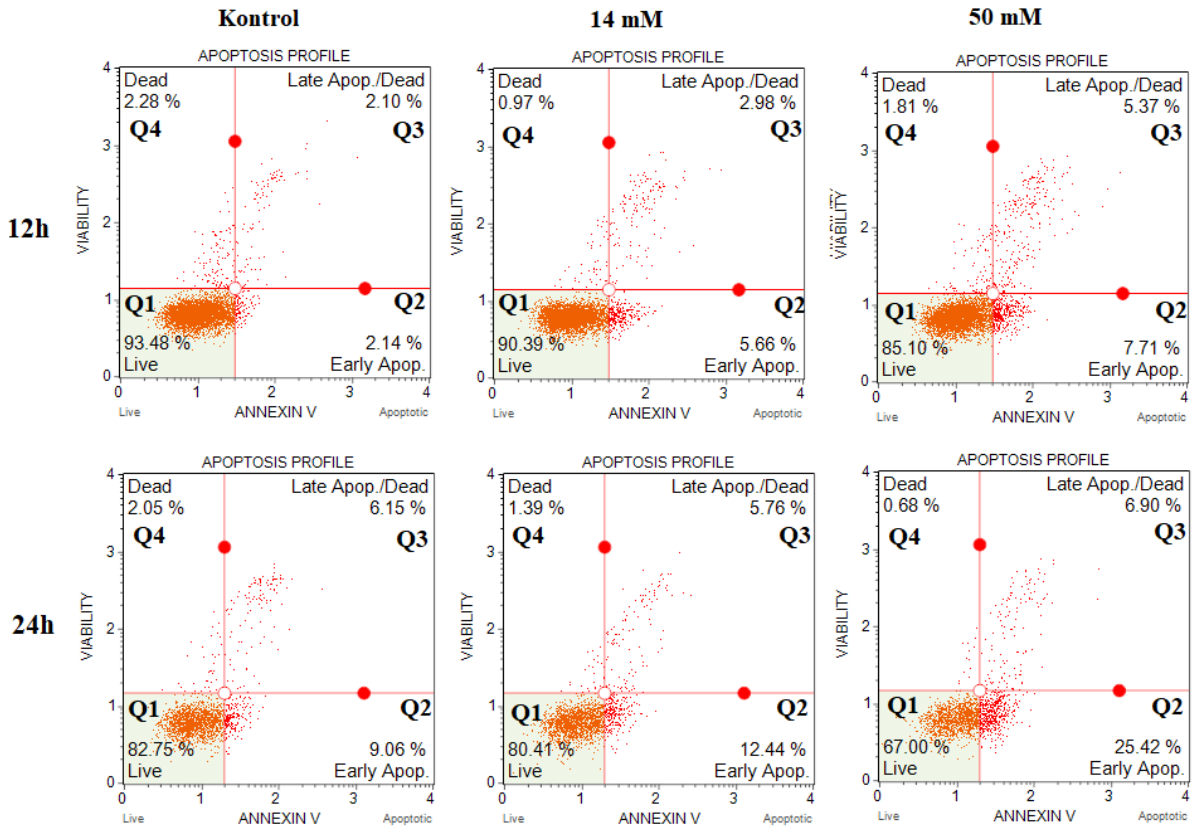
3.5. Anneksin-V Testi Bulguları

Borik asitin A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında yol açtığı apoptozun, akım sitometrisi sonuçları Şekil 3.11., Şekil 3.12., Tablo 3.2. ve 3.3.'de verilmiştir.

Annexin V-FITC ve 7-AAD negatif bölge canlı hücreleri (Q1), Annexin V-FITC pozitif ve 7-AAD negatif bölge erken apoptotik hücreleri (Q2), Annexin V-FITC ve 7-AAD pozitif bölge geç apoptotik hücreleri (Q3), Annexin V-FITC negatif ve 7-AAD pozitif bölge ise nekrotik hücrelerin (Q4) yüzde değerlerini göstermektedir. A549 hücre hattında borik asitin konsantrasyona ve zamana bağlı olarak apoptozu indüklediği tespit edilmiştir.



Şekil 3.11. Borik asitin kontrol, 20 mM ve 50 mM konsantrasyonlarında A549 hücre hattında Anneksin-V analizi ile bulunan apoptotik yüzde oranlarının 12 ve 24 saatlik histogramları



Şekil 3.12. Borik asitin kontrol, 14 mM ve 50 mM konsantrasyonlarında BEAS-2B hücre hattında Anneksin-V analizi ile bulunan apoptotik yüzde oranlarının 12 ve 24 saatlik histogramları

Tablo 3.2. Borik asitin 12 saat uygulanması sonrası A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında Anneksin-V analizinde bulunan verilerin yüzde değerleri

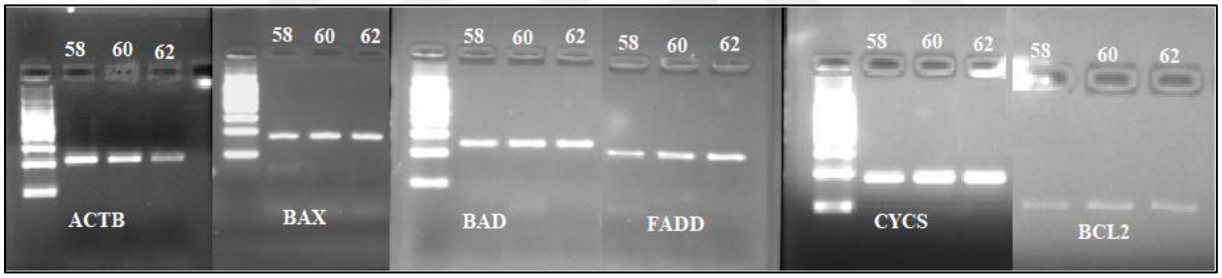
Hücre Hatları	Dozlar	Canlı hücreler (Q1)	Erken apoptotik hücreler (Q2)	Geç apoptotik hücreler (Q3)	Nekrotik hücreler (Q4)
A549	Kontrol	%88,11	%1,49	%7,01	%3,38
	20 mM	%87,46	%5,62	%5,68	%1,24
	50 mM	%87,68	%4,54	%6,89	%0,89
BEAS-2B	Kontrol	%93,48	%2,14	%2,1	%2,28
	14 mM	%90,39	%5,66	%2,98	%0,97
	50 mM	%85,1	%7,71	%5,37	%1,81

Tablo 3.3. Borik asitin 24 saat uygulanması sonrası A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında Anneksin-V analizinde bulunan verilerin yüzde değerleri

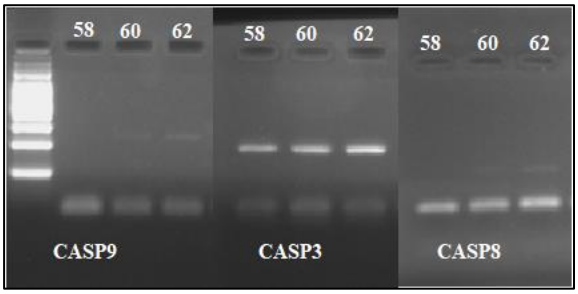
Hücre Hatları	Dozlar	Canlı hücreler (Q1)	Erken apoptotik hücreler (Q2)	Geç apoptotik hücreler (Q3)	Nekrotik hücreler (Q4)
A549	Kontrol	%90,35	%3,5	%4,45	%1,7
	20 mM	%82,5	%6,25	%10	%1,25
	50 mM	%74,75	%10,95	%13,45	%0,85
BEAS-2B	Kontrol	%82,75	%9,06	%6,15	%2,05
	14 mM	%80,41	%12,44	%5,76	%1,39
	50 mM	%67	%25,42	%6,9	%0,68

3.6. Gradiyent PCR Bulguları

ACTB, BAX, BAD, BCL2, CASP3, CAPS8, CASP9, CYCS ve *FADD* genleri için 58-60-62°C sıcaklıklarda gradiyent PCR kuruldu. Gradiyent PCR sonrası ürünler jele yüklenerek bant görüntüleri elde edildi. Gradiyent PCR agaroz jel görüntüsü sonucu tüm genler için çalışma sıcaklığı 60°C karar verildi (Şekil 3.13. ve Şekil 3.14).



Şekil 3.13. *ACTB, BAX, BAD, FADD, CYCS, BCL2* genlerine ait jel görüntüleri



Şekil 3.14. *CASP3, CASP8, CASP9* genlerine ait jel görüntüleri

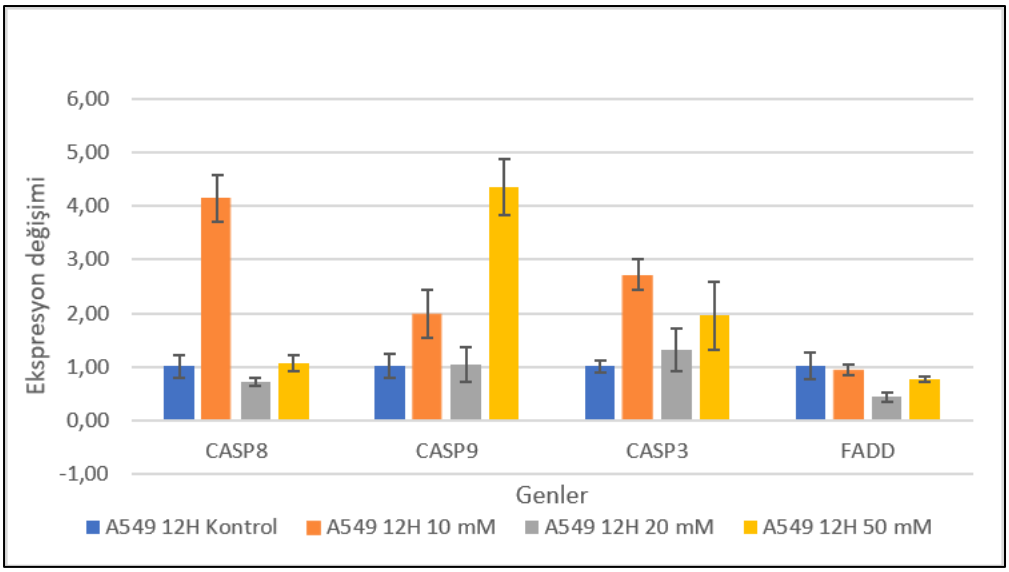
3.7. Real-Time PCR Sonuçları

Borik asitin A549 ve BEAS-2B hücre hatlarında apoptoz yolaklarında rol oynayan bazı genlerin mRNA düzeyindeki ekspresyonuna olan etkisi kantitatif Real-Time PCR yöntemiyle araştırılmıştır. RNA izolasyonu yapılan A549 ve BEAS-2B hücre hatlarının konsantrasyon ve OD değerleri Tablo 3.4'te verilmiştir. *ACTB* referans gen (housekeeping) olarak kullanılmıştır.

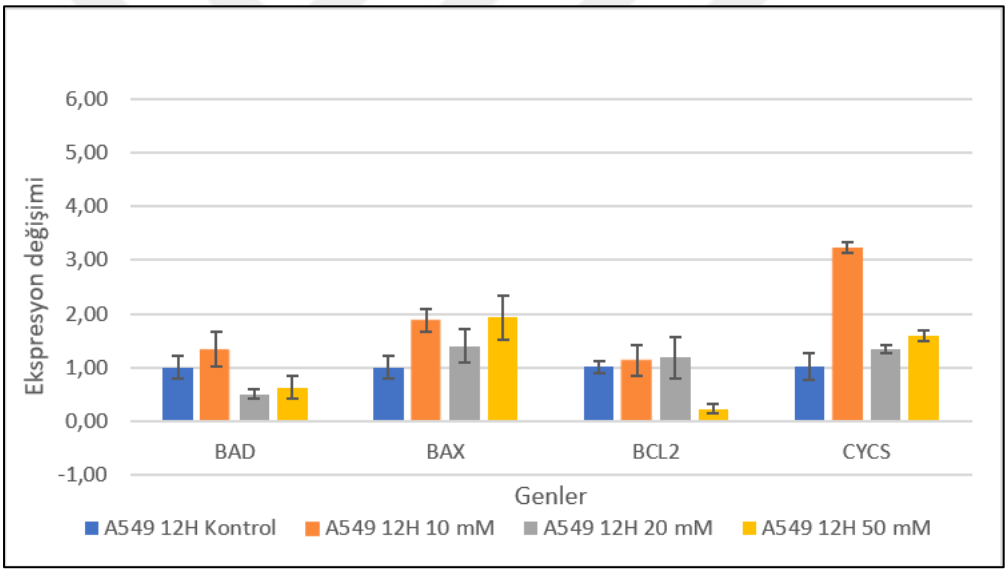
Tablo 3.4. İzole edilen RNA konsantrasyonları ve OD değerleri

	RNA Konsantrasyonu (ng/µl)	**OD 260\280**
A549-12H-10 mM	372	2,12
A549-12H-20 mM	86	2,09
A549-12H-50 mM	119	2,14
A549-12H-Kontrol	312	2,13
A549-24H-10 mM	223	2,12
A549-24H-20 mM	197	2,05
A549-24H-50 mM	151	2,12
A549-24H-Kontrol	456	2,11
BEAS-2B-12H-14 mM	399	2,13
BEAS-2B-12H-50 mM	358	2,14
BEAS-2B-12H-Kontrol	433	2,12
BEAS-2B-24H-14 mM	216	2,04
BEAS-2B-24H-50 mM	312	2,14
BEAS-2B-24H-Kontrol	433	2,13

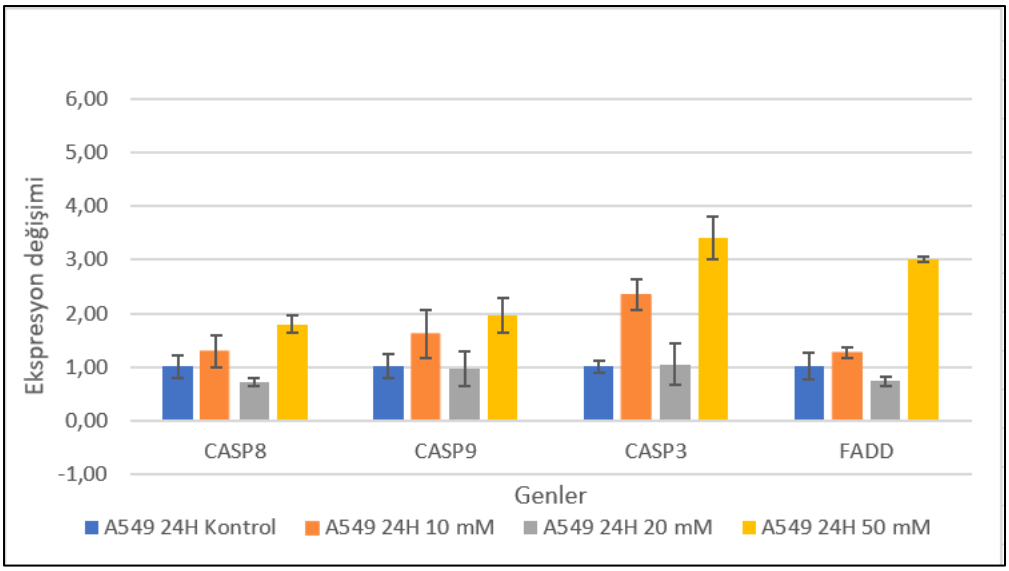
Kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta CT}$) deney grubundaki normalize edilmiş gen ekspresyonlarının, kontrol grubundaki normalize edilmiş gen ekspresyonlarına bölünmesiyle elde edilir. Kat değişimi değerinin istatistiksel analizi sonrası ortaya çıkan değerin 1'den büyük olması o genin ekspresyonundaki artışı, 1'den küçük olması ise ilgili genin ekspresyonundaki azalmayı gösterir.



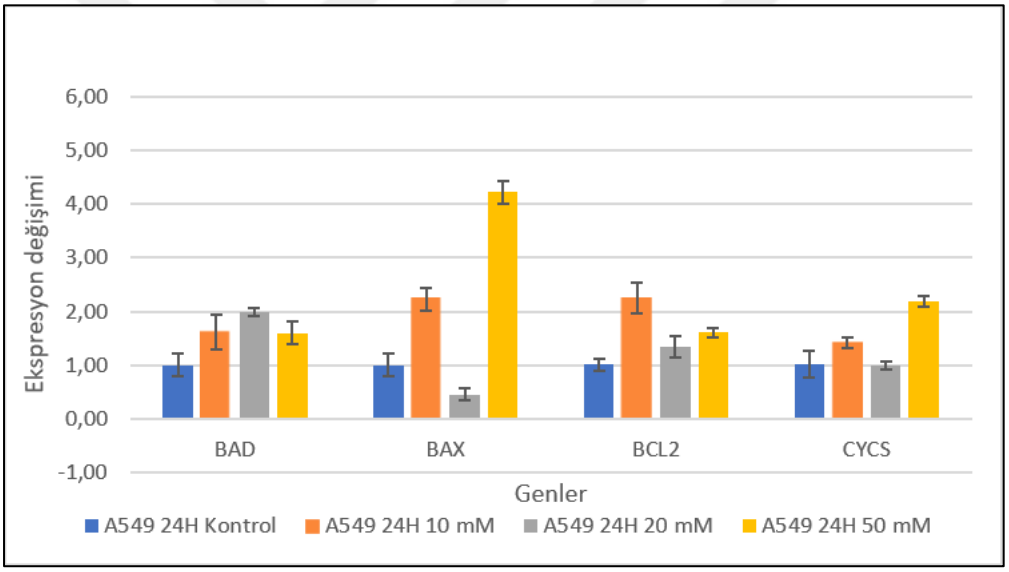
Şekil 3.15. A549 hücre hattında 12 saatlik borik asit muamelesi sonucu *CASP8*, *CASP9*, *CASP3* ve *FADD* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi



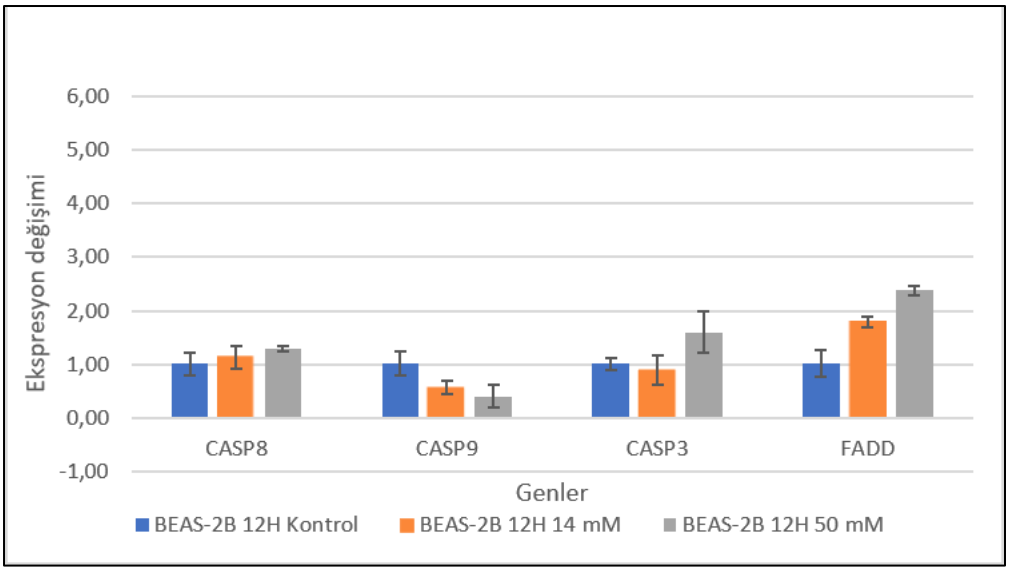
Şekil 3.16. A549 hücre hattında 12 saatlik borik asit muamelesi sonucu *BAD*, *BAX*, *BCL2* ve *CYCS* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi



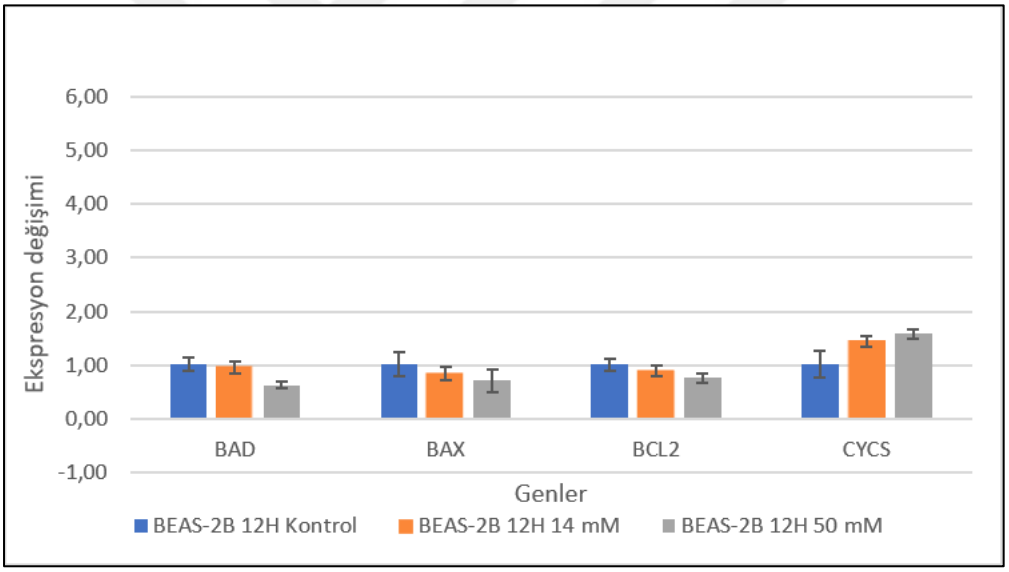
Şekil 3.17. A549 hücre hattında 24 saatlik borik asit muamelesi sonucu *CASP8*, *CASP9*, *CASP3* ve *FADD* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi



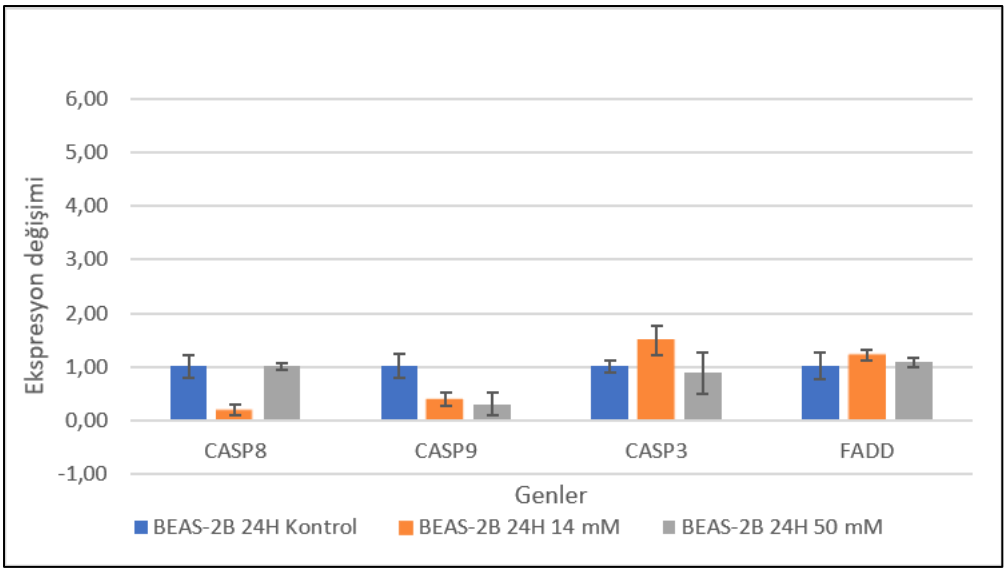
Şekil 3.18. A549 hücre hattında 24 saatlik borik asit muamelesi sonucu *BAD*, *BAX*, *BCL2* ve *CYCS* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi



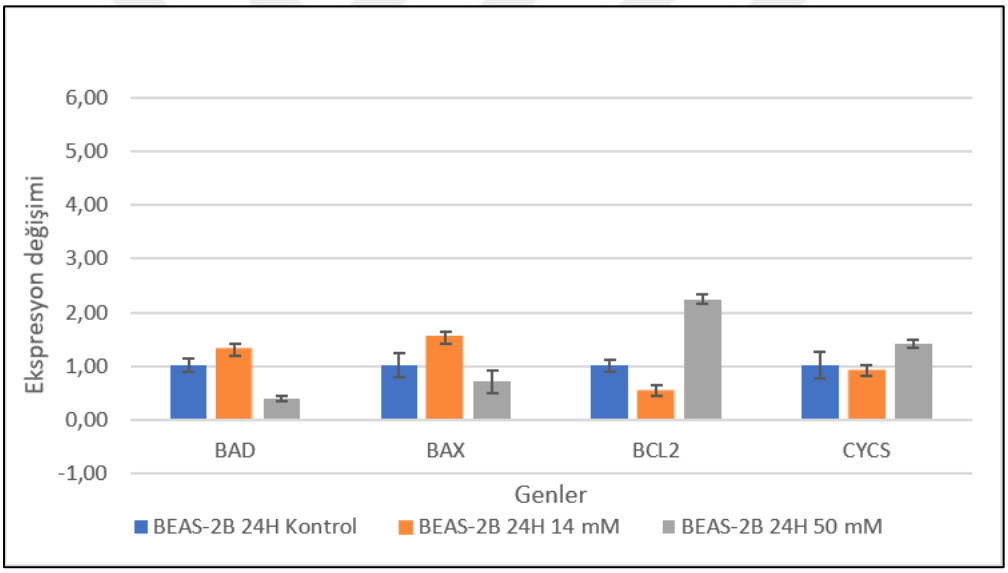
Şekil 3.19. BEAS-2B hücre hattında 12 saatlik borik asit muamelesi sonucu *CASP8*, *CASP9*, *CASP3* ve *FADD* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi



Şekil 3.20. BEAS-2B hücre hattında 12 saatlik borik asit muamelesi sonucu *BAD*, *BAX*, *BCL2* ve *CYCS* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi



Şekil 3.21. BEAS-2B hücre hattında 24 saatlik borik asit muamelesi sonucu *CASP8*, *CASP9*, *CASP3* ve *FADD* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi



Şekil 3.22. BEAS-2B hücre hattında 24 saatlik borik asit muamelesi sonucu *BAD*, *BAX*, *BCL2* ve *CYCS* genlerinin mRNA ifadesindeki kat değişiminin grafiksel gösterimi

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Akciğer kanseri insidans ve mortalite oranları açısından yüksek kanser türleri arasında yer alır. KHDAK, %85'ini oluşturmakta olup dünyada kansere bağlı ölümlerde ilk sırada yer almaktadır.

Kanser hücreleri apoptoza karşı direnç kazandıkları için devamlı çoğalarak tümör oluşumuna neden olurlar. Dolayısıyla bu hücrelerin kontrol altına alınabilmesinde apoptozun indüklenmesini hedefleyen terapötik bir strateji geliştirmek oldukça önemli bir yaklaşımdır (Fernald ve Kurokawa, 2013).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, anti-kanser ajan olarak bor içerikli bileşiklerin kullanımının arttığı bildirilmiştir.

Bor içeren bileşiklerin; NAD-dehidrojenazlar, serin proteazların, mRNA splicing dahil olmak üzere çeşitli enzimatik aktivitelerin inhibisyonuna ayrıca reseptör bağlama taklidi ve apoptozu indüklemesi gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla kanser hücrelerinin fizyolojisine ve proliferasyonuna etki ettiği gösterilmiştir (Scorei ve Popa, 2010).

Literatürde borun, kemik büyümesi ve korunması için gerekli olduğu, yaraların hızlı iyileşmesini sağladığı; magnezyum emilimini artırdığı; CRP ve TNF-α gibi inflamatuar biyomarkerların düzeylerini azalttığı; D vitamini, östrojen ve testosteronun vücutta kullanımını olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir.

İlaveten, bazı antioksidan enzimlerin (katalaz, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz vb.) düzeylerini yükselttiği, pestisite bağlı ağır metal toksisitesi ve oksidatif stres etkilerine karşı koruduğu, yaşlılarda beynin elektriksel etkinliğini, zihinsel verimi ve aktif belleği ilerlettiği, bazı önemli biyomoleküllerin (SAM-e (S-adenozil metiyonin) ve NAD+ (nikotinamid adenin dinükleotid) koenzimi gibi) meydana gelmesini ve aktivitesini etkilediği bildirilmiştir.

Bununla birlikte, prostat, rahim ağzı, akciğer ve non-Hodgkin lenfoma gibi kanser türlerinde engelleyici ve tedavide olumlu yönde etki gösterdiği ve kemoterapötik ilaçların olumsuz etkilerini azaltmaya yardımcı olabilmesi gibi özellikleriyle önemli bir iz mineral olduğu kanıtlamıştır (Pizzorno, 2015).

Yapılan araştırmalar, farklı doğal bileşiklerin ve özütlerin çeşitli mekanizmalar yardımıyla akciğer kanseri hücre çoğalmasını etkili bir şekilde inhibe ettiğini ve apoptozu indükleyen yolakların aktivasyonunu sağladığını göstermektedir (Feng ve ark., 2017; Zhu ve ark., 2018; Lee ve ark., 2019; Xiao ve ark., 2019; Sheng ve ark., 2020; Wang ve ark., 2020; Yang ve ark., 2021).

Yapılan bu çalışmada borik asidin A549 insan akciğer kanser hücre hattı ve BEAS-2B sağlıklı akciğer hücre hattı üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Borik asitin hücre canlılığı üzerine olan etkileri SRB yöntemi ile; apoptotik etkisi Anneksin V analizi ile mRNA düzeyindeki apoptotik genlerin ekspresyon seviyesi ise Real Time PCR yöntemi kullanılarak araştırıldı. Bu çalışmanın amacı; dünyada ve ülkemizde sık görülen, akciğer kanserinde borik asitin etkilerini *in vitro* koşullarda incelemektir.

Çalışmamızda kullanılan doz aralıklarının belirlenmesi için literatür taraması yapılmıştır ve bor ve bileşiklerinin çok farklı doz aralıklarının kullanıldığı görülmüştür.

Prostat kanser hücre hattı üzerinde yapılan araştırmaların birçoğunda borik asidin 0-1000 μM'a kadar olan farklı doz aralıkları (100, 250, 500, 1000 μM) denenmiştir (Barranco ve Eckhert, 2004; Barranco ve Eckhert, 2006; Barranco ve ark., 2007; Barranco ve ark., 2009; McAuley ve ark., 2011). Prostat kanserinde yapılan başka bir çalışmada ise 6,25-10,77-12,5-16,15 mM dozlarında borik asit kullanılmıştır (Hacioglu ve ark., 2020).

Meme kanseri hücreleri ile yapılan bir araştırmada 0,45-2,25-5-11,25-22,5 mM dozları kullanılmıştır (Scorei ve ark., 2008). Meme kanseri hücre hattı üstüne yapılan başka bir araştırmada Kalsiyum Fruktoboratın 10, 50, 100 μM dozları uygulanmıştır (Tepedelen ve ark., 2017). Hem meme hem prostat kanseri hücre hatlarında yapılan başka bir çalışmada ise borik asitin 100, 500 ve 1000 μM dozları çalışılmıştır (Bradke ve ark., 2008).

İnsan melanom hücrelerinde yapılan bir çalışmada 5-12,5-25-50 mM gibi borik asitin yüksek dozları kullanılmıştır (Acerbo ve Miller, 2009).

Yapılan başka bir çalışmada lösemi hücre hattı 100, 250, 500, 1000 μM dozlarında borik asit ile muamele edilmiştir (Canturk ve ark., 2016).

HepG2 insan karaciğer kanser hücre hattı ile çalışan iki yayında bor bileşiklerinin 0,5-1-2-4-8-5-10-15-16-20-25-30-40 mM olmak üzere çok geniş bir doz aralığı uygulanmıştır (Wei ve ark., 2016; Tombuloglu ve ark., 2020).

Akciğer kanserinde, Formaldehit kaynaklı oksitadif strese karşı borik asitin koruyucu ve iyileştirici etkisinin araştırıldığı bir çalışmada borik asitin 2,5, 5 ve 10 mM dozları kullanılmıştır (Arslan-Acaroz ve Bayşu-Sozbilir, 2020).

SRB canlılık analizi verilerine göre, A549 hücre hattında 48 ve 72 saat borik asit muamelesi sonucu 10-15-20-25-35-50 mM dozlarında kontrol grubuna oranla hücre canlılığında azalmalar görüldü. Aynı şekilde BEAS-2B hücre hattında da 48 ve 72 saat borik asit uygulanması sonucu 10-15-20-25-35 ve 50 mM dozlarında kontrole kıyasla hücre canlılığında anlamlı azalmalar belirlendi.

Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde, bor bileşiklerinin farklı hücre hatlarında farklı IC_{50} değerleri ile sitotoksik etkiye neden olduğu belirlenmiştir (Hacioglu ve ark., 2020; Tombuloglu ve ark., 2020; Aydin ve ark., 2021).

Değerlendirmeler sonucunda, borik asit uygulanan hücrelerin proliferasyonunda önemli bir azalma olduğu gösterilmiştir. Bulgularımız daha önce yapılmış çalışmaların bulgularıyla uyumludur.

Barranco ve ark. yaptıkları çalışmada borik asitin insan prostat kanseri hücre çoğalması üzerine olan inhibisyonunu araştırmışlardır. Hücre hatları 0-100-250-500-1000 µM konsantrasyonlarında borik asit ile muamele edildikten sonra hücre canlılığı, proliferasyon ve apoptoz analizleriyle değerlendirilmiştir. Borik asit uygulaması sonucunda DU-145, LNCaP ve PC-3 kanser hücre hatlarında doza bağlı olarak hücre proliferasyonunun azaldığı gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre DU-145 ve LNCaP hücre hatlarının borik aside daha duyarlı olduğu görülmüştür. Apoptoz tayininde Kaspaz-3 analizini Western Blot ile gerçekleştirmişlerdir ve borik asit ile muamele edilen hücrelerde Kaspaz-3 ekspresyonu olmadığı gösterilmiştir. Bundan yola çıkarak borik asitin apoptozu uyarması yerine proliferatif inhibisyonla büyümeyi azalttığı şeklinde yorumda bulunmuşlardır (Barranco ve Eckhert, 2004).

Aynı ekibin yaptığı başka bir çalışmada borik asidin insan prostat kanseri hücre hatları olan DU-145, LNCaP, PC-3'te hücresel değişikliklerini araştırmışlardır. Hücrelere 0, 250 ve 1000 µM borik asit içeren medyum eklenip 8 gün boyunca kültüre edilmiştir. Hücre hatlarında proliferasyon, hücre döngüsü, migrasyon ve invazyon araştırılmıştır. Borik asitin apoptoza neden olmadan proliferasyonu inhibe etme yeteneğini göstermişlerdir. DU-145 hücrelerinin göç etme kapasitelerinin 250 ve 1000 µM konsantrasyonlarında sırasıyla %28 ve %89 oranında azalttığını ve hücre döngüsü ilerlemesinde önemli roller oynayan beş ana siklin proteininin

(siklin A, B1, C, D1, E) ekspresyonunu düşürdüğünü bildirmişlerdir (Barranco ve Eckhert, 2006).

Barranco ve ark.'nın DU-145 ile yaptıkları çalışmada 0-1000 μM aralığında farklı dozlarda 8 günlük borik asit ve kombinasyonlarıyla muamele yapılmıştır. 15 μM Selenomethionine (SeM) ve 250 μM borik asitin birlikte uygulandığı hücreler tek başına borik asit uygulanan hücrelere göre canlılığı daha azalmıştır. Sadece borik asit ile muamele edilen hücrelerde Western Blot yöntemi ile bakılan Bcl-2 seviyesi doza bağlı olarak protein seviyesinde azaldığı görülmüştür. Bu sonuç borik asitin Bcl-2'yi inhibe ederek radyasyon tedavisine duyarlılaştırıcı olarak işlev gördüğünü göstermiştir (Barranco ve ark., 2007).

Barranco ve ark.'nın yaptığı başka bir çalışmada ise 100-1000 μM arasındaki farklı borik asit dozları kullanılarak prostat kanser hücre hattındaki proliferasyon incelenmiştir. Çıkan sonuçlara göre hücre proliferasyonu 100 μM 'de %30, 250 μM 'de %60 ve 1.000 μM'de %97 oranında inhibe edildiği bildirilmiştir (Barranco ve ark., 2009).

Benzer başka çalışmada düşük borik asit konsantrasyonunun prostat kanseri hücrelerinde apoptoza neden olmadan hücre canlılığını inhibe ettiği bildirilmiştir (Kobylewski ve ark., 2017).

Gallardo-Williams ve arkadaşları prostat kanser modeli oluşturulan fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, borik asit muamelesi sonucu tümör boyutlarının küçüldüğünü gözlemlemişlerdir. Bunun yanı sıra serumdaki PSA seviyesinin ve tümör dokularındaki IGF-1 ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir (Gallardo-Williams ve ark., 2004).

DU-145 hücre hattıyla yapılan başka bir araştırmada borik asitin 6,25-10,77-12,5-16,15 mM farklı dozları kullanılmıştır. Hücre canlılığı MTT analizi ile değerlendirilmiştir ve 24 saatlik 6,25 mM doz muamelesi sonucu hücre canlılığı %61 iken 12,5 mM dozda %45,8 olduğu gösterilmiştir. IC_{50} ve IC_{75} değerleri sırasıyla 10,77 ve 16,15 mM olarak belirlenmiştir 24 saatlik 6,25, 10,77 ve 16,15 mM dozlarındaki borik asit tedavisinin apoptotik yolakları indükleyerek CYCS ve CASP3 seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını spektrofotometrik yöntemle bulmuşlardır. Borik asidin konsantrasyona bağlı olarak oksidatif strese, hücre büyümesinin inhibisyonuna, apoptoza ve morfolojik değişikliklere neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, borik asit konsantrasyonları ile yapılan tedaviler, hücrelerdeki antioksidan seviyelerini azaltmıştır. Antioksidan olarak bilinen borik asidin yüksek dozlarda oksidan gibi davranarak hücre çoğalmasını engelleyebileceğini ortaya koymuşlardır (Hacioglu ve ark., 2020).

Bradke ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 1 mM dozundaki bor bileşiklerinin meme ve prostat kanser hücre hatlarına 24 saatlik muamelesinden sonra hücre göçünü ve canlılığını inhibe etmediği; ancak 8 günlük muamele sonrası hücre morfolojisinde anormalliklere ve hücre canlılığında önemli bir düşüşe yol açtığı gösterilmiştir (Bradke ve ark., 2008; McAuley ve ark., 2011).

MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında borik asit ve kalsiyum fruktoboratın etkisini inceleyen bir çalışmada 0,45 ve 22,5 mM aralığındaki farklı dozların hücre canlılığına etkisi MTT yöntemi ile analiz edilmiştir. Hem borik asitin hemde kalsiyum fruktoboratın doza bağlı bir şekilde sitotoksisiteyi indüklediği gözlenmiştir. Kanser tedavisinde kullanılan bazı sitotoksik ilaçların, apoptozun temel unsurlarını ve hücresel stres yanıtını aktive ederek hücre ölümüne aracılık ettiği düşünülmektedir. Bundan yola çıkarak TUNEL yöntemiyle borik asitin ve kalsiyum fruktoboratın apoptotik etkisini incelemişlerdir. Borik asitin çok az apoptotik etkisi gözlenirken, kalsiyum fruktoborat ile muamele edilen hücrelerin apoptoza uğradığı görülmüştür. Bcl-2 apoptotik etkisi Western Blot yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Kalsiyum fruktoborat'ın 2,25 mM dozundan daha yüksek konsantrasyonlarında Bcl-2 protein seviyesi aşağı regüle olurken, borik asitin Bcl-2 ekspresyonuna hiçbir etkisi olmadığı gözlenmiştir. Yine aynı şekilde borik asit uygulanan hücrelerde sitokrom c'nin sitozolik seviyesinin değişmediği bildirilmiştir. Kaspaz-3 aktivasyonu bakıldığında ise her iki maddenin de kontrollere kıyasla kaspaz-3 aktivitesini arttırdığı görülmüştür (Scorei ve ark., 2008).

Aynı hücre hattında yapılan başka bir çalışmada MDA-MB-231'e 24, 48 ve 72 saatlik sürelerde 1-500 µM aralığındaki farklı dozlarda kalsiyum fruktoborat muamelesi yapılmıştır. Hücre canlılığı, özellikle 50 µM'de önemli ölçüde azalmıştır. Western Blot yöntemi ile analiz edilen p53 ve Kaspaz-9'un protein seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. İmmunoreaktivite sonuçlarına göre kalsiyum fruktoborat uygulanan tüm gruplarda kaspaz-3'ün immünoreaktivitesi artmasına rağmen, sadece 50 µM grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (Tepedelen ve ark., 2017).

İnsan melanoma hücre hattı olan SK-MEL28'e 0-5-12,5-25-50 mM dozlarında borik asit uygulanarak tripan mavisi yöntemi ile hücre canlılığı analizleri yapılmıştır. Analizler sonucunda doza bağlı olarak hücre canlılığının azaldığını göstermişlerdir (Acerbo ve Miller, 2009).

Başka bir çalışmada bor bileşiği ve bir borik asit tuzu olan boraksın karaciğer kanser hücre hattı olan HepG2 üzerindeki hücre canlılığı ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Boraksın 0, 0,5, 1, 2, 4, 8 ve 16 mM dozları 6, 12, 24, 48 ve 72 saatlerinde uygulanmıştır. Hücre canlılığına MTT yöntemi ile apoptotik etkilerine hem flow sitometri hem de mRNA seviyesinde bakılmıştır. MTT sonuçlarına göre artan boraks konsantrasyonlarının hücre büyümesini güçlü bir şekilde engelleyebileceğini ortaya koymuşlardır. Anneksin V analizlerinde HepG2 hücrelerinde boraksın konsantrasyona bağlı bir şekilde apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Boraksın 4 mM dozunun 6, 12 ve 24 saat olarak uygulandığı hücrelerde *p53, Bax, Bcl-2* genlerinin ekspresyonuna mRNA ve protein seviyesinde analiz edilmiştir. Kontrol gruplarına göre tümör baskılayıcı *p53* geninin ve pro-apoptotik gen olan *Bax*'ı arttığını; anti-apoptotik gen olan *Bcl-2*'nin ise ekspresyon seviyesinin azaldığını bulmuşlardır (Wei ve ark., 2016).

HepG2 karaciğer kanser ve THLE2 normal karaciğer hücre hatlarında yapılan başka bir çalışmada 6,25-12,5-25-50-100-200 µg/mL konsantrasyonlarında borik asit uygulanmış olup hücre canlılığı ve mRNA seviyesinde apoptoz analizleri gerçekleştirilmiştir. MTT analizleri sonucuna göre bu dozlardaki borik asitin hem malign hem de malign olmayan hücreler üzerinde potansiyel sitotoksik etkiye sahip olduğunu gösterilmiştir. mRNA seviyesinde 64,27 µg/mL dozunda 24 saatlik borik asit uygulanan HepG2 hücreleri çalışılmış olup *p53*'ün ekspresyon seviyesi yukarı regüle olurken, *Bcl-2* geni önemli ölçüde aşağı regüle edilmiştir (El-Hefny ve ark., 2020).

Karaciğer kanser hattı üzerine yapılan başka bir çalışmada borik asitin 0,5-1-5-10-15-20-25-30-40 mM farklı dozları kullanılmıştır. 24 saatlik muamele sonucunda hücre canlılığı XTT analizi ile çalışılmış olup doza bağlı olarak hücre büyümesinin inhibe olduğu gözlemlenmiştir. IC_{50} değeri ise 24 mM olarak belirlenmiştir (Tombuloglu ve ark., 2020).

Yapılan başka bir çalışmada bor trioksitin tek başına ve borik asit ile kolon kanseri hücreleri (DLD-1) üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bor trioksit (B_2O_3) borik asidin dehidrasyonundan elde edilir ve suda orta derecede çözünür, renksiz, yarı saydam, kristalli bir bileşiktir. DLD-1 hücrelerine 24 saat 2.5-5-10-20 µg/mL dozlarında bor trioksit tek başına ve borik asit ile kombine edilerek uygulanmıştır. Hücre canlılığı WST analizi ile gerçekleştirilmiş olup bor oksit bileşiklerinin, kolon kanser hücre hattı için oldukça sitotoksik olduğunu göstermişlerdir. Hücre proliferasyon deneyleri ise xCELLigence sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir genotoksik etki gözlemlenmemiş olup, bor oksit bileşikleri kolon kanser hücre hattı için anti-proliferatif etkiler göstermiştir (Albuz ve ark., 2019).

Yapılan bir çalışmada insan lösemi hücre hattı olan HL-60 ve sağlıklı insan lenfositleri üzerinde 100, 250, 500, 1000 μM dozlarında borik asit muamelesi ile sitotoksik ve apoptotik etkiler incelenmiştir. MTT analizi sonuçlarında her iki hücre hattında da hücrelerin mitokondriyal aktivitesinde azalma olduğu gözlenmiştir ancak borik asitin HL-60 hücreleri üzerinde daha fazla sitotoksisiteye sahip olduğu bildirilmiştir. 1000 μM dozundaki borik asitin, HL-60 hücreleri üzerinde insan lenfositlerine göre dört kat daha fazla apoptotik etkiye sahip olduğu Akridin orange boyama yöntemi bulunmuştur (Canturk ve ark., 2016).

Glioblastoma hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada 2,5-25-50 mM dozlardaki bor uygulamasının sitotoksik etkisi araştırılmıştır. MTT analizinde 48 saaatlik inkübasyon sonucunda doza bağlı olarak hücre canlılığının azaldığı görülmüştür ve borun sitotoksik etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Çalışma sonucunda borun glioblastoma hücrelerindeki IC_{50} değeri 17 mM olarak belirlemişlerdir (Aydin ve ark., 2021).

MCF-7 meme kanseri hücre hattında yapılan bir çalışmada borik asit eklenmiş toprakta yetişen *Camellia sinensis L.* ekstratının hücreler üzerindeki proliferasyon ve apoptotik etkileri incelenmiştir. Sodyum tetraborat tamponu içinde 100-300-500 mg/m^2 konsantrasyonlarında borik asit toprağa tek doz olarak uygulanmış ve bu toprakta yetişen bitkinin yaprağının 2.3, 2.6 ve 3 mg/mL dozlarındaki ekstratı hücre hatlarına 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla borik asitli toprakta yetiştirilen *C. sinensis*'ten elde edilen yaprak ekstreleri, MCF-7 hücreleri üzerinde daha fazla anti-proliferatif, apoptotik ve anti-oksidatif etkilere sahip olduğu bulunmuştur (Sezekler ve ark., 2020).

Çalışmamızda, A549 hattında 12 saatlik 10 mM borik asit uygulaması sonucunda gen ekspresyonları kontrol grubuna göre *CASP8, CASP9, CASP3, BAX, BAD, BCL2* ve *CYCS* genlerinde artış olmuştur. *FADD* geni ise kontrol grubuna göre 0,05 oranında azalmıştır. 24 saatlik uygulamasında ise tüm genler kontrol grubuna göre ekspresyon seviyeleri artmıştır.

A549 hattında 12 saatlik 20 mM borik asit uygulaması sonucunda gen ekspresyonları kontrol grubuna göre *CASP3, BAX, BCL2* ve *CYCS* genlerinde artış olmuştur. *FADD, CASP8, CASP9* ve *BAD* genleri ise kontrol grubuna göre azalmıştır. 24 saatlik uygulamasında kontrol grubuna göre *CASP9, CASP3, CYCS* genlerinde ekspresyon seviyeleri değişmemiş olup *BCL2* ve *BAD* genlerinde artış; *CASP8, FADD* ve *BAX* genlerinde ise ekspresyon seviyeleri azalmıştır.

A549 hattında 12 saatlik 50 mM borik asit uygulaması sonucunda gen ekspresyonları kontrol grubuna göre *CASP9, CASP3, BAX, CASP8* ve *CYCS* genlerinde artış olmuştur. *FADD, BCL2* ve *BAD* genleri ise kontrol grubuna göre azalmıştır. 24 saatlik uygulamasında ise tüm genler kontrol grubuna göre ekspresyon seviyeleri artmıştır.

Apoptozun başlatılıp başlatılmayacağını pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinler arasındaki oran belirlemektedir. Hücrelerin apoptoza gitmesi için BAX düzeyinin BCL2'den fazla olması gerekir. Çalışmamızda 12 saatlik 50 mM borik asit muamelesi sonucu A549 hücre hattında *BAX* geni ekspresyonu kontrole göre artmışken; *BCL2* gen ifadesi kontrol grubuna göre azalmıştır. Normalde hücrelerde BAX sitozolde bulunur. Apoptotik sinyaller ile sitozolik BAX mitokondriye transloke olur. Ca^{+2}-bağımlı proteolitik bir enzim olan calpain aracılığıyla Sitokrom c salınımına yol açar.

Apoptoz indüksiyonu için temel olay, zarlar arası protein olan sitokrom c'nin sitozole salınmasıdır. Sitokrom c, apoptozomların oluşumunda rol oynar ve sitozoldeki kaspazları aktive eder (Han ve ark., 2020). 12 saatlik tüm dozlarda *CYCS* gen ifadesinin artışının saptanması hücrenin iç yolakta apoptoza gittiğini göstermektedir.

Verilere göre borik asitin 12 saatlik tüm dozlarında, mitokondriyal potansiyeli değiştirerek klasik sitokrom c ve kaspaz-3 yoluyla mitokondriyal apoptotik yolların aktivasyonuna yol açtığı gözlemlenmiştir (Shi ve ark., 2016).

Mitokondriden salınan CYCS, Apaf-1 ile apoptozom oluşturur. Apoptozom, prokaspaz-9'u keserek aktif kaspaz-9'u meydana getirir. Deneylerimizde 24 saat 20 mM dozu hariç diğer tüm saat ve doz muamelesinde *CYCS* ve *CASP9* genlerinin ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre artmış olarak bulundu. Bu sonuç ile borik asitin hücreleri iç yolak aracılığıyla apoptoza indüklediği gösterilmiştir.

Apoptozun dış yolağında reseptöre bağlanan FADD adaptör proteini, ölüm efektör alanının dimerizasyonu yoluyla prokaspaz-8 ile birleşir. Bu noktada, prokaspaz-8'in oto-katalitik aktivasyonu ile sonuçlanan bir ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşur. Bu bağlanma prokaspaz-8 aktif kaspaz-8'e dönüşür ve kaspaz kaskadı aktivasyonu başlatılır. Aktif kaspaz-8 kaspaz-3'ü direkt veya iç yolakta kaspaz-9'un aktivasyonundan sonra aktif hale getirir. Çalışmamızda 10 ve 50 mM borik asit dozlarının 24 saatlik muamelesinde *FADD, CASP8, CASP3* ve *CASP9* genlerinin ekspresyon seviyeleri kontrol grubuna göre arttığı bulunmuştur. Bu bulgu, her iki yolaktan da apoptozun indüklenebileceğini göstermektedir.

BCL2 ailesinin pro-apoptotik üyesi olan *BAD* geni fosforilasyon-defosforilasyon yolu aracılığıyla düzenlenir. Normal şartlarda BAD, serin-treonin kinaz Akt/PKB sinyal iletim yolu ile fosforile halindedir. Apoptotik sinyal ile *BAD* defosforile olur. Defosforile BAD anti-apoptotik BCL2 proteinlerine bağlanır ve bu proteinleri nötralize ederek apoptozu uyarır (Kartlaşmış ve ark., 2016). Ekspresyon çalışmaları sonucunda 12 saatlik 10 mM doz borik asit muamelesinde *BAD* geninin ifadesi kontrol grubuna göre artmış olarak bulundu. 24 saatlik tüm doz uygulama sonucunda ise *BAD* geninin ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre arttığı gözlendi. Bu sonuç ile hücrelerde apoptozun iç yolakta aktive olabileceği gösterilmiştir.

Taranan literatür verileri ve çalışmamızdan elde edilen bulgular doğrultusunda, çeşitli borik asit konsantrasyonlarının A549 akciğer kanseri hücre hattında apoptotik ve anti-proliferatif etkiye sahip olduğu tespit edildi. Buna karşılık akciğer kanserinin oluşum mekanizmasıyla ilgili pek çok bilinmeyenler vardır. Daha sonraki yapılması düşünülen araştırmalarda, *in vivo* veya *in vitro* koşullarda, borik asitin akciğer kanseri üzerine etkisinin farklı sinyal yolakları ve mekanizmalar ile daha ayrıntılı şekilde incelenmesi gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

(2014). "Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma." *Nature*, 511(7511), 543-550.

ATCC, (2021). American Type Culture Collection, Erişim adresi https://www.atcc.org/products/ccl-185

ATCC (2021). American Type Culture Collection, Erişim adresi https://www.atcc.org/products/crl-9609

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

Adams, J. M. ve Cory, S. (2007). "Bcl-2-regulated apoptosis, mechanism and therapeutic potential." *Curr Opin Immunol*, 19(5), 488-496.

Adderley, H., Blackhall, F. H. ve Lindsay, C. R. (2019). "KRAS-mutant non-small cell lung cancer, Converging small molecules and immune checkpoint inhibition." *EBioMedicine*, 41, 711-716.

Adrain, C. ve Martin, S. J. (2001). "The mitochondrial apoptosome, a killer unleashed by the cytochrome seas." *Trends Biochem Sci*, 26(6), 390-397.

Adriztina, I., Adenin, L. I. ve Lubis, Y. M. (2018). "Efficacy of Boric Acid as a Treatment of Choice for Chronic Suppurative Otitis Media and Its Ototoxicity." *Korean J Fam Med*, 39(1), 2-9.

Akhtar, N. ve Bansal, J. G. (2017). "Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker." *Curr Probl Cancer*, 41(5), 328-339.

Albuz, Ö., Dülger, D., Tunali, B., Aydin, F., Yalçin, S. ve Türk, M. (2019). "Effects of B2O3 (boron trioxide) on colon cancer cells, our first-step experience and in vitro results." *Turk J Biol*, 43(3), 209-223.

Arbour, K. C., Jordan, E., Kim, H. R., Dienstag, J., Yu, H. A., Sanchez-Vega, F., ve ark. (2018). "Effects of Co-occurring Genomic Alterations on Outcomes in Patients with KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer." *Clin Cancer Res*, 24(2), 334-340.

Argüder, E. (2016). "Pasif İçicilik." *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*, 4(1), 56-68.

Arslan-Acaroz, D. ve Bayşu-Sozbilir, N. (2020). "Ameliorative effect of boric acid against formaldehyde-induced oxidative stress in A549 cell lines." *Environ Sci Pollut Res Int*, 27(4), 4067-4074.

Ashrafizadeh, M., Najafi, M., Makvandi, P., Zarrabi, A., Farkhondeh, T. ve Samarghandian, S. (2020). "Versatile role of curcumin and its derivatives in lung cancer therapy." *J Cell Physiol*, 235(12), 9241-9268.

Aydin, H. E., Gunduz, M. K., Kizmazoglu, C., Kandemir, T. ve Arslantas, A. (2021). "Cytotoxic Effect of Boron Application on Glioblastoma Cells." *Turk Neurosurg*, 31(2), 206-210.

Ballester, B., Milara, J. ve Cortijo, J. (2019). "Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lung Cancer, Mechanisms and Molecular Targets." *Int J Mol Sci*, 20(3).

Barallon, R., Bauer, S. R., Butler, J., Capes-Davis, A., Dirks, W. G., Elmore, E., ve ark. (2010). "Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues." *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 46(9), 727-732.

Barranco, W. T. ve Eckhert, C. D. (2004). "Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation." *Cancer Lett*, 216(1), 21-29.

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

Barranco, W. T., Hudak, P. F. ve Eckhert, C. D. (2007). "Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States)." *Cancer Causes Control,* 18(1), 71-77.

Barranco, W. T., Kim, D. H., Stella, S. L., Jr. ve Eckhert, C. D. (2009). "Boric acid inhibits stored Ca2+ release in DU-145 prostate cancer cells." *Cell Biol Toxicol,* 25(4), 309-320.

Barta, J. A., Powell, C. A. ve Wisnivesky, J. P. (2019). "Global Epidemiology of Lung Cancer." *Ann Glob Health,* 85(1).

Barth, R. F. (2009). "Boron neutron capture therapy at the crossroads, challenges and opportunities." *Appl Radiat Isot,* 67(7-8 Suppl), S3-6.

Barth, R. F., Soloway, A. H., Goodman, J. H., Gahbauer, R. A., Gupta, N., Blue, T. E., ve ark. (1999). "Boron neutron capture therapy of brain tumors, an emerging therapeutic modality." *Neurosurgery,* 44(3), 433-450; discussion 450-431.

Baykara, O. (2015). Current Therapies and Latest Developments in Cancer Treatment. *Horizons in Cancer Research,* 57**,** 105-156.

Bergethon, K., Shaw, A. T., Ou, S. H., Katayama, R., Lovly, C. M., McDonald, N. T., ve ark. (2012). "ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers." *J Clin Oncol,* 30(8), 863-870.

Bhami, L. C. ve Das, S. S. (2015). "Boric acid ovicidal trap for the management of Aedes species." *J Vector Borne Dis,* 52(2), 147-152.

Bharatham, N., Chi, S. W. ve Yoon, H. S. (2011). "Molecular basis of Bcl-X(L)-p53 interaction, insights from molecular dynamics simulations." *PLoS One,* 6(10), e26014.

Boolell, V., Alamgeer, M., Watkins, D. N. ve Ganju, V. (2015). "The Evolution of Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer." *Cancers (Basel),* 7(3), 1815-1846.

Boraldi, F., Lofaro, F. D. ve Quaglino, D. (2021). "Apoptosis in the Extraosseous Calcification Process." *Cells,* 10(1).

Boslett, B., Nag, S. ve Resnick, A. (2014). "Detection and antibiotic treatment of Mycoplasma arginini contamination in a mouse epithelial cell line restore normal cell physiology." *Biomed Res Int,* 2014, 532105.

Bradke, T. M., Hall, C., Carper, S. W. ve Plopper, G. E. (2008). "Phenylboronic acid selectively inhibits human prostate and breast cancer cell migration and decreases viability." *Cell Adh Migr,* 2(3), 153-160.

Brennan, P., Hainaut, P. ve Boffetta, P. (2011). "Genetics of lung-cancer susceptibility." *Lancet Oncol,* 12(4), 399-408.

Brenner, D. ve Mak, T. W. (2009). "Mitochondrial cell death effectors." *Curr Opin Cell Biol,* 21(6), 871-877.

Brenner, D. R., McLaughlin, J. R. ve Hung, R. J. (2011). "Previous lung diseases and lung cancer risk, a systematic review and meta-analysis." *PLoS One,* 6(3), e17479.

Bronte, G., Ulivi, P., Verlicchi, A., Cravero, P., Delmonte, A. ve Crinò, L. (2019). "Targeting RET-rearranged non-small-cell lung cancer, future prospects." *Lung Cancer (Auckl),* 10, 27-36.

Canturk, Z., Tunali, Y., Korkmaz, S. ve Gulbaş, Z. (2016). "Cytotoxic and apoptotic effects of boron compounds on leukemia cell line." *Cytotechnology,* 68(1), 87-93.

Cardarella, S., Ogino, A., Nishino, M., Butaney, M., Shen, J., Lydon, C., ve ark. (2013). "Clinical, pathologic, and biologic features associated with BRAF mutations in non-small cell lung cancer." *Clin Cancer Res,* 19(16), 4532-4540.

Chang, L., Graham, P. H., Hao, J., Bucci, J., Cozzi, P. J., Kearsley, J. H., ve ark. (2014). "Emerging roles of radioresistance in prostate cancer metastasis and radiation therapy." *Cancer Metastasis Rev,* 33(2-3), 469-496.

Chatterjee, R. (2007). "Cell biology. Cases of mistaken identity." *Science,* 315(5814), 928-931.

Chin, L. P., Soo, R. A., Soong, R. ve Ou, S. H. (2012). "Targeting ROS1 with anaplastic lymphoma kinase inhibitors, a promising therapeutic strategy for a newly defined molecular subset of non-small-cell lung cancer." *J Thorac Oncol,* 7(11), 1625-1630.

Coderre, J. A., Turcotte, J. C., Riley, K. J., Binns, P. J., Harling, O. K. ve Kiger, W. S., 3rd (2003). "Boron neutron capture therapy, cellular targeting of high linear energy transfer radiation." *Technol Cancer Res Treat,* 2(5), 355-375.

Cooper, W. A., Lam, D. C., O'Toole, S. A. ve Minna, J. D. (2013). "Molecular biology of lung cancer." *J Thorac Dis,* Suppl 5, 479-490.

Creative Biolabs, (2021). Extrinsic Apoptosis Pathway. Erişim adresi https,//www.creative-diagnostics.com/extrinsic-apoptosis-pathway.htm

Creative Biolabs, (2021). Intrinsic Apoptosis Pathway Erişim adresi https,//www.creative-diagnostics.com/intrinsic-apoptosis-pathway.htm

Creative Biolabs, (2021). Non-small Cell Lung Cancer Overview-Signaling Pathway. Diagnosis. Targeted Therapy. Erişim adresi https,//www.creativebiolabs.net/non-small-cell-lung-cancer-overview-signaling-pathway-diagnosis-targeted-therapy.htm

Creative Biolabs, (2021). p53 Signaling Pathway. Erişim adresi https,//www.creativebiolabs.net/p53-signaling-pathway.htm

Creative Biolabs, (2021). ROS1 Signaling Pathway. Erişim adresi https,//www.creative-diagnostics.com/ros1-signaling-pathway.htm

Cui, Y., Winton, M. I., Zhang, Z. F., Rainey, C., Marshall, J., De Kernion, J. B., ve ark. (2004). "Dietary boron intake and prostate cancer risk." *Oncol Rep,* 11(4), 887-892.

Danial, N. N. ve Korsmeyer, S. J. (2004). "Cell death, critical control points." *Cell,* 116(2), 205-219.

Dasgupta, A., Nomura, M., Shuck, R. ve Yustein, J. (2016). "Cancer's Achilles' Heel, Apoptosis and Necroptosis to the Rescue." *Int J Mol Sci,* 18(1).

de Groot, P. M., Wu, C. C., Carter, B. W. ve Munden, R. F. (2018). "The epidemiology of lung cancer." *Transl Lung Cancer Res,* 7(3), 220-233.

Deben, C., Van den Bossche, J., Van Der Steen, N., Lardon, F., Wouters, A., de Beeck, K. O., ve ark. (2017). "Deep sequencing of the TP53 gene reveals a potential risk allele for non-small cell lung cancer and supports the negative prognostic value of TP53 variants." *Tumour Biol,* 39(2), 1010428317694327.

Dela Cruz, C. S., Tanoue, L. T. ve Matthay, R. A. (2011). "Lung cancer, epidemiology, etiology, and prevention." *Clin Chest Med,* 32(4), 605-644.

Depowski, P. L., Rosenthal, S. I. ve Ross, J. S. (2001). "Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer." *Mod Pathol,* 14(7), 672-676.

Detterbeck FC, Decker RH, Tanoue L, Lilenbaum RC. (2015). Non-small cell lung cancer. DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA. Cancer, Principles and Practice of Oncology. (10th Edition). Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 41, 495-535.

Diamantis, A., Magiorkinis, E., Sakorafas, G. H. ve Androutsos, G. (2008). "A brief history of apoptosis, from ancient to modern times." *Onkologie,* 31(12), 702-706.

Dieter, M. P. (1994). "Toxicity and carcinogenicity studies of boric acid in male and female B6C3F1 mice." *Environ Health Perspect,* 102 Suppl 7(Suppl 7), 93-97.

Diniz, G., Ünlü, İ. ve Kömürcüoğlu, B. (2017). "Histopathological and molecular features of lung cancer." *Tepecik Eğit. ve Araşt. Hast. Dergisi,* 27(2), 77-87.

Doebele, R. C., Davis, L. E., Vaishnavi, A., Le, A. T., Estrada-Bernal, A., Keysar, S., ve ark. (2015). "An Oncogenic NTRK Fusion in a Patient with Soft-Tissue Sarcoma with Response to the Tropomyosin-Related Kinase Inhibitor LOXO-101." *Cancer Discov,* 5(10), 1049-1057.

Drilon, A., Cappuzzo, F., Ou, S. I. ve Camidge, D. R. (2017). "Targeting MET in Lung Cancer, Will Expectations Finally Be MET?" *J Thorac Oncol,* 12(1), 15-26.

Dubey, A. K., Gupta, U. ve Jain, S. (2016). "Epidemiology of lung cancer and approaches for its prediction, a systematic review and analysis." *Chin J Cancer,* 35(1), 71.

Duque-Parra, J. E. (2005). "Note on the origin and history of the term "apoptosis"." *Anat Rec B New Anat,* 283(1), 2-4.

Ediz, N. ve Özdağ, H. (2001). "BOR MİNERALLERİ VE EKONOMİSİ." *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,* 002, 133-151.

Ekman, S. (2020). "How selecting best therapy for metastatic NTRK fusion-positive non-small cell lung cancer?" *Transl Lung Cancer Res,* 9(6), 2535-2544.

El-Hefny, I. M., Al Senosy, N. K., Hozayen, W. G., Ahmed, A. E., Diab, A. ve Basal, W. T. (2020). "Evaluation of the Cytotoxicity and Apoptotic Induction in Human Liver Cell Lines Exposed to Three Food Additives." *Recent Pat Food Nutr Agric,* 11(3), 193-201.

Elfving, H., Broström, E., Moens, L. N. J., Almlöf, J., Cerjan, D., Lauter, G., ve ark. (2021). "Evaluation of NTRK immunohistochemistry as a screening method for NTRK gene fusion detection in non-small cell lung cancer." *Lung Cancer,* 151, 53-59.

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

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. ve Nagata, S. (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." *Nature,* 391(6662), 43-50.

Farago, A. F. ve Azzoli, C. G. (2017). "Beyond ALK and ROS1, RET, NTRK, EGFR and BRAF gene rearrangements in non-small cell lung cancer." *Transl Lung Cancer Res,* 6(5), 550-559.

Farago, A. F., Taylor, M. S., Doebele, R. C., Zhu, V. W., Kummar, S., Spira, A. I., ve ark. (2018). "Clinicopathologic Features of Non-Small-Cell Lung Cancer Harboring an NTRK Gene Fusion." *JCO Precis Oncol,* 2018.

Fasano, M., Della Corte, C. M., Papaccio, F., Ciardiello, F. ve Morgillo, F. (2015). "Pulmonary Large-Cell Neuroendocrine Carcinoma, From Epidemiology to Therapy." *J Thorac Oncol,* 10(8), 1133-1141.

Feng, C., Xia, Y., Zou, P., Shen, M., Hu, J., Ying, S., ve ark. (2017). "Curcumin analog L48H37 induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and STAT3 pathways in human lung cancer cells." *Mol Carcinog,* 56(7), 1765-1777.

Fernald, K. ve Kurokawa, M. (2013). "Evading apoptosis in cancer." *Trends Cell Biol,* 23(12), 620-633.

Ferrer, I., Zugazagoitia, J., Herbertz, S., John, W., Paz-Ares, L. ve Schmid-Bindert, G. (2018). "KRAS-Mutant non-small cell lung cancer, From biology to therapy." *Lung Cancer*, 124, 53-64.

Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O. ve Samali, A. (2010). "Cellular stress responses, cell survival and cell death." *Int J Cell Biol*, 2010, 214074.

Gallardo-Williams, M. T., Maronpot, R. R., Wine, R. N., Brunssen, S. H. ve Chapin, R. E. (2003). "Inhibition of the enzymatic activity of prostate-specific antigen by boric acid and 3-nitrophenyl boronic acid." *Prostate*, 54(1), 44-49.

Gallardo-Williams, M. T., Chapin, R. E., King, P. E., Moser, G. J., Goldsworthy, T. L., Morrison, J. P., 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.

Gatalica, Z., Xiu, J., Swensen, J. ve Vranic, S. (2019). "Molecular characterization of cancers with NTRK gene fusions." *Mod Pathol*, 32(1), 147-153.

Ghanizadeh, H., Kiani, F., Koohyar, F. ve Khanlarzadeh, B. (2020). "Theoretical Study on Ionization of Boric Acid in Aqueous Solution by Ab Initio and DFT Methods at T=298.15 K." *Turk J Pharm Sci*, 17(2), 177-181.

Giacomini, A., Taranto, S., Rezzola, S., Matarazzo, S., Grillo, E., Bugatti, M., ve ark. (2020). "Inhibition of the FGF/FGFR System Induces Apoptosis in Lung Cancer Cells via c-Myc Downregulation and Oxidative Stress." *Int J Mol Sci*, 21(24).

Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M. ve Baradaran, B. (2015). "Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment." *Asian Pac J Cancer Prev*, 16(6), 2129-2144.

Gopinath, P., Gogoi, S. K., Sanpui, P., Paul, A., Chattopadhyay, A. ve Ghosh, S. S. (2010). "Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis." *Colloids Surf B Biointerfaces*, 77(2), 240-245.

Göksel, T., Eser, S., Güçlü, S. Z., Karadağ, M., Cıllı, A., Ozlu, T., ve ark. (2013). "Prognostic factors affecting survival in cases with lung cancer [A lung cancer mapping project in Turkey (LCMPT)]." *EUROPEAN RESPIRATORY JOURNAL*, 42.

Graf, R. P., Keller, N., Barbero, S. ve Stupack, D. (2014). "Caspase-8 as a regulator of tumor cell motility." *Curr Mol Med*, 14(2), 246-254.

Gurunathan, S., Kang, M. H., Jeyaraj, M. ve Kim, J. H. (2021). "Platinum Nanoparticles Enhance Exosome Release in Human Lung Epithelial Adenocarcinoma Cancer Cells (A549), Oxidative Stress and the Ceramide Pathway are Key Players." *Int J Nanomedicine*, 16, 515-538.

Hacioglu, C., Kar, F., Kacar, S., Sahinturk, V. ve Kanbak, G. (2020). "High Concentrations of Boric Acid Trigger Concentration-Dependent Oxidative Stress, Apoptotic Pathways and Morphological Alterations in DU-145 Human Prostate Cancer Cell Line." *Biol Trace Elem Res*, 193(2), 400-409.

Hamidi, H., Lilja, J. ve Ivaska, J. (2017). "Using xCELLigence RTCA Instrument to Measure Cell Adhesion." *Bio Protoc*, 7(24).

Han, B., Wu, J. ve Huang, L. (2020). "Induction of Apoptosis in Lung Cancer Cells by Viburnum grandiflorum via Mitochondrial Pathway." *Med Sci Monit*, 26, e920265.

Hanahan, D. ve Weinberg, R. A. (2011). "Hallmarks of cancer, the next generation." *Cell*, 144(5), 646-674.

Haro Durand, L. A., Góngora, A., Porto López, J. M., Boccaccini, A. R., Zago, M. P., Baldi, A., ve ark. (2014). "In vitro endothelial cell response to ionic dissolution products from boron-doped bioactive glass in the SiO(2)-CaO-P(2)O(5)-Na(2)O system." *J Mater Chem B*, 2(43), 7620-7630.

Harris, J. E., Thun, M. J., Mondul, A. M. ve Calle, E. E. (2004). "Cigarette tar yields in relation to mortality from lung cancer in the cancer prevention study II prospective cohort, 1982-8." *Bmj,* 328(7431), 72.

Hejmadi, M. (2010). Introduction to Cancer Biology.

Henderson, K., Stella, S. L., Kobylewski, S. ve Eckhert, C. D. (2009). "Receptor activated Ca(2+) release is inhibited by boric acid in prostate cancer cells." *PLoS One,* 4(6), e6009.

Henderson, K. A., Kobylewski, S. E., Yamada, K. E. ve Eckhert, C. D. (2015). "Boric acid induces cytoplasmic stress granule formation, eIF2α phosphorylation, and ATF4 in prostate DU-145 cells." *Biometals,* 28(1), 133-141.

Herbst, R. S., Morgensztern, D. ve Boshoff, C. (2018). "The biology and management of non-small cell lung cancer." *Nature,* 553(7689), 446-454.

Howe, P. D. (1998). "A review of boron effects in the environment." *Biol Trace Elem Res,* 66(1-3), 153-166.

Hsu, P. C., Jablons, D. M., Yang, C. T. ve You, L. (2019). "Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Pathway, Yes-Associated Protein (YAP) and the Regulation of Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC)." *Int J Mol Sci,* 20(15).

Huang, Y., Chen, Y., Mei, Q., Chen, Y., Yu, S. ve Xia, S. (2013). "Combined inhibition of the EGFR and mTOR pathways in EGFR wild-type non-small cell lung cancer cell lines with different genetic backgrounds." *Oncol Rep,* 29(6), 2486-2492.

Hunt, C. D. (1998). "Regulation of enzymatic activity, one possible role of dietary boron in higher animals and humans." *Biol Trace Elem Res,* 66(1-3), 205-225.

Husgafvel-Pursiainen, K., Boffetta, P., Kannio, A., Nyberg, F., Pershagen, G., Mukeria, A., ve ark. (2000). "p53 mutations and exposure to environmental tobacco smoke in a multicenter study on lung cancer." *Cancer Res,* 60(11), 2906-2911.

İdiz, U. O., Fırat, Y. D., Çakır, C., Yücesan, E. ve Ayşan, E. (2018). "Ehrlich Asit Tumörleri Üzerine Borik Asidin Etkisi." *İstanbul Med J,* 19(3), 251-254.

Inamura, K. (2017). "Lung Cancer, Understanding Its Molecular Pathology and the 2015 WHO Classification." *Front Oncol,* 7, 193.

Ince, S., Keles, H., Erdogan, M., Hazman, O. ve Kucukkurt, I. (2012). "Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice." *Drug Chem Toxicol,* 35(3), 285-292.

Indran, I. R., Tufo, G., Pervaiz, S. ve Brenner, C. (2011). "Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells." *Biochim Biophys Acta,* 1807(6), 735-745.

Jan, R. ve Chaudhry, G. E. (2019). "Understanding Apoptosis and Apoptotic Pathways Targeted Cancer Therapeutics." *Adv Pharm Bull,* 9(2), 205-218.

Jancík, S., Drábek, J., Radzioch, D. ve Hajdúch, M. (2010). "Clinical relevance of KRAS in human cancers." *J Biomed Biotechnol,* 2010, 150960.

Jänicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R. ve Porter, A. G. (1998). "Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis." *J Biol Chem,* 273(16), 9357-9360.

Jemal, A., Ward, E., Hao, Y. ve Thun, M. (2005). "Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002." *Jama,* 294(10), 1255-1259.

Ji, H., Li, D., Chen, L., Shimamura, T., Kobayashi, S., McNamara, K., ve ark. (2006). "The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies." *Cancer Cell*, 9(6), 485-495.

Jiang, M., Qi, L., Li, L. ve Li, Y. (2020). "The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer." *Cell Death Discov*, 6, 112.

Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., ve ark. (2001). "Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death." *Nature*, 410(6828), 549-554.

Kabu, M. ve Akosman, M. S. (2013). "Biological effects of boron." *Rev Environ Contam Toxicol*, 225, 57-75.

Kahya, M. C., Nazıroğlu, M. ve Çiğ, B. (2014). "Selenium reduces mobile phone (900 MHz)-induced oxidative stress, mitochondrial function, and apoptosis in breast cancer cells." *Biol Trace Elem Res*, 160(2), 285-293.

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

Karachaliou, N., Pilotto, S., Lazzari, C., Bria, E., de Marinis, F. ve Rosell, R. (2016). "Cellular and molecular biology of small cell lung cancer, an overview." *Transl Lung Cancer Res*, 5(1), 2-15.

Kartlaşmış, K., Kökbaş, U., Kayrın L. (2016). "Apoptozis Biyokimyası" *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 25(1), 52-69.

Kechagioglou, P., Papi, R. M., Provatopoulou, X., Kalogera, E., Papadimitriou, E., Grigoropoulos, P., ve ark. (2014). "Tumor suppressor PTEN in breast cancer, heterozygosity, mutations and protein expression." *Anticancer Res*, 34(3), 1387-1400.

Kempf, E., Rousseau, B., Besse, B. ve Paz-Ares, L. (2016). "KRAS oncogene in lung cancer, focus on molecularly driven clinical trials." *Eur Respir Rev*, 25(139), 71-76.

Kerr, E. M. ve Martins, C. P. (2018). "Metabolic rewiring in mutant Kras lung cancer." *Febs j*, 285(1), 28-41.

Kheder, E. S. ve Hong, D. S. (2018). "Emerging Targeted Therapy for Tumors with NTRK Fusion Proteins." *Clin Cancer Res*, 24(23), 5807-5814.

Kho, D., MacDonald, C., Johnson, R., Unsworth, C. P., O'Carroll, S. J., du Mez, E., ve ark. (2015). "Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time." *Biosensors (Basel)*, 5(2), 199-222.

Khunger, A., Khunger, M. ve Velcheti, V. (2018). "Dabrafenib in combination with trametinib in the treatment of patients with BRAF V600-positive advanced or metastatic non-small cell lung cancer, clinical evidence and experience." *Ther Adv Respir Dis*, 12, 1753466618767611.

Kızılay, Z., Erken, H. A., Çetin, N. K., Aktaş, S., Abas, B. ve Yılmaz, A. (2016). "Boric acid reduces axonal and myelin damage in experimental sciatic nerve injury." *Neural Regen Res*, 11(10), 1660-1665.

Kobylewski, S. E., Henderson, K. A., Yamada, K. E. ve Eckhert, C. D. (2017). "Activation of the EIF2α/ATF4 and ATF6 Pathways in DU-145 Cells by Boric Acid at the Concentration Reported in Men at the US Mean Boron Intake." *Biol Trace Elem Res*, 176(2), 278-293.

Kohno, T., Nakaoku, T., Tsuta, K., Tsuchihara, K., Matsumoto, S., Yoh, K., ve ark. (2015). "Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer." *Transl Lung Cancer Res*, 4(2), 156-164.

Korkmaz, M., Uzgören, E., Bakirdere, S., Aydin, F. ve Ataman, O. Y. (2007). "Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells." *Environ Toxicol,* 22(1), 17-25.

Kupcho, K., Shultz, J., Hurst, R., Hartnett, J., Zhou, W., Machleidt, T., ve ark. (2019). "A real-time, bioluminescent annexin V assay for the assessment of apoptosis." *Apoptosis,* 24(1-2), 184-197.

Kupeli, M. ve Koseoglu, R. D. (2018). "Large Cell Carcinoma with Adenocarcinoma in Lung." *J Coll Physicians Surg Pak,* 28(3), 240-242.

Kuru, R. ve Yarat, A. (2017). "Boron and a Current Overview of its Effects On Health." *Clinical and Experimental Health Sciences,* 7, 107-114.

Lam, T. K., Gallicchio, L., Lindsley, K., Shiels, M., Hammond, E., Tao, X. G., ve ark. (2009). "Cruciferous vegetable consumption and lung cancer risk, a systematic review." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,* 18(1), 184-195.

Larsen, B. D. ve Sørensen, C. S. (2017). "The caspase-activated DNase, apoptosis and beyond." *Febs j,* 284(8), 1160-1170.

Lee, J., Jang, H. J., Chun, H., Pham, T. H., Bak, Y., Shin, J. W., ve ark. (2019). "Calotropis gigantea extract induces apoptosis through extrinsic/intrinsic pathways and reactive oxygen species generation in A549 and NCI-H1299 non-small cell lung cancer cells." *BMC Complement Altern Med,* 19(1), 134.

Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U., Yang, Y. W. ve Buchanan, P. (2015). "Lung cancer, Biology and treatment options." *Biochim Biophys Acta,* 1856(2), 189-210.

Leung, E. L. H., Luo, L. X., Liu, Z. Q., Wong, V. K. W., Lu, L. L., Xie, Y., ve ark. (2018). "Inhibition of KRAS-dependent lung cancer cell growth by deltarasin, blockage of autophagy increases its cytotoxicity." *Cell Death Dis,* 9(2), 216.

Li, B. T., Ross, D. S., Aisner, D. L., Chaft, J. E., Hsu, M., Kako, S. L., ve ark. (2016). "HER2 Amplification and HER2 Mutation Are Distinct Molecular Targets in Lung Cancers." *J Thorac Oncol,* 11(3), 414-419.

Li, J. ve Yuan, J. (2008). "Caspases in apoptosis and beyond." *Oncogene,* 27(48), 6194-6206.

Li, L. Y., Luo, X. ve Wang, X. (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria." *Nature,* 412(6842), 95-99.

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

Lin, X. M., Liu, S. B., Luo, Y. H., Xu, W. T., Zhang, Y., Zhang, T., ve ark. (2020). "10-HDA Induces ROS-Mediated Apoptosis in A549 Human Lung Cancer Cells by Regulating the MAPK, STAT3, NF-κB, and TGF-β1 Signaling Pathways." *Biomed Res Int,* 2020, 3042636.

Lissowska, J., Foretova, L., Dabek, J., Zaridze, D., Szeszenia-Dabrowska, N., Rudnai, P., ve ark. (2010). "Family history and lung cancer risk, international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses." *Cancer Causes Control,* 21(7), 1091-1104.

Liu, C., Zheng, S., Jin, R., Wang, X., Wang, F., Zang, R., ve ark. (2020). "The superior efficacy of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy in KRAS-mutant non-small cell lung cancer that correlates with an inflammatory phenotype and increased immunogenicity." *Cancer Lett,* 470, 95-105.

Liu, G., Pei, F., Yang, F., Li, L., Amin, A. D., Liu, S., ve ark. (2017). "Role of Autophagy and Apoptosis in Non-Small-Cell Lung Cancer." *Int J Mol Sci,* 18(2).

Liu, S., Li, S., Hai, J., Wang, X., Chen, T., Quinn, M. M., ve ark. (2018). "Targeting HER2 Aberrations in Non-Small Cell Lung Cancer with Osimertinib." *Clin Cancer Res,* 24(11), 2594-2604.

Locksley, R. M., Killeen, N. ve Lenardo, M. J. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies, integrating mammalian biology." *Cell,* 104(4), 487-501.

Mahabir, S., Spitz, M. R., Barrera, S. L., Dong, Y. Q., Eastham, C. ve Forman, M. R. (2008). "Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women." *Am J Epidemiol,* 167(9), 1070-1080.

Mariño, G. ve Kroemer, G. (2013). "Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure." *Cell Res,* 23(11), 1247-1248.

Martelli, M. P., Sozzi, G., Hernandez, L., Pettirossi, V., Navarro, A., Conte, D., ve ark. (2009). "EML4-ALK rearrangement in non-small cell lung cancer and non-tumor lung tissues." *Am J Pathol,* 174(2), 661-670.

Massion, P. P. ve Carbone, D. P. (2003). "The molecular basis of lung cancer, molecular abnormalities and therapeutic implications." *Respir Res,* 4(1), 12.

Matsuura, K., Canfield, K., Feng, W. ve Kurokawa, M. (2016). "Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer." *International Review of Cell and Molecular Biology,* 327, 43-87.

McAuley, E. M., Bradke, T. A. ve Plopper, G. E. (2011). "Phenylboronic acid is a more potent inhibitor than boric acid of key signaling networks involved in cancer cell migration." *Cell Adh Migr,* 5(5), 382-386.

McIlwain, D. R., Berger, T. ve Mak, T. W. (2013). "Caspase functions in cell death and disease." *Cold Spring Harb Perspect Biol,* 5(4), a008656.

Miller, K. D., Siegel, R. L., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Kramer, J. L., Rowland, J. H., ve ark. (2016). "Cancer treatment and survivorship statistics, 2016." *CA Cancer J Clin,* 66(4), 271-289.

Miller, Y. E. (2005). "Pathogenesis of lung cancer, 100 year report." *Am J Respir Cell Mol Biol,* 33(3), 216-223.

Minari, R., Bordi, P. ve Tiseo, M. (2016). "Third-generation epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer, review on emerged mechanisms of resistance." *Transl Lung Cancer Res,* 5(6), 695-708.

Mogi, A. ve Kuwano, H. (2011). "TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer." *J Biomed Biotechnol,* 2011, 583929.

Mogoşanu, G. D., Biţă, A., Bejenaru, L. E., Bejenaru, C., Croitoru, O., Rău, G., ve ark. (2016). "Calcium Fructoborate for Bone and Cardiovascular Health." *Biol Trace Elem Res,* 172(2), 277-281.

Molina, J. R. ve Adjei, A. A. (2006). "The Ras/Raf/MAPK pathway." *J Thorac Oncol,* 1(1), 7-9.

Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E. ve Adjei, A. A. (2008). "Non-small cell lung cancer, epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship." *Mayo Clin Proc,* 83(5), 584-594.

Motadi, L. R., Misso, N. L., Dlamini, Z. ve Bhoola, K. D. (2007). "Molecular genetics and mechanisms of apoptosis in carcinomas of the lung and pleura, therapeutic targets." *Int Immunopharmacol,* 7(14), 1934-1947.

Motta, G., Nahum, M. A., Testa, T. ve Spinelli, E. (1995). "[TNM staging system of lung carcinoma, historical notes, limitations and controversies]." *Ann Ital Chir,* 66(4), 425-432.

Moulin, M. ve Arrigo, A. P. (2008). "Caspases activation in hyperthermia-induced stimulation of TRAIL apoptosis." *Cell Stress Chaperones,* 13(3), 313-326.

Movahedi Najafabadi, B. A. ve Abnosi, M. H. (2016). "Boron Induces Early Matrix Mineralization via Calcium Deposition and Elevation of Alkaline Phosphatase Activity in Differentiated Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells." *Cell J,* 18(1), 62-73.

Myall, N. J., Henry, S., Wood, D., Neal, J. W., Han, S. S., Padda, S. K., ve ark. (2019). "Natural Disease History, Outcomes, and Co-mutations in a Series of Patients With BRAF-Mutated Non-small-cell Lung Cancer." *Clin Lung Cancer*, 20(2), e208-e217.

Naghii, M. R. ve Samman, S. (1997). "The effect of boron supplementation on its urinary excretion and selected cardiovascular risk factors in healthy male subjects." *Biol Trace Elem Res*, 56(3), 273-286.

Negara, K. S., Suwiyoga, K., Pemayun, T. G. A., Sudewi, A. A. R., Astawa, N. M., Arijana, I., ve ark. (2018). "The Role of Caspase-3, Apoptosis-Inducing Factor, and B-cell Lymphoma-2 Expressions in Term Premature Rupture of Membrane." *Rev Bras Ginecol Obstet*, 40(12), 733-739.

Nguyen-Ngoc, T., Bouchaab, H., Adjei, A. A. ve Peters, S. (2015). "BRAF Alterations as Therapeutic Targets in Non-Small-Cell Lung Cancer." *J Thorac Oncol*, 10(10), 1396-1403.

Nielsen, F. H. (2017). "Historical and recent aspects of boron in human and animal health." *JOURNAL OF BORON*, 3, 153-160.

Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K. ve Tavernarakis, N. (2013). "Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy." *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3448-3459.

Orellana, E. A. ve Kasinski, A. L. (2016). "Sulforhodamine B (SRB) Assay in Cell Culture to Investigate Cell Proliferation." *Bio Protoc*, 6(21).

Özsu, S. ve Özlü, T. (2013). "Türkiye'de Akciğer Kanseri Epidemiyolojisi." *Güncel Göğüs Hastalıkları Serisi*, 1 (3), 7-11.

Parikh, R. A., Wang, P., Beumer, J. H., Chu, E. ve Appleman, L. J. (2014). "The potential roles of hepatocyte growth factor (HGF)-MET pathway inhibitors in cancer treatment." *Onco Targets Ther*, 7, 969-983.

Parrish, A. B., Freel, C. D. ve Kornbluth, S. (2013). "Cellular mechanisms controlling caspase activation and function." *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(6).

Pavlopoulou, A., Spandidos, D. A. ve Michalopoulos, I. (2015). "Human cancer databases (review)." *Oncol Rep*, 33(1), 3-18.

Peña-Blanco, A. ve García-Sáez, A. J. (2018). "Bax, Bak and beyond - mitochondrial performance in apoptosis." *Febs j*, 285(3), 416-431.

Perez-Moreno, P., Brambilla, E., Thomas, R. ve Soria, J. C. (2012). "Squamous cell carcinoma of the lung, molecular subtypes and therapeutic opportunities." *Clin Cancer Res*, 18(9), 2443-2451.

Pérez-Ramírez, C., Cañadas-Garre, M., Molina, M., Faus-Dáder, M. J. ve Calleja-Hernández, M. (2015). "PTEN and PI3K/AKT in non-small-cell lung cancer." *Pharmacogenomics*, 16(16), 1843-1862.

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

Pietanza MC, Krug LM, Wu AJ, Kris MG, Rudin CM, Travis WD. (2015). Small Cell and Neuroendocrine Tumors of the Lung. DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA. Cancer, Principles and Practice of Oncology. (10th Edition). Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. 42, 536-555.

Pillai, R. N., Behera, M., Berry, L. D., Rossi, M. R., Kris, M. G., Johnson, B. E., ve ark. (2017). "HER2 mutations in lung adenocarcinomas, A report from the Lung Cancer Mutation Consortium." *Cancer*, 123(21), 4099-4105.

Pirker, R., Herth, F. J., Kerr, K. M., Filipits, M., Taron, M., Gandara, D., ve ark. (2010). "Consensus for EGFR mutation testing in non-small cell lung cancer, results from a European workshop." *J Thorac Oncol*, 5(10), 1706-1713.

Pizzorno, L. (2015). "Nothing Boring About Boron." *Integr Med (Encinitas)*, 14(4), 35-48.

Planchard, D., Besse, B., Groen, H. J. M., Souquet, P. J., Quoix, E., Baik, C. S., ve ark. (2016). "Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer, an open-label, multicentre phase 2 trial." *Lancet Oncol*, 17(7), 984-993.

Qureshi, S., Al-Shabanah, O. A., Al-Harbi, M. M., Al-Bekairi, A. M. ve Raza, M. (2001). "Boric acid enhances in vivo Ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in Swiss albino mice." *Toxicology*, 165(1), 1-11.

Reed, J. C. (1997). "Bcl-2 family proteins, regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies." *Semin Hematol*, 34(4 Suppl 5), 9-19.

Reungwetwattana, T. ve Dy, G. K. (2013). "Targeted therapies in development for non-small cell lung cancer." *J Carcinog*, 12, 22.

Roh, M. S. (2014). "Molecular pathology of lung cancer, current status and future directions." *Tuberc Respir Dis (Seoul)*, 77(2), 49-54.

Román, M., Baraibar, I., López, I., Nadal, E., Rolfo, C., Vicent, S., ve ark. (2018). "KRAS oncogene in non-small cell lung cancer, clinical perspectives on the treatment of an old target." *Mol Cancer*, 17(1), 33.

Roskoski, R., Jr. (2013). "Anaplastic lymphoma kinase (ALK), structure, oncogenic activation, and pharmacological inhibition." *Pharmacol Res*, 68(1), 68-94.

Rothschild, S. I. (2015). "Targeted Therapies in Non-Small Cell Lung Cancer-Beyond EGFR and ALK." *Cancers (Basel)*, 7(2), 930-949.

Russell, P. A., Yu, Y., Young, R. J., Conron, M., Wainer, Z., Alam, N., ve ark. (2014). "Prevalence, morphology, and natural history of FGFR1-amplified lung cancer, including squamous cell carcinoma, detected by FISH and SISH." *Mod Pathol*, 27(12), 1621-1631.

Sadiq, A. A. ve Salgia, R. (2013). "MET as a possible target for non-small-cell lung cancer." *J Clin Oncol*, 31(8), 1089-1096.

Sakashita, S., Sakashita, M. ve Sound Tsao, M. (2014). "Genes and pathology of non-small cell lung carcinoma." *Semin Oncol*, 41(1), 28-39.

Samali, A., Fulda, S., Gorman, A. M., Hori, O. ve Srinivasula, S. M. (2010). "Cell stress and cell death." *Int J Cell Biol*, 2010, 245803.

Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H. ve Peter, M. E. (1999). "The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis." *J Biol Chem*, 274(3), 1541-1548.

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

Schimmer, A. D. (2004). "Inhibitor of apoptosis proteins, translating basic knowledge into clinical practice." *Cancer Res*, 64(20), 7183-7190.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. ve Peter, M. E. (1998). "Apoptosis signaling by death receptors." *Eur J Biochem*, 254(3), 439-459.

Scorei, R., Ciubar, R., Ciofrangeanu, C. M., Mitran, V., Cimpean, A. ve Iordachescu, D. (2008). "Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells." *Biol Trace Elem Res*, 122(3), 197-205.

Scorei, R. I. ve Popa, R., Jr. (2010). "Boron-containing compounds as preventive and chemotherapeutic agents for cancer." *Anticancer Agents Med Chem*, 10(4), 346-351.

Scorei, R. I. ve Rotaru, P. (2011). "Calcium fructoborate--potential anti-inflammatory agent." *Biol Trace Elem Res,* 143(3), 1223-1238.

SenthilKumar, G., Fisher, M. M., Skiba, J. H., Miller, M. C., Brennan, S. R., Kaushik, S., ve ark. (2020). "FGFR Inhibition Enhances Sensitivity to Radiation in Non-Small Cell Lung Cancer." *Mol Cancer Ther,* 19(6), 1255-1265.

Sezekler, I., Ersoz, M., Turan, M. A. ve Coskun, Z. M. (2020). "Investigation of the biochemical and apoptotic changes in breast cancer cells treated with leaf extract from tea (Camellia sinensis L.) grown with added boric acid." *Pak J Pharm Sci,* 33(5), 1927-1932.

Shamas-Din, A., Kale, J., Leber, B. ve Andrews, D. W. (2013). "Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins." *Cold Spring Harb Perspect Biol,* 5(4), a008714.

Sharma, H. P., Jain, P. ve Amit, P. (2014). "APOPTOSIS (PROGRAMMED CELL DEATH) - A REVIEW." *World Journal of Pharmaceutical Research,* 3(4), 1854-1872.

Shaw, A. T. ve Solomon, B. (2011). "Targeting anaplastic lymphoma kinase in lung cancer." *Clin Cancer Res,* 17(8), 2081-2086.

Sheng, H., Lv, W., Zhu, L., Wang, L., Wang, Z., Han, J., ve ark. (2020). "Liriopesides B induces apoptosis and cell cycle arrest in human non-small cell lung cancer cells." *Int J Mol Med,* 46(3), 1039-1050.

Sherr, C. J. ve McCormick, F. (2002). "The RB and p53 pathways in cancer." *Cancer Cell,* 2(2), 103-112.

Shi, S., Tan, P., Yan, B., Gao, R., Zhao, J., Wang, J., ve ark. (2016). "ER stress and autophagy are involved in the apoptosis induced by cisplatin in human lung cancer cells." *Oncol Rep,* 35(5), 2606-2614.

Siegel, R. L., Miller, K. D. ve Jemal, A. (2020). "Cancer statistics, 2020." *CA Cancer J Clin,* 70(1), 7-30.

Smaili, S. S., Hsu, Y. T., Youle, R. J. ve Russell, J. T. (2000). "Mitochondria in Ca2+ signaling and apoptosis." *J Bioenerg Biomembr,* 32(1), 35-46.

Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., ve ark. (2007). "Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer." *Nature,* 448(7153), 561-566.

Solomon, J. P., Benayed, R., Hechtman, J. F. ve Ladanyi, M. (2019). "Identifying patients with NTRK fusion cancer." *Ann Oncol,* 30(Suppl_8), 16-22.

Spyratos, D., Zarogoulidis, P., Porpodis, K., Tsakiridis, K., Machairiotis, N., Katsikogiannis, N., ve ark. (2013). "Occupational exposure and lung cancer." *J Thorac Dis,* 5 Suppl 4(Suppl 4), S440-445.

Stinchcombe, T. E. (2020). "Current management of RET rearranged non-small cell lung cancer." *Ther Adv Med Oncol,* 12, 1758835920928634.

Su, Z., Yang, Z., Xu, Y., Chen, Y. ve Yu, Q. (2015). "Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis." *Mol Cancer,* 14, 48.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., ve ark. (2021). "Global cancer statistics 2020, GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries." *CA Cancer J Clin*.

Susin, S. A., Daugas, E., Ravagnan, L., Samejima, K., Zamzami, N., Loeffler, M., ve ark. (2000). "Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis." *J Exp Med,* 192(4), 571-580.

Tai, W., Mahato, R. ve Cheng, K. (2010). "The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery." *J Control Release,* 146(3), 264-275.

Takeuchi, K. (2019). "Discovery Stories of RET Fusions in Lung Cancer, A Mini-Review." *Front, Physiol* 10, 216.

Takeuchi, K., Choi, Y. L., Soda, M., Inamura, K., Togashi, Y., Hatano, S., ve ark. (2008). "Multiplex reverse transcription-PCR screening for EML4-ALK fusion transcripts." *Clin Cancer Res,* 14(20), 6618-6624.

Taşlı, P. N., Doğan, A., Demirci, S. ve Şahin, F. (2013). "Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) in vitro." *Biol Trace Elem Res,* 153(1-3), 419-427.

Tepedelen, B. E., Soya, E. ve Korkmaz, M. (2016). "Boric Acid Reduces the Formation of DNA Double Strand Breaks and Accelerates Wound Healing Process." *Biol Trace Elem Res,* 174(2), 309-318.

Tepedelen, B. E., Korkmaz, M., Tatlisumak, E., Uluer, E. T., Ölmez, E., Değerli, İ., ve ark. (2017). "A Study on the Anticarcinogenic Effects of Calcium Fructoborate." *Biol Trace Elem Res,* 178(2), 210-217.

Tombuloglu, A., Copoglu, H., Aydin-Son, Y. ve Guray, N. T. (2020). "In vitro effects of boric acid on human liver hepatoma cell line (HepG2) at the half-maximal inhibitory concentration." *J Trace Elem Med Biol,* 62, 126573.

Touat, M., Ileana, E., Postel-Vinay, S., André, F. ve Soria, J. C. (2015). "Targeting FGFR Signaling in Cancer." *Clin Cancer Res,* 21(12), 2684-2694.

Travis, W. D., Linnoila, R. I., Tsokos, M. G., Hitchcock, C. L., Cutler, G. B., Jr., Nieman, L., ve ark. (1991). "Neuroendocrine tumors of the lung with proposed criteria for large-cell neuroendocrine carcinoma. An ultrastructural, immunohistochemical, and flow cytometric study of 35 cases." *Am J Surg Pathol,* 15(6), 529-553.

Travis, W. D. (2012). "Update on small cell carcinoma and its differentiation from squamous cell carcinoma and other non-small cell carcinomas." *Mod Pathol,* 25 Suppl 1, S18-30.

Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., ve ark. (2015). "The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors, Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification." *J Thorac Oncol,* 10(9), 1243-1260.

Tsim, S., O'Dowd, C. A., Milroy, R. ve Davidson, S. (2010). "Staging of non-small cell lung cancer (NSCLC), a review." *Respir Med,* 104(12), 1767-1774.

Üzmezoğlu, B. ve Töreyin, Z. N. (2017). "Asbestin Sağlık Üzerine Etkisi". *Türk Toraks Derneği Eğitim Kitapları Serisi*, 9.

Vaishnavi, A., Le, A. T. ve Doebele, R. C. (2015). "TRKing down an old oncogene in a new era of targeted therapy." *Cancer Discov,* 5(1), 25-34.

Vaishnavi, A., Capelletti, M., Le, A. T., Kako, S., Butaney, M., Ercan, D., ve ark. (2013). "Oncogenic and drug-sensitive NTRK1 rearrangements in lung cancer." *Nat Med,* 19(11), 1469-1472.

van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., ve ark. (2002). "The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity." *Cell Death Differ,* 9(1), 20-26.

VanderLaan, P. A., Rangachari, D., Mockus, S. M., Spotlow, V., Reddi, H. V., Malcolm, J., ve ark. (2017). "Mutations in TP53, PIK3CA, PTEN and other genes in EGFR mutated lung cancers, Correlation with clinical outcomes." *Lung Cancer,* 106, 17-21.

Vermeulen, K., Berneman, Z. N. ve Van Bockstaele, D. R. (2003). "Cell cycle and apoptosis." *Cell Prolif*, 36(3), 165-175.

Vichai, V. ve Kirtikara, K. (2006). "Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening." *Nat Protoc*, 1(3), 1112-1116.

Vineis, P., Airoldi, L., Veglia, F., Olgiati, L., Pastorelli, R., Autrup, H., ve ark. (2005). "Environmental tobacco smoke and risk of respiratory cancer and chronic obstructive pulmonary disease in former smokers and never smokers in the EPIC prospective study." *Bmj*, 330(7486), 277.

Wajant, H. (2002). "The Fas signaling pathway, more than a paradigm." *Science*, 296(5573), 1635-1636.

Wakelee, H. A., Chang, E. T., Gomez, S. L., Keegan, T. H., Feskanich, D., Clarke, C. A., ve ark. (2007). "Lung cancer incidence in never smokers." *J Clin Oncol*, 25(5), 472-478.

Wan, Q., Liu, X., Zeng, Z., Chen, Z., Liu, Y. ve Zu, Y. (2020). "Aptamer Cocktail to Detect Multiple Species of Mycoplasma in Cell Culture." *Int J Mol Sci*, 21(11).

Wang, X., Shao, Q. H., Zhou, H., Wu, J. L., Quan, W. Q., Ji, P., ve ark. (2020). "Ginkgolide B inhibits lung cancer cells promotion via beclin-1-dependent autophagy." *BMC Complement Med Ther*, 20(1), 194.

Warth, A., Muley, T., Dienemann, H., Goeppert, B., Stenzinger, A., Schnabel, P. A., ve ark. (2014). "ROS1 expression and translocations in non-small-cell lung cancer, clinicopathological analysis of 1478 cases." *Histopathology*, 65(2), 187-194.

Wei, Y., Yuan, F. J., Zhou, W. B., Wu, L., Chen, L., Wang, J. J., ve ark. (2016). "Borax-induced apoptosis in HepG2 cells involves p53, Bcl-2, and Bax." *Genet Mol Res*, 15(2).

Weisz, L., Oren, M. ve Rotter, V. (2007). "Transcription regulation by mutant p53." *Oncogene*, 26(15), 2202-2211.

WHO, (2021). World Health Organization, IARC-The International Agency for Research on Cancer, Cancer Today. (https,//gco.iarc.fr/today/home)

WHO, (2021). World Health Organization, IARC-The International Agency for Research on Cancer, Cancer Tomorrow. (https,//gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype)

Wong, R. S. (2011). "Apoptosis in cancer, from pathogenesis to treatment." *J Exp Clin Cancer Res* 30(1), 87.

Xiao, H., Xue, Q., Zhang, Q., Li, C., Liu, X., Liu, J., ve ark. (2019). "How Ginsenosides Trigger Apoptosis in Human Lung Adenocarcinoma Cells." *Am J Chin Med*, 47(8), 1737-1754.

Yah, C. S. ve Simate, G. S. (2020). "Engineered nanoparticle bio-conjugates toxicity screening, The xCELLigence cells viability impact." *Bioimpacts*, 10(3), 195-203.

Yamamoto, S. ve Iwakuma, T. (2018). "Regulators of Oncogenic Mutant TP53 Gain of Function." *Cancers (Basel)*, 11(1).

Yang, J., Cao, L., Li, Y., Liu, H., Zhang, M., Ma, H., ve ark. (2021). "Gracillin Isolated from Reineckia carnea Induces Apoptosis of A549 Cells via the Mitochondrial Pathway." *Drug Des Devel, Ther* 15, 233-243.

Ye, M., Zhang, X., Li, N., Zhang, Y., Jing, P., Chang, N., ve ark. (2016). "ALK and ROS1 as targeted therapy paradigms and clinical implications to overcome crizotinib resistance." *Oncotarget*, 7(11), 12289-12304.

Yener, N. A. ve Apa, D. D. (2014). "Akciğer Kanserinde Morfolojik Tanı ve Sınıflama." *TÜRK RADYOLOJİ DERNEĞİ*, 2, 281-289.

Yıldız, K. (2017). "Akciğer Kanserinin Sınıflamasında Patolojide Yenilikler" *Toraks Cerrahisi Bülteni*, 10, 31-39.

Zhang, X., Lu, H., Wang, Y., Liu, C., Zhu, W., Zheng, S., ve ark. (2015). "Taurine induces the apoptosis of breast cancer cells by regulating apoptosis-related proteins of mitochondria." *Int J Mol Med*, 35(1), 218-226.

Zheng, M. (2016). "Classification and Pathology of Lung Cancer." *Surg Oncol Clin N Am*, 25(3), 447-468.

Zhu, M., Wang, M., Jiang, Y., Wu, H., Lu, G., Shi, W., ve ark. (2018). "Gambogic Acid Induces Apoptosis of Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC) Cells by Suppressing Notch Signaling." *Med Sci Monit*, 24, 7146-7151.

2021 tez intihal

ORİJİNALLİK RAPORU

%7	%5	%3	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Erciyes Ãniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
3	Submitted to Eskisehir Osmangazi University Öğrenci Ödevi	<%1
4	www.isindexing.com İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Gaziantep Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
6	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
7	guncel.tgv.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
9	Submitted to Bülent Ecevit Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1