

T.C.

İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

SODYUM PERBORAT TETRAHİDRATIN PANKREAS KANSERİ ÜZERİNDEKİ  
SİTOTOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SARA ALSHALTONE

2000001680

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ezgi AVŞAR ABDİK

TEMMUZ 2023

T.C.

İSTANBUL KÜLTÜR ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

SODYUM PERBORAT TETRAHİDRATIN PANKREAS KANSERİ ÜZERİNDEKİ  
SİTOTOKSİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SARA ALSHALTONE

2000001680

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Program: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Ezgi AVŞAR ABDİK

Jüri Üyeleri: Dr. Öğr. Üyesi Esra Aydemir

Dr. Öğr. Üyesi Pelin Özfiliz Kılbaş

TEMMUZ 2023

## ÖNSÖZ

Öncelikle, araştırma yolculuğum boyunca bana danışmanlık ettiği, her konuda yardımcı olduğu ve desteklediği için sevgili danışman hocam Dr.Öğr.Üyesi Ezgi AVŞAR ABDİK'e teşekkür etmek istiyorum. Çalışmamızda kullanmak üzere bize bor veren Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölüm Başkanı Prof. Dr. Fikretin ŞAHİN'e katkılarından dolayı teşekkür etmek istiyorum. qPCR deneylerindeki yardımı ve desteği için Melis YILDIRIM'a çok teşekkür etmek istiyorum. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki tüm hocalarıma ve tüm sınıf arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Dr.Öğr.Üyesi Pelin ÖZFİLİZ KILBAŞ'a üniversite eğitimim boyunca bana yardım ettiği için teşekkür etmek istiyorum. Araştırma yolculuğum boyunca tüm arkadaşlarıma destekleri ve teşvikleri için teşekkür ediyorum. Araştırma yolculuğumdaki destekleri için sevgili aileme, babama, anneme, erkek ve kız kardeşlerime teşekkür ediyorum.

## ÖZET

Pankreas kanseri, dünyadaki en ölümcül yedinci kanser türü olarak sınıflandırılmaktadır. Hastalık son evrelerinde belirti verdiği için teşhis edilmesi zordur. Bununla birlikte, hastalığın tedavisi için çeşitli yaklaşımlar mevcuttur. Cerrahi, Neoadjuvan ve Adjuvan terapi, Kemoterapi ve Radyoterapi geleneksel tedavi yöntemleri arasında yer almaktadır. Tedavi türü, kanserin ciddiyetine / seviyesine göre değişiklik göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar doğal ürünlerin birçok kanserin tedavisine katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bu doğal ürünler arasında resveratrol, kurkumin, piperin, dioscin ve bor bulunmaktadır. Bor; suda, toprakta ve günlük insan diyetinde bulunan doğal bir üründür. İnsanların ve hayvanların yaşamlarında hayati rol oynamaktadır. Bor; yara iyileşmesini etkinleştirir, bağışıklık sistemini güçlendirir ve kemiklerin oluşumuna ve korunmasına yardımcı olur. Ayrıca, bir anti-oksidan ve bir anti-mikrobiyal ajan olarak görev alır. Son araştırmalara göre, borun anti-kanser özelliğinin olduğu da kanıtlanmıştır. Bu nedenle, bu çalışmanın temel amacı, MTT tahlili, Apoptoz analizi, Hücre döngüsü analizi, DIOC6 boyası, Propidyum ioydür (PI) boyası ve gerçek zaman PZR ile sodyum perborat tetrahidrat (SPT)'nin pankreas kanseri hücresi MIAPaCa-2 üzerindeki sitotoksik etkilerini araştırmaktır. Sonuçlara göre 125 µg/ml SPT dozunun hücre canlılığını azalttığı görülmüştür. Ayrıca bu doz hücrelerin apoptoza gitmesine neden olmuştur. Apoptoz analizi sonuçlarına göre, 125 ug / ml SPT uygulanan grupta apoptotik hücrelerin yüzdesinin arttığı görülmüştür. Hücre döngüsü analizine göre ise 125 µg / mL SPT uygulanan grupta sub-G0 / G1 fazında hücre yüzdesi artarken, G0 / G1 ve G2 / M fazlarındaki hücre yüzdeleri azalmıştır. Sub-G0 / G1 fazındaki bu artış apoptoz sonuçlarını desteklemektedir. Ek olarak, 125 ug / ml SPT uygulanan grupta DIOC6 boyaması sonucunda hücrelerin mitokondriyal membran potansiyellerini kaybettiği gözlenmiştir. PI boyaması ile de 125 ug / ml SPT uygulanan grupta hücrelerin apoptoza gittiği görülmüştür. PI boyaması ile apoptoz sonuçları desteklenmiştir. BAX ve KASPAZ 9 genlerinin ekspresyonu, 125 µg / ml SPT uygulanan grupta önemli ölçüde artmıştır. Bununla birlikte, P53 tümör baskılayıcı geninin gen ekspresyonunda ise önemli ölçüde değişiklik görülmemiştir. Bu bulgulara dayanarak SPT, pankreas kanser hücresi MIAPaCa-2'nin proliferasyonunu azaltmış ve hücrelerin apoptoza gitmesine sebep olmuştur. Elde edilen sonuçlar, SPT'nin pankreas kanseri için umut verici bir terapötik aday olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, SPT'nin etkinliğini kanıtlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Pankreas kanseri, Sodyum perborate tetrahidrat, Apoptoz

## ABSTRACT

Pancreatic cancer is classified as the seventh deadliest type of cancer in the world. It is difficult to diagnose because the disease has symptoms in its latest stages. However, there are several approaches to the treatment of disease. The traditional treatment methods are Surgery, Neoadjuvant and Adjuvant therapy, Chemotherapy, Radiation therapy. Treatment type varies according to the severity/level of the cancer. Studies in recent years have shown that natural products contribute to the treatment of many cancers. These natural products include resveratrol, curcumin, piperine, dioscin and boron. Boron is a natural product found in water, soil, and daily human diet. It plays vital roles in the life of humans and animals. Boron activates wound healing, boosts the immune system, and it helps in the formation and maintenance of bones. It also acts as an anti-oxidant and an anti-microbial agent. Furthermore, according to recent studies, boron has been proven to have an anti-cancer property. Therefore, the main purpose of this study was to investigate the effects of sodium perborate tetrahydrate (SPT) on the pancreatic cancer cell line; MIAPaCa-2 by MTT assay, Apoptosis analysis, Cell cycle analysis, DIOC6 staining, Propidium iodide (PI) staining and Real time-PCR. According to the results, it was observed that 125  $\mu\text{g/ml}$  SPT significantly decreased cell viability. In addition, 125  $\mu\text{g/ml}$  SPT triggers apoptotic cell death. During apoptosis analysis, the percentage of apoptotic cells rate significantly increased at the dose of 125  $\mu\text{g/ml}$  SPT. During cell cycle analysis, 125  $\mu\text{g/ml}$  SPT elevated the percentage of cells in sub-G0/G1 phase, while decreased in G0/G1 and G2/M phases. Therefore, cell cycle results were consistent with apoptosis results. In addition, it was observed that cells lost their mitochondrial membrane potential as a result of DIOC6 staining at a dose of 125  $\mu\text{g/ml}$  SPT. According to PI staining, cells treated with 125  $\mu\text{g/ml}$  SPT were shown to undergo apoptosis. Apoptosis results are supported by PI staining. 125  $\mu\text{g/ml}$  SPT treatment significantly upregulated BAX and CASPASE 9 genes expression while the tumor suppressor gene P53 expression level did not significantly change. Based on these findings, SPT reduced the proliferation of pancreatic cancer cell MIAPaCa-2 and caused cells to trigger apoptosis. Results showed that SPT can be a promising therapeutic candidate for pancreatic cancer. However, further studies are needed to prove its effectiveness.

**Key Words:** Pancreatic cancer, Sodium perborate tetrahydrate, Apoptosis

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
ÖZET .....	ii
ABSTRACT.....	iii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ .....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. KANSER TARİHİ .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. TÜMÖR TİPLERİ.....</b>	<b>1</b>
1.2.1. İyi Huylu Tümör .....	2
1.2.2. Kötü Huylu Tümör.....	2
<b>1.3. KANSERİN ÖZELLİKLERİ .....</b>	<b>2</b>
<b>1.4. KANSER İSTATİSTİKLERİ.....</b>	<b>3</b>
<b>1.5. KANSERE NEDEN OLAN FAKTÖRLER .....</b>	<b>4</b>
1.5.1. Çevresel Faktörler .....	5
1.5.2. Genetik Faktörler .....	6
<b>1.6. KARSİNOGENEZ.....</b>	<b>6</b>
<b>1.7. KANSERİN GENETİĞİ .....</b>	<b>7</b>
1.7.1. HücreSEL Onkogenler .....	7
1.7.2. Tümör Baskılayıcı Genler.....	10
<b>1.8. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI .....</b>	<b>11</b>
1.8.1. Otofaji .....	11
1.8.2. Nekroz.....	16
1.8.3. Apoptosis .....	18
<b>1.9. PANKREAS KANSERİ .....</b>	<b>24</b>
1.9.1. İnsidans Ve Mortalite İstatistikleri .....	25

1.9.2.	Risk Faktörleri .....	26
1.9.3.	Belirtiler .....	26
1.9.4.	Pankreas Kanseri İlerlemesinin Moleküler Karakterizasyonu.....	27
1.9.5.	Tedavi .....	28
<b>1.10.</b>	<b>BOR.....</b>	<b>31</b>
1.10.1.	Borun Kimyasal Yapısı.....	31
1.10.2.	Borun Faydaları Ve Kaynağı .....	32
1.10.3.	Borun Anti-Kanser Aktivitesi .....	33
<b>1.11.</b>	<b>AMAÇ.....</b>	<b>33</b>
<b>2.</b>	<b>MATERYAL VE YÖNTEMLER .....</b>	<b>34</b>
2.1.	Hücre Kültürü.....	34
2.2.	Hücre Açma, Hücre Pasajlama ve Hücre Dondurma Protokolü.....	34
2.3.	Sodyum Perborat Tetrahidratın (SPT) Hazırlanması .....	35
2.4.	Hücre Canlılık Analizi (MTT Testi).....	35
2.5.	Apoptoz Analizi.....	35
2.6.	Hücre Döngüsü Analizi .....	36
2.7.	Mikroskop Aracılı Yöntemler.....	37
2.7.1.	Işık Mikroskobu.....	37
2.7.2.	Floresan Mikroskobu .....	37
2.8.	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time-PCR) Analizi. .	38
2.9.	İstatistiksel Analiz.....	40
<b>3.</b>	<b>SONUÇLAR.....</b>	<b>40</b>
3.1.	Hücre Canlılık Analizi.....	40
3.2.	Apoptoz Analizi.....	42
3.3.	Hücre Döngüsü Analizi .....	44
3.4.	DIOC6 Boyası.....	45
3.5.	Propidyum İyodür Boyası Ve Işık Mikroskobu.....	46
3.6.	Kantitatif PZR Analizi .....	48
<b>4.</b>	<b>TARTIŞMA.....</b>	<b>50</b>
	<b>REFERENSLAR.....</b>	<b>54</b>

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ABL</b>	Abelson Murin Lösemi Viral Onkogen Homologu
<b>AIF</b>	Apoptoz İndükleyici Faktör
<b>AMBRA1</b>	Beclin1 Tarafından Düzenlenen Otofajide Aktive Edici Molekül 1
<b>AP-1</b>	Aktivatör Protein 1
<b>APAF-1</b>	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör-1
<b>ATG</b>	Otofaji İle İlgili Gen
<b>ATP</b>	Adenozin Trifosfat
<b>BAK</b>	BCL-2 Antagonist Öldürücü
<b>BAX</b>	Bcl-2 İle İlişkili X Proteini
<b>BCL-2</b>	B-Hücre Lenfoma 2
<b>BCR</b>	Breakpoint Cluster Region-Kırılma Bölgesi
<b>BH</b>	Bcl-2 Homoloji
<b>BIF</b>	Endofilin B1
<b>BIR</b>	Bakulovirüs IAP Tekrarı
<b>B-RAF</b>	V-Raf Fare Sarkomu Viral Onkogen Homolog B1
<b>CAD</b>	Kaspazla Aktive Olan Deoksiribonükleaz
<b>CARD</b>	Kaspaz Bağlayıcı Domen
<b>cFLIP</b>	HücreSEL FLICE Benzeri İnhibe Edici Protein
<b>cIAP</b>	Apoptozun HücreSEL İnhibitörü
<b>c-Myc</b>	HücreSEL Myelositomatozis
<b>CYLD</b>	Klindromatozis lizin 63 Deubikitinaz
<b>DED</b>	Ölüm Etkili Domen
<b>DFE</b>	DNA Parçalanma Faktörü
<b>DIABLO</b>	Düşük P1'ya Sahip Doğrudan IAP Bağlama Proteini
<b>DIOC6</b>	3, 3'-Diheksiloksakarbosiyanin İyodür
<b>DISC</b>	Ölüm İndükleyici Sinyal Kompleksi

<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Dimetil Sülfoksit
<b>DNA</b>	Deoksiribonükleik Asit
<b>DR</b>	Ölüm Reseptörü
<b>ELK-1</b>	ETS Benzeri Protein-1
<b>EMT</b>	Epitelyal-Mezenkimal Geçiş
<b>ERK</b>	Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
<b>FADD</b>	Fas İlişkili Ölüm Domeni
<b>FASL</b>	Fas Ligandı
<b>FBS</b>	Fetal Sığır Serumumu
<b>FOS</b>	Frukto-Oligosakkaritler
<b>FPC</b>	Ailesel Pankreas Kanseri
<b>GAP</b>	GTPaz Aktive Edici Protein
<b>GDP</b>	Guanozin Difosfat
<b>GTP</b>	Guanozin Trifosfat
<b>GTPase</b>	Guanozin Trifosfataz
<b>HNPCC</b>	Kalıtsal Polipozis Olmayan Kolorektal Kanser
<b>HRAS</b>	Harvey Sıçan Sarkoma Viral Onkogeni
<b>HSP70</b>	Isı Şoku Proteinini 70
<b>HtrA2</b>	Yüksek Sıcaklık Toplama Protein A
<b>IAP</b>	Apoptoz İnhibitörü Protein
<b>ICAD</b>	Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz İnhibitörü
<b>IgH</b>	İmmüoglobulin Ağır Zincir
<b>IKK</b>	Nükleer Faktör Kappa-B Kinaz İnhibitörü
<b>IPMN</b>	İntraduktal Papiller Müsinöz Neoplazm
<b>KRAS</b>	Kirsten Sıçan Sarkoma Viral Onkogeni
<b>LC3</b>	Mikrotübüle Bağlı Protein 1 Hafif Zincir 3
<b>LET</b>	Doğrusal Enerji Transferi
<b>LOH</b>	Heterozigot Kaybı
<b>MAP</b>	Mitojenle Aktive Olan Protein
<b>MCN</b>	Müsinöz Kistik Neoplazm

<b>MLKL</b>	Karışık Soy Kinaz Domeni Benzeri
<b>MOMP</b>	Mitokondriyal Dış Zar Geçirgenliği
<b>mRNA</b>	Haberci Ribonükleik Asit
<b>mTOR</b>	Rapamisin Hedefi (Target Of Rapamycin)
<b>MTT</b>	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5-Difeniltetrazolyum Bromür
<b>NFκB</b>	Nükleer Faktör Kappa B
<b>N-Myc</b>	Nöroblastom Myc
<b>NRAS</b>	Nöroblastoma Sıçan Sarkoma Viral Onkogeni
<b>PanIN</b>	Pankreatik İntraepitelyal Neoplazi
<b>PBS</b>	Fosfat Tamponlu Tuz
<b>PDAC</b>	Pankreatik Duktal Adenokarsinom
<b>PDGF</b>	Platelet kaynaklı Büyüme Faktörü
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamin
<b>PI</b>	Propidyum İyodür
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3 Kinaz
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol-4, 5-Bifosfat
<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol-3, 4, 5-Trifosfat
<b>PS</b>	Fosfatidilserin
<b>PSA</b>	Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin
<b>PTEN</b>	Fosfataz Ve Tensin Homologu
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RAF</b>	Hızlandırılmış Fibrosarkoma
<b>RAS</b>	Sıçan Sarkoma Viral Onkogeni
<b>RB</b>	Retinoblastoma
<b>RHIM</b>	RIP Homotipik Etkileşim Motifi
<b>RIP</b>	Reseptör Etkileşimli Serin/Treonin Kinaz
<b>SMAC</b>	Kaspazların İkinci Mitokondri Kaynaklı Aktivatörü
<b>SPP</b>	Sodyum Pentaborat Pentahidrat
<b>SPT</b>	Sodyum Perborat Tetrahidrat
<b>tBID</b>	Kesik BID
<b>TLR</b>	Toll Benzeri Reseptör

<b>TM</b>	Transmembran Bağlanma Bölgesi
<b>TNF</b>	Tümör Nekrozis Faktör
<b>TNFR1</b>	Tümör Nekroz Faktör Reseptörü-1
<b>TP53</b>	Tümör Baskılayıcı Proteini p53
<b>TRADD</b>	TNF Reseptörü İle İlişkili Ölüm Domaini-2
<b>TRAF2</b>	TNF Reseptör İlişkili Faktör 2
<b>UBL</b>	Ubikuitin Benzeri Proteinler
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>UVRAG</b>	UV Radyasyon Direnci İle İlişkili Gen
<b>VPS</b>	Vakuoler Protein Sıralama
<b>XIAP</b>	X'e Bağlı Apoptoz İnhibitörü
<b>ZOL</b>	Zoledronik Asit

## TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2.1: qPZR Analizinde Kullanılan Primerler .....	39
Tablo 2.2: qPZR Koşulları.....	39



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Kanserin Özellikleri .....	3
Şekil 1.2. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2022 Yılında, Cinsiyete Göre On Kanser Türünün Yeni Vakaları Ve Ölümleri Tahmin Edilmiştir .....	4
Şekil 1.3. Normal Bir Hücrenin Tümöre Dönüştürülmesinde Yer Alan Adımlar .....	7
Şekil 1.4. RAS Onkogenlerinde Nokta Mutasyonu .....	8
Şekil 1.5. Otofaji Yolu İle Hücrenin Hayatta Kalması Ve Ölmesi .....	13
Şekil 1.6. Apoptozun Ana Yolları .....	21
Şekil 1.7. BCL-2 Protein Ailesi .....	24
Şekil 1.8. DSÖ Bölgelerine Ve Cinsiyete Göre 2020'de Yeni Pankreas Kanseri Vakalarının Ve Ölümünün Sayısına İlişkin İstatistikler .....	26
Şekil 1.9. Pankreatik İntraepitelyal Neoplazinin Erken Ve Geç Dönemlerinde Bozulan Moleküler Yol .....	28
Şekil 1.10. Gıda Ve İlaç İdaresi Tarafından Onaylanmış Bor İçeren İlaçlar .....	31
Şekil 3.1. Farklı SPT Konsantrasyonlarının 24 Saatte MIAPaCa-2 Pankreatik Hücre Hattının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi .....	41
Şekil 3.2. Farklı SPT Konsantrasyonlarının 48 Saatte MIAPaCa-2 Pankreatik Hücre Hattının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi .....	41
Şekil 3.3. Farklı SPT Konsantrasyonlarının 72 Saatte MIAPaCa-2 Pankreatik Hücre Hattının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi .....	42
Şekil 3.4. Farklı SPT Konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. Saatlerde MIAPaCa-2 Pankreatik Hücre Hattının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi .....	42
Şekil 3.5. 24 Saat SPT Tedavisi Uygulanan MIAPaCa-2 Pankreatik Kanser Hücre Hattındaki Canlı Hücre, Erken Apoptoz, Geç Apoptoz Ve Nekroz Oranlarının Grafiksel Gösterimi. .	43
Şekil 3.6. 24 Saat SPT Tedavisi Uygulanan MIAPaCa-2 Pankreatik Kanser Hücre Hattındaki Hücre Döngüsü Faz Dağılımı. ....	45

Şekil 3.7. 24 Saat SPT Tedavisi Uygulanan MIAPaCa-2 Pankreatik Kanser Hücre Hattında DIOC6 Boyası Sonucunda Elde Edilen Floresan Mikroskop Sonuçları. ....	46
Şekil 3.8. Işık Mikroskobu Altında 24 Saatlik SPT Tedavisine Maruz Kaldıktan Sonra MIAPaCa-2 Hücre Hattının Morfolojik Değişikliklerinin Ve PI Boyaması Sonucunda Floresan Mikroskobu Altında Apoptotik Hücrelerin Görüntülenmesi. ....	47
Şekil 3.9. MIAPaCa-2 Hücre Hattında 24 Saat SPT Tedavisine Maruz Kaldıktan Sonra DIOC6 Ve PI Boyaması Sonucunda Floresan Mikroskobu Altında Hücrelerin Görüntülenmesi.....	48
Şekil 3.10. 24 Saat SPT Tedavisi Uygulanan MIAPaCa-2 Pankreatik Kanser Hücre Hattındaki BAX, P53 ve Kaspaz 9 Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerindeki Etkisinin Grafiks gösterimi.....	49

# 1. GİRİŞ

## 1.1. KANSER TARİHİ

Kanser tarih öncesi çağlardan beri insanlığı etkilemiştir ve son yıllarda yaygınlığı önemli ölçüde artmıştır. Kanser ilk olarak MÖ 1500'e kadar uzanan Mısır ve Peru mumyalarında bulunmuştur (Faguet, 2015). Ayrıca, yaklaşık 2700 yıl önce Güney Sibirya'nın bozkırlarında yaşayan 40 ila 50 yaşlarındaki Kral Mahshush'un (Scythian king) vakası, kanserin yayılmasının belgelenmiş en eski bilimsel vakalarından biridir (Schultz v.d., 2007). “Kanser” kelmimesi yunanca karkinostan gelmektedir. Kanser terimi ülseri ve tedavi edilemez kitleleri (karsinom tümörleri) tanımlamak için, tıbbın babası olarak adlandırılan doktor Hipokrat tarafından kullanılmıştır (Sudhakar, 2009). Ayrıca “kanser” kelimesinin kökeni yengeç anlamına gelmektedir. Kelimenin bu anlam değişmesinin sebebi, Aetius'un meme kanseri bulunan şişmiş kan damarlarının yengeç biçimini taşıdığı şeklindeki gözlemidir (Faguet, 2015). Kanser çok faktörlü, çok aşamalı karmaşık bir süreç olarak tanımlanır (Lakshmi ve Janardhanankatab, 2018). Aynı zamanda, onkogenlerin aktivasyonuna ve tümör baskılayıcıların inaktivasyonuna neden olan deoksiribonükleik asitteki (DNA) bir mutasyonun yanı sıra normal gen ekspresyonunu düzenleyen epigenomun düzenlenmesindeki bir kusurun neden olduğu genetik bir hastalıktır (Katti v.d., 2022). Hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve çoğalması sonucu kitle oluşumu ile karakterizedir (Folkman ve Kalluri, 2004). Kanser, dünyanın tüm ülkelerinde önemli bir ölüm nedeni olarak sınıflandırılmakta ve kişinin yaşayabileceği yıl sayısının artmasının önünde bir engel olduğu düşünülmektedir (Bray v.d., 2021). Kanser, etkilenen dokuya göre karsinomlar, sarkomlar, lenfomalar, lösemiler ve adenomlar gibi çeşitli biçimlerde; etkilenen organa göre ise kolorektal kanser, akciğer kanseri, mide kanseri, serviks kanseri, mesane kanseri...vb gibi çeşitli biçimlerde sınıflandırılabilir (Mathur v.d., 2015).

## 1.2. TÜMÖR TIPLERİ

Tümörler iyi huylu ve kötü huylu olmak üzere iki ana kategoriye ayrılmaktadır (Sinha, 2018). Ayrıca her iki tip tümör de anormal hücrelerden kaynaklanmaktadır (Boutry v.d., 2022).

### **1.2.1. İyi Huylu Tümör**

İyi huylu tümörler, çevre dokuları istila etme veya vücudun diğer bölgelerine yayılma yeteneklerine sahip değildir. Rahim ve meme fibroidleri, kolon polipleri ve benler bazı iyi huylu tümörlere örneklerdir. Genellikle iyi huylu tümörler daha az zararlıdır (Sinha, 2018), ancak iyi huylu tümörler, iyi huylu kemik tümörleri gibi yapılara veya hayati organlara baskı yaparsa (Hakim v.d., 2015), hipofiz tümörleri gibi hormonal dengeyi bozarsa (Ezzat v.d., 2004) veya bağırsak adenomları gibi zamanla kötü huylu hale gelirse (Ismail v.d., 2008) zararlı olabilmektedir.

### **1.2.2. Kötü Huylu Tümör**

Kötü huylu tümörler, yakın dokuları istila etme veya vücudun diğer bölgelerine yayılma yeteneklerine sahip olmaları bakımından iyi huylu tümörlerden farklıdır. Örneğin meme dokusundaki meme kanseri erken tespit edilmezse lenf bezlerine yayılabilmekte ve yayıldıktan sonra vücudun diğer bölgelerine kemik veya karaciğer gibi hareket edebilmektedir (Sinha, 2018). Örneğin bazı tümörler hiçbir zaman metastaz yapmaz ve çoğu zaman sağlık sorunlarına neden olmaz. Buna rağmen kötü huylu tümörler olarak adlandırılır (Welch ve Black, 2010).

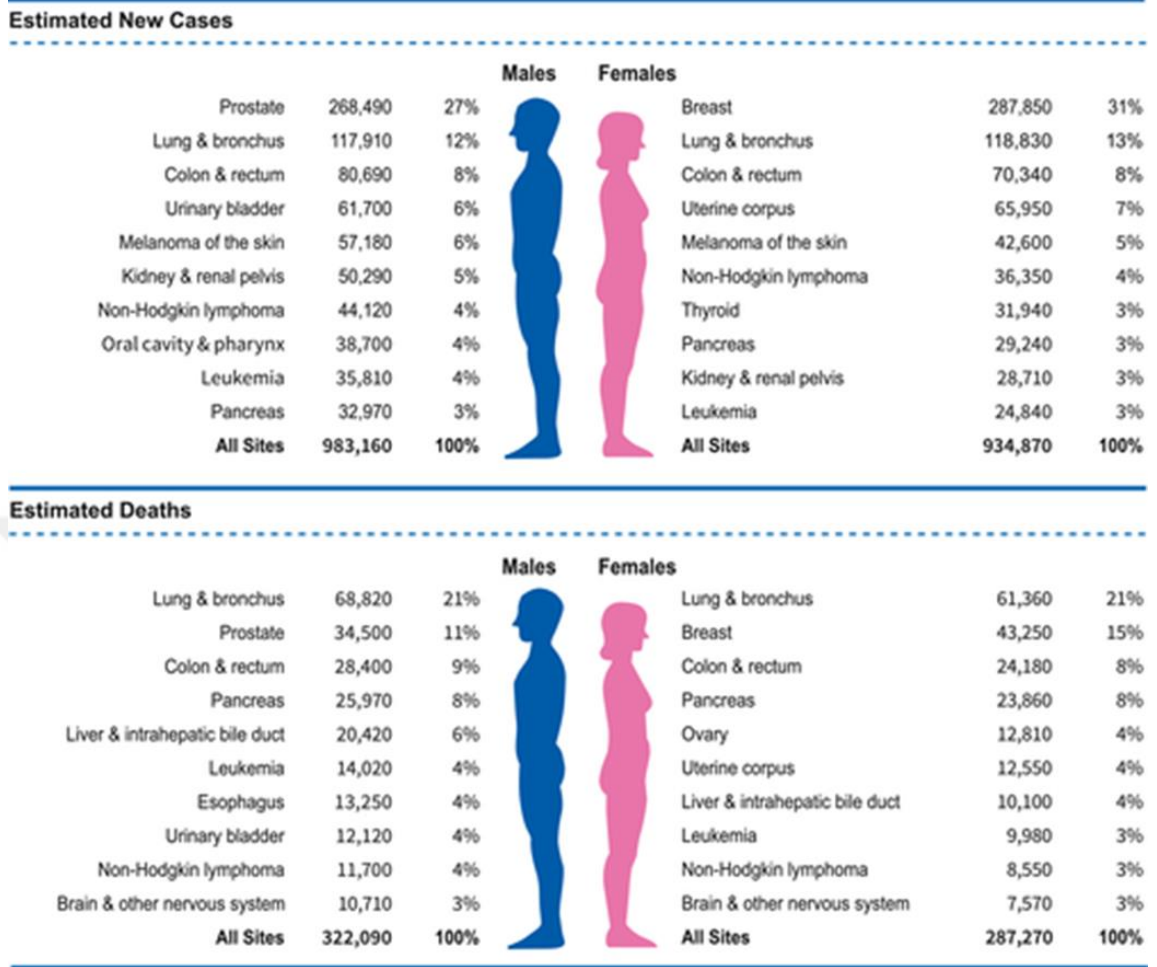
## **1.3. KANSERİN ÖZELLİKLERİ**

Kanser hücreleri bir dizi özellik ile karakterize edilir. 2000 yılında, Hanahan ve Weinberg bunlardan bazılarını öne sürmüştür: istila ve metastazın aktivasyonu, anjiyojenezin teşvik edilmesi, proliferatif sinyalleşmenin sürdürülmesi, büyüme inhibitörlerinden kaçınma, hücre ölümüne direnç ve replikasyon ölümsüzlüğü. 2011 yılında, enerji metabolizmasının yeniden programlanması, bağışıklık yıkımından kaçınılması, genetik dengesizlik ve tümörleri teşvik eden iltihaplanma gibi diğer yeni özellikler eklenmiştir (Hanahan ve Weinberg, 2011). 2022 yılında ise Hanahan üç yeni özellik daha öne sürmüştür: Fenotipik plastisitenin kilidini açmak, polimorfik mikrobiyomlar ve mutasyona uğramayan epigenetik tekrarlama. Ek olarak, Hanahan, yaşlanan hücrelerin tümör mikro ortamının önemli bileşenleri olarak dahil edilmesi gerektiğini belirtmiştir (Hanahan, 2022) (Şekil 1.1).



#### 1.4. KANSER İSTATİSTİKLERİ

Amerika Birleşik Devletleri'nde akciğer, meme ve kolorektal kanserlerin kadınlarda en yüksek kanser insidans oranlarına sahip olduğu görülürken; akciğer, prostat ve kolorektal kanserlerin ise erkeklerde en yüksek kanser insidansına sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 1.2.A). Kadınlar arasında meme kanseri en yüksek insidansı temsil etmektedir. Bununla birlikte, erkekler arasında prostat kanseri en yüksek insidansı temsil etmektedir. Şekil 1.2.B 'de, ölüm oranları ile ilgili olarak, akciğer, meme ve kolorektal kanserler kadınlarda en yüksek ölüm oranlarına yol açarken; erkeklerde en yüksek ölüm oranları akciğer, prostat ve kolorektal kanserlerde görülmektedir.



**Şekil 1.2.** Amerika Birleşik Devletleri'nde 2022 Yılında, Cinsiyete Göre On Kanser Türünün Yeni Vakaları Ve Ölümleri Tahmin Edilmiştir (Siegel v.d., 2022)

## 1.5. KANSERE NEDEN OLAN FAKTÖRLER

Kanserli insanlar iki kategoriye ayrılmaktadır, birinci kategori kansere yatkınlığı yüksek olanlar ve bunun nedeni genlerindeki doğuştan gelen bir mutasyondur. Diğer kategori ise genetik yatkınlığı yüksek olmamasına rağmen kansere neden olan somatik bir mutasyon kaynaklı olanlardır (Eggert, 2011). Doğal bir hücrenin kanserli hücreye dönüşmesinde iki temel faktör vardır: Çevresel faktörler ve genetik faktörler. Çevresel faktörler üç kategoriye ayrılmaktadır: Fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörler. Fiziksel faktörlere iyonize radyasyon ve ultraviyole örnek gösterilirken; kimyasal faktörlere beno-pyrene, heterocyclic amine ve ethey alcohol örnek olarak gösterilebilir (Saeki ve Sugimachi, 2001).

### **1.5.1. Çevresel Faktörler**

#### *1.5.1.1. Fiziksel faktörler*

Ultraviyole (UV) radyasyon kaynakları güneş, güneş lambaları ve bronzlaşma kabinleridir (Parsa, 2012). UV ışınlarına maruz kalındığında, DNA baz çiftleri değiştirilir ve bu da pirimidin dimerlerinin oluşumuna yol açar. UV radyasyonuna maruz kalma cilt kanseri ile yakından ilişkilidir. Cilt kanseri Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın, Japonya'da ise en az görülen kanserdir (Saeki ve Sugimachi, 2001).

İyonlaştırıcı radyasyonun ana kaynakları, radyoaktif serpinti, radon gazı ve X-ışınları gibi uzaydan kaynaklanır (Parsa, 2012). Gama ışınları ve X-ışınları gibi düşük doğrusal enerji transferine (LET) maruz kalınması, tek iplikli DNA'nın kırılmasına neden olur (McGrath ve Williams, 1966). Ayrıca iyonlaştırıcı radyasyona maruziyet; akciğer, miyelopoietik doku ve tiroid dahil olmak üzere bir grup kanserle yakından ilişkilidir (Saeki ve Sugimachi, 2001).

#### *1.5.1.2. Kimyasal faktörler*

Benzopiren, p53 gibi tümör baskılayıcı gende nokta mutasyonlarına neden olan kimyasal bir karsinojendir (Denissenko v.d., 1996). Tütün, bu kanserojenin tabaco'da bulunması akciğer, baş ve boyun, mesane ve özofagus kanseri ile ilişkilendirilmiştir. Akciğer kanseri, Japonya'da erkeklerde kansere bağlı ölümlerin en yaygın nedenidir (Saeki ve Sugimachi, 2001). Kanserojen heterosiklik amin, et veya balık yüksek sıcaklıklarda pişirildiğinde üretilir ve meme (Zheng v.d., 1998) ve kolon kanserleri (De Verdier v.d., 1991) ile bağlantılıdır. Kanserojen etil alkol alkolde bulunur (Saeki ve Sugimachi, 2001). Bu nedenle alkol tüketimi, kadınlarda ağız boşluğu, yutak, yemek borusu, karaciğer, kolon, rektum ve meme kanseri dahil olmak üzere bir dizi kanserle ilişkilidir (Boyle v.d., 2003).

#### *1.5.1.3. Biyolojik faktörler*

Viral genlerin konak DNA'ya dahil edilmesiyle oluşur ve böylece viral gen hücresel DNA'nın bir parçası olur. Bunun sonucunda homeostaz bozulmakta ve kontrolsüz hücre çoğalması meydana gelmektedir (Lakshmi ve Janardhanankatab, 2018). Bazı virüsler kansere neden olabilmektedir. Bunun en önemli örnekleri şunlardır: papilloma virüsü rahim ağzı kanserine, Hepatit B ve C virüslerinin her ikisi de karaciğer kanserine, T-lenfotrofik virüs tip 1 ise lenfoma ve lösemiye sebep olmaktadır (Parsa, 2012). Ayrıca bakteriler de

kansere neden olabilir. Bunlardan en önemlisi mide kanserine neden olabilen *Helicobacter pylori*'dir (Mager, 2006).

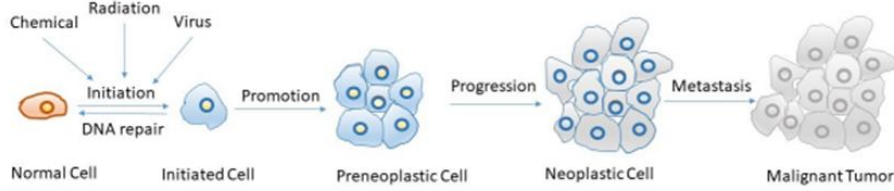
### **1.5.2. Genetik Faktörler**

Bazen kanser, ailesel neoplastik hastalıklar olarak adlandırılan belirli ailelerde yoğunlaşmaktadır. Bu hastalıkların nedenleri, kalıtsal neoplastik sendromun ortaya çıkmasından sorumlu olan belirli genlerdeki (DNA onarım genleri, hücre döngüsü genleri gibi) bir kusurdur (Saeki ve Sugimachi, 2001). Bu genetik sendromların bazı örnekleri şunlardır: kalıtsal polipozis olmayan kolorektal kanser (HNPCC) ve Li-Fraumeni sendromudur. HNPCC, DNA yanlış eşleşme tamir genlerinde anormallikler olan bireylerde ortaya çıkan kalıtsal bir neoplastik hastalıktır. Bundan muzdarip hastalarda rahim, böbrekler, mesane, yumurtalıklar, kolon, beyin ve pankreas kanseri gelişme riski artmaktadır (Parsa, 2012). Li-fraumeni kalıtsal kanser sendromuna, p53 genindeki bir germ hattı mutasyonu neden olmaktadır. Bu nedenle, bu sendrom meme kanseri, çocukluk çağı sarkomu ve diğer tümör riskinde artışa neden olabilmektedir (Lakshmi ve Janardhanan, 2018).

### **1.6. KARSİNOGENEZ**

Karsinogenez, normal bir hücrenin kanserli bir hücreye dönüştüğü çok adımlı bir süreç olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle, karsinogenezin başlangıç, gelişme, ilerleme ve malignite aşamaları vardır. İlk aşama (Başlama), normal bir hücre hem endojen hem de eksojen faktörler olabilen kanserojenlere maruz kaldığında başlar. Kanserojenler doğrudan veya dolaylı olarak DNA hasarına neden olabilir. Ek olarak, DNA hasarının yaygın bir yolu, kimyasal kanserojen ile DNA arasında bir DNA katım şeklindedir. Bir DNA katımı tanınır ve yok edilir, ancak kaçarsa varlığını sürdürebilir ve çoğaltabilir. Gelişme, tek başlatıcı hücrelerin sayıyı bölmek ve genişletmek için uyarıldığı karsinogenezin ikinci aşamasını temsil eder. Burada, promotörler tümör oluşumunu başlatmaz, ancak süreci hızlandırmaya yardımcı olur (LiberTexts, 2020). Gelişme sırasında, başlatıcı hücreler pre-neoplastik hücreler oluşturmak üzere genişler ve tümörler ortaya çıkar (Lakshmi ve Janardhanan, 2018). İlerleme aşamasında, malign transformasyon meydana gelir, yani pre-neoplastik hücre, malign bir fenotip eksprese eden bir hücreye dönüşür. Bu dönüşüm, proto-onkogenlerin aktive olduğu ve tümör baskılayıcı genlerin inaktive olduğu kanserojenlere sürekli maruz kalma sonucu ortaya çıkan çoklu genetik hasarların ortaya çıkmasına neden

olur. Kontrolsüz büyüme ve genetik instabilite, malign hücrelerin önemli özelliklerindedir (LiberTexts, 2020) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Normal Bir Hücrenin Tümöre Dönüştürülmesinde Yer Alan Adımlar (LiberTexts, 2020)

## 1.7. KANSERİN GENETİĞİ

Neoplazinin gelişimi için moleküler hedeflerle bağlantılı üç ana gen sınıfı; proto-onkogenler (Temin, 1974), hücrel onkogenler (Garrett, 1986) ve tümör baskılayıcı genlerdir (Barrett, 1993).

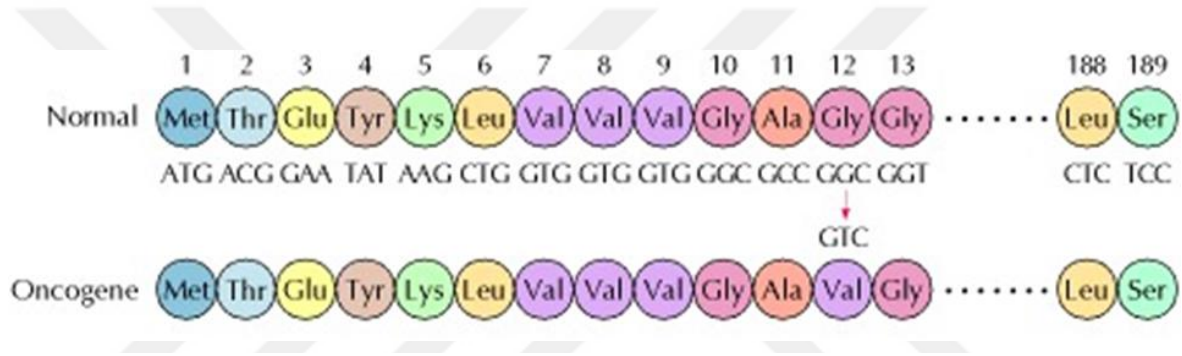
### 1.7.1. Hücrel Onkogenler

Proto-onkogenler, hücreler için önemli olan düzenleyici genlerdir ve hücre proliferasyonunu kontrol eden sinyal iletim yollarında işlev gören proteinleri kodlarlar. Ancak mutasyon ve/veya artan gen ekspresyonu nedeniyle, onkogene dönüşebilirler. Onkogenler, belirli koşullar altında malign bir dönüşüme neden olma yeteneğine sahiptir (Kontomanolis v.d., 2020).

#### 1.7.1.1. Onkojenik aktivasyon

Onkojenik aktivasyona nokta mutasyon, translokasyon ve amplifikasyon neden olur. Nokta mutasyonları ile onkogen aktivasyonu: kirsten sıçan sarkoma viral onkogeni (KRAS), harvey RAS (HRAS) ve nöroblastoma RAS (NRAS) olmak üzere üç farklı RAS formu vardır. RAS geni, hücre yüzeyi reseptörlerini hücre içi efektör yollara bağlayan dönüştürücüler olarak hareket eden guanin-nükleotit bağlayıcı proteinleri kodlar. Burada RAS proteinleri iki biçimde bulunur: aktif durum formu (guanozin trifosfat'ye(GTP) bağlı) ve inaktif durum formu (guanozin difosfat 'ye(GDP) bağlı). RAS proteinlerinin aktivitesi, bağlı GTP'nin normal RAS'a hidrolizi üzerinde hareket eden GTPaz aktive edici proteinler (GAP) tarafından kontrol edilir (Kontomanolis v.d., 2020). RAS onkogenleri, kritik pozisyonlarda (12, 13 ve 61. kodon) tekli amino asitlerin yer değiştirmesine yol açan nokta

mutasyonları nedeniyle proto-onkogenlerden kaynaklanır (Cooper,2000). Nokta mutasyonları meydana geldiğinde, hücre içi GTPaz aktivitesi azalır çünkü artık GAP proteinine yanıt vermezler, bu nedenle RAS proteinleri aktif (GTP'ye bağlı) bir durumda kalır (Lakshmi ve Janardhanan,2018). Örneğin, çeşitli RAS izoformlarındaki mutasyonlar, pankreas (Almoguera v.d., 1988), akciğer (Rodenhuis v.d., 1987), tiroid kanseri ve akut miyeloid lösemi (Bos v.d., 1989) dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde görülmektedir. Kodon 12'deki tek bir nükleotid değişikliği, amino asit GGC'yi (Gly) GTC'ye (Val) değiştirerek, insan mesane kanserinde onkogen HRAS'nin ortaya çıkmasına sebep olur (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. RAS Onkogenlerinde Nokta Mutasyonu (Cooper, 2000)

Translokasyon ile onkojenik aktivasyon: Burkitt lenfomalarında hücrel myelositomatozis (c-Myc) proto-onkogeni kromozom 8'den kromozom 14 üzerindeki immüoglobulin ağır zincir lokusuna (IgH) yer değiştirir ve böylece anormal c-Myc ekspresyonuna neden olur (Woroniecka v.d., 2022). Kronik miyeloid lösemide 9. ve 22. kromozomların uçları kırılır ve her iki kromozom arasında değişim olur. 22. kromozom üzerindeki kırılma noktası küme bölgesi (BCR) geni ile 9. kromozom üzerindeki abelson murin lösemi viral onkojen homologu (ABL) geninin füzyonu sonucunda 22. kromozom onkogen görevi görür ve anormal bir proteini kodlamaya başlar (Liu v.d., 2022).

Amplifikasyon ile onkogen aktivasyonu: Aynı genin kopyaları oluşturulur. Örneğin, nöroblastom Myc'nin (N-Myc) amplifiye kopyaları sıklıkla agresif, hızlı büyüyen tümörlerde bulunur. Bu da N-Myc amplifikasyonunun artan malignite ile nöroblastom ilerlemesi arasında korelasyon olduğunu gösterir (Nenclares ve Harrington, 2020).

### 1.7.1.2. Onkogenler ve sinyal iletimi

Onkogenler; büyüme faktörlerini, büyüme faktörü reseptörlerini ve hücre içi sinyal moleküllerini içerir. Büyüme faktörlerinin onkogen gibi davranmasının nedeni, anormal ekspresyonlarından kaynaklanmaktadır. Yani kanser hücresi kendi başına benzer reseptörlere yanıt veren büyüme faktörleri üretir ve böylece otokrin proliferasyonunu uyarır. Çoğu büyüme faktörü reseptörü, protein tirozin kinazlardır. Örneğin, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) reseptörü, PDGF reseptörünün normal ekstraselüler bağlanma bölgesi Tel (ETS varyant transkripsiyon faktörü 6)'in amino terminal dizileriyle değiştirilerek bir onkogen proteinine dönüştürülebilir. Bu diziler, büyüme faktörü bağlanmasının yokluğunda kaynaşır ve onkogen protein kinazın yapıcı aktivasyonuna yol açar. Hücre içi sinyal molekülleri (RAS, hızlandırılmış fibrosarkoma (RAF)) onkogen proteinleri olarak da işlev görebilir. Örneğin, RAS geni nokta mutasyonları yoluyla bir onkogene dönüştürülür, bu da RAS proteinlerini GTP'ye bağlı aktif durumda kalmaları için etkiler. Sonuç olarak, mitojenle aktive olan protein (MAP) kinaz yolunun aktivasyonu sürekli olarak gerçekleşecektir. Ayrıca RAF geninde, RAF proteininin proto-onkogen proteinlerinin aktivitesini kontrol eden amino-terminal düzenleyici bağlanma bölgesi silinerek ve viral Gag dizileri ile değiştirilerek bir onkogene dönüştürülebilir. Sonuç olarak, MAP kinazın sürekli aktivasyonuna yol açan RAF protein kinazın düzensiz bir aktivitesi vardır (Cooper, 2000). V-RAF fare sarkomu viral onkogen homolog B1(B-RAF) proteini birçok kanser türünde aktive olur (Gray-Schopfer v.d., 2007). B-RAF, melanomların %50 ila %70'inde mutasyona uğrar (Davies v.d., 2002). MAP kinaz yolu sonunda transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna ve gen ekspresyonundaki değişikliklere yol açar. Örneğin, FOS proto-onkojenin transkripsiyonu, ETS benzeri protein-1(Elk-1)'in ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK)/MAP kinaz tarafından fosforilasyonunun bir sonucu olarak indüklenir. Aktivatör protein1'in ( AP-1) yapıcı aktivitesine yol açan frukto-oligosakkaritler (FOS) proteinlerinin veya Jun onkogenlerinin düzensiz ekspresyonu, anormal hücre proliferasyonunu yönlendirmek için yeterlidir, bu da hücre transformasyonu ile sonuçlanır (Cooper, 2000).

### 1.7.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genler, hücre çoğalmasını ve tümör ilerlemesini önleyen genlerdir. Fakat ortaya çıkan bir mutasyon ile işlevini tamamen kaybeder veya işlevini değiştirir. Böylece anormal hücre büyümesi meydana gelir (Nenclares ve Harrington, 2020).

#### 1.7.2.1. Retinoblastoma tümör baskılayıcı/supresör gen

Retinoblastoma (RB) tanımlanan ve klonlanan ilk tümör baskılayıcı genidir. Retinoblastoma tümör baskılayıcı genler, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve DNA sentezinde yer alan genlerin transkripsiyon sayısını baskılayarak G1 fazı restriksiyon noktasının ötesinde ilerlemeyi engelleme potansiyeline sahiptir (Cooper, 2000). Bir G1 kontrol noktası görevi görmeyen yanı sıra, embriyonik gelişim sırasında ve yetişkin dokularda hücrelerel farklılaşmayı kontrol eder, apoptozu düzenler ve kromozomal stabiliteyi korurlar (Dannenbergen v.d., 2006). RB kaybı, nadir görülen çocukluk kanserlerine ve ayrıca yaygın yetişkin tümörlerine neden olabilir. Kalıtsal retinoblastoma, germline kalıtsal mutasyon ve somatik mutasyon yoluyla RB'nin iki alelinin kaybından kaynaklanırken; sporadik retinoblastomada, iki alelin kaybı ancak iki somatik mutasyondan kaynaklanır (Cooper, 2000). Örneğin RB genini içeren kromozomal lokusun (13q14) silinmesi retinoblastomalara yol açar (Lakshmi ve Janardhanan, 2018). Ayrıca RB kaybı, yetişkinlerde osteosarkom (Deshpande v.d., 2006), akciğer, mesane ve meme (Engeland, 2022) karsinomunu artırabilir.

#### 1.7.2.2. P53

p53, 17. kromozomun kısa kolunda bulunan insan tümör baskılayıcı proteini p53 (TP53) geni tarafından kodlanır (Levine ve Oren, 2009) ve ikinci tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır. Hücre döngüsünün ilerlemesini ve apoptozu düzenler (Vousden ve Prives, 2009). Örneğin; p53, DNA hasarına yanıt olarak CD95'in ekspresyonunu yukarı yönde regüle ederek dışsal yolu düzenleyebilir (Bennett v.d., 1998). Ek olarak, birçok kanser türünde (yaklaşık %50) p53 geninde mutasyonlar olduğu tespit edilmiştir (Lakshmi ve Janardhanan, 2018).

#### 1.7.2.3. Fosfatase ve tensin homologu tümör baskılayıcı gen

PTEN, 1997 yılında keşfedilmiştir (Myers v.d., 1997). Fosfatase ve tensin homologu (PTEN) tümör baskılayıcı gen, 10q23.31 kromozom bölgesinde lokalize olmuş, 403 amino

asitten oluşan lipid ve protein fosfataz fonksiyonuna sahip PTEN proteinini kodlamaktadır (He v.d., 2021). Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trifosfat (PIP3), sınıf I fosfatidilinositol -3-kinaz (PI3K) lipid ürünüdür (Maehama ve Dixon, 1998). PTEN proteini, PIP3'ü defosforile ederek fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PIP2) üreten bir lipid fosfatazdır. PTEN, ürününü parçalayarak, onkogenler olarak hareket edebilen PI3K ve AKT'nin aktivitelerine karşı çıkar ve hücrenin hayatta kalmasını destekler. Bu nedenle, tümör baskılayıcı proteinin etkisizleştirilmesi veya kaybı, artan PIP3 seviyelerine, AKT aktivasyonuna ve apoptozun inhibisyonuna ve dolayısıyla tümörün gelişimine yol açar (Chai v.d., 2022). Örneğin; mutasyon, heterozigot kaybı (LOH) ve epigenetik mekanizmalar dahil olmak üzere genetik değişikliklerin bir kombinasyonu yoluyla bir tümör baskılayıcı genin kaybı, meme kanseri de dahil olmak üzere insan kanserlerinin %50'sine yol açmaktadır (Dahia, 2000).

## **1.8. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI**

Hücre ölümü, dokuların dengesini korumak için önemlidir (Edison v.d., 2012). Hücre ölümü, otofaji, programlanmış hücre ölümü ve nekroz olmak üzere üç farklı mekanizma ile gerçekleşir.

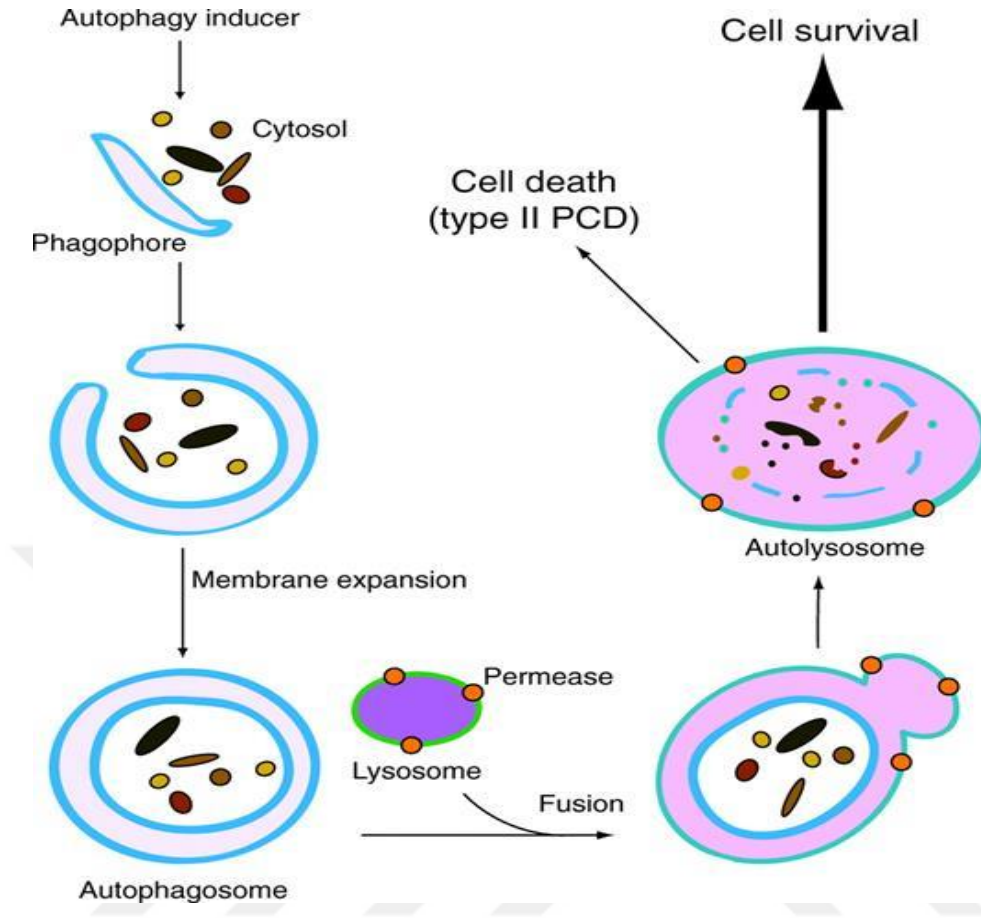
### **1.8.1. Otofaji**

Ökaryotik hücrelerde, proteinlerin (ubikuitin-proteazom yolu), lipidlerin, ribonükleik asitlerin ve şekerlerin özel sitoplazmik enzimler tarafından hidrolize edildiği spesifik degradasyon meydana gelir (Juhász ve Neufeld, 2006). Bununla birlikte, spesifik olmayan maddelerin degradasyonu otofaji ile gerçekleşir (De Duve ve Wattiaux, 1966). Böylece hücrel homeostazi sağlanır. Yunanca "kendi kendini yemek" anlamına gelen "otofaji" terimi, Christian de Duve ve Robert Wattiaux tarafından 40 yılı aşkın bir süre önce keşfedilmiş ve bu büyük ölçüde pankreas hormonu (glukagon) enjekte edilen fareler üzerinden gerçekleşen deneylerle tespit edilmiştir. Farelerin karaciğerinde lizozomların ortaya çıkması ile temsil edilmiştir (Deter ve De Duve, 1967). Otofaji, protein homeostazının sürdürülmesinden ve hasarlı organellerin seçici olarak uzaklaştırılmasıyla uygun organel fonksiyonunun sürdürülmesinden sorumlu katabolik bir süreçtir. Besin azlığı, oksidatif stres, genotoksik stres ve organik stres gibi çeşitli stres ortamlarında indüklenmektedir (Kroemer v.d.,2010). Otofaji ile ilgili genler (ATG'ler), otofajinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu genler ilk olarak mayada keşfedilmiştir. Bu genlerin çoğunun daha yüksek ökaryotik canlılarda korunduğu bulunmuştur (Glick v.d., 2010). Ek olarak, otofajinin

hücrel gelişim ve farklılaşmada çeşitli rolleri vardır (Levine ve Klionsky, 2004). Otofaji süreci ayrıca bağışıklıkta ve mikrobiyal invazyona karşı savunmada rol oynar (Deretic ve Levine, 2009). Tip II programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen otofaji (Levine ve Yuan, 2005). kanser ve nörodejeneratif bozukluklar dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklarda rol oynar (Mizushima v.d., 2008). Otofaji üç farklı yolda gerçekleşebilir: şaperon aracılı otofaji (ısı şoku proteini 70 (HSP70) gibi, ara şaperon ligand proteinlerinin katılımıyla), mikrootofaji (lizozomlar tarafından küçük sitoplazmik yapıların doğrudan yutulması) ve makrootofaji (sitoplazmik bileşenlerin otofagozomda tutulması ve daha sonra lizozomlar tarafından parçalanması) (Das v.d., 2020).

#### *1.8.1.1. Makrootofaji Mizushima, 2010.*

Bu süreç, protein kümeleri ve organeller gibi sitoplazmik materyallerin fagofor tarafından toplandığı bir otofaji uyarıcısının varlığında başlar (Levine ve Yuan, 2005). Bu, hilal şeklinde çift katmanlı bir zar olarak tanımlanabilecek ön-otofagozomal zarın yapısıdır (Mizushima v.d., 2011). Ardından fagofor zarı genişler ve fagoforun kenarları otofagozomu oluşturmak üzere birleşir. Otofagozom oluştuğunda kargo memelilerde lizozoma veya maya işlevsel olarak ilgili vakuole iletmelidir. Otofagozomun dış zarı, lizozomal/vakuolar zar ile kaynaşır. Memelilerde bu füzyon, bir otolizozomun üretilmesine yol açar (Levine ve Yuan, 2005). Ancak mayalarda ve bitkilerde, vakuolün nispeten büyük boyutu nedeniyle, bu füzyon, lümende otofajik bir cisim oluşumuna yol açar (Devenish ve Klionsky, 2012). Ardından, kapalı kargo asit hidrolaz ile ayrıştırılır. Bileşen parçaları daha sonra protein sentezi veya adenosin trifosfat (ATP) üretimi için kullanılabilen geçirgen zarlar yoluyla sitozole geri taşınır (Levine ve Yuan, 2005) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Otofaji Yolu İle Hücrenin Hayatta Kalması Ve Ölmesi (Chen ve Klionsky, 2011)

#### 1.8.1.2. Makrotofaji aşamaları

- İndüksiyon
- Nükleasyon
- Uzama
- Otofagozom tamamlama ve füzyon (Parzych ve Klionsky, 2014).

**İndüksiyon:** Besin durumu, rapamisin hedefi (target of rapamycin) (TOR) ailesi tarafından düzenlenen otofaji adı verilen hücrel bir yanıtla düzenlenir (Jacinto v.d., 2003). TOR, anabolik süreçleri aktive ederek ve otofaji gibi katabolik süreçleri inhibe ederek hücre büyümesini düzenleyen bir serin/treonin kinazdır (Wullschleger v.d., 2006). TOR geni; bitkiler, mayalar ve memeliler gibi her ökaryotik genomda bulunmaktadır (Crespo v.d.,

2005). mTOR, işlevsel olarak farklı iki protein kompleksi oluşturur. Bunlar; mTOR kompleksi 1 ve mTOR kompleksi 2'dir (Hsu v.d., 2011). mTOR1, otofaji gibi katabolik süreçlerin inhibe edilmesinde rol oynar (Rabinowitz ve White, 2010). Mayada, besin yönünden zengin koşullar altında TORC1 aktiftir ve ATG13, TORC1 tarafından yüksek oranda fosforile edilirken bu durum Atg1'nin ATG17, ATG31 ve ATG29'a bağlı olan ATG13 ile etkileşime girmesini engeller. Sonuç olarak, otofaji süreci engellenir. Açlık koşulları altında TORC1 inaktive olur ve ATG13 artık TORC1 tarafından fosforile olmaz. Bununla birlikte, ATG1 kendini fosforile eder ve ATG17, ATG31 ve ATG29'a bağlanan ATG13'e bağlanır ve böylece otofajiyi uyarır (Kamada v.d., 2010).

**Nükleasyon:** PI3-Kinazlar, katalitik alt birimlerin yapısına göre üç sınıfa ayrılır. Hücre içi zar trafiğinde sadece sınıf III PI3-Kinaz yer alır (Vanhaesebroeck v.d., 2010). Sınıf III PI3K kompleksi otofaji sırasında fagofor (veya bir izolasyon zarı) oluşumunda önemli bir rol oynar (Pyo v.d., 2012).

Maya hücrelerinde (*Saccharomyces cerevisiae*) sadece sınıf III PI3-Kinazın vakuoler protein sıralama (VPS)34'ü vardır (Burman ve Ktistakis, 2010). VPS34 iki farklı kompleks oluşturur; Tip 1 kompleksi ve Tip 2 kompleksi. Tip 1 kompleksi, otofajide yer alan VPS34, VPS15, ATG6/VPS30 ve ATG14'ten oluşur (Itakura v.d., 2008). Ayrıca memeli sınıfı III PI3K otofaji süreci için önemlidir. Memeli sınıf III PI3-Kinaz (VPS34) kompleksi, BECLIN1, ATG14L, UV radyasyon direnci ile ilişkili gen (UVRAG) (Simonsen v.d., 2009), endofilin B1(BİF) (Takahashi d.v., 2007) ve BECLIN1 tarafından düzenlenen otofajide aktive edici molekül 1(AMBRA1)'den oluşur (Maria Fimia v.d., 2007). Otofajinin düzenleyicileri olarak kabul edilen bazı proteinler vardır. Örneğin B-hücre lenfoma 2 (BCL-2) negatif düzenleyicidir. BCL-2, BECLIN-1'in VPS34 ile etkileşimini bozan BECLIN-1'e bağlanır, böylece otofajiyi inhibe eder (Maiuri v.d., 2007). Ayrıca pozitif olarak da düzenlenebilir. Örneğin; BECLIN-1 ile doğrudan etkileşime giren AMBRA1 (Maria Fimia v.d., 2007) ve UVRAG (Liang v.d., 2006) proteinleri, otofajinin teşvik edilmesine yol açar.

**Uzama:** Hem mayalar hem de memeliler, fagoforların genişlemesine katkıda bulunan ubiquitin benzeri proteinleri (UBL) içeren iki konjugasyon sistemine sahiptir. İlki ATG12-ATG5-ATG16 konjugasyon sistemi, ikincisi ise mikrotübüle bağlı protein 1 hafif zincir 3(LC3) konjugasyon sistemidir (Parzych ve Klionsky, 2014).

*ATG5-ATG16 konjugasyon sisteminde;* ATG12, ATG5'e kovalent olarak konjuge edilir. Bu bağlantı, ATG7 (bir E1 enzimi) ve ATG10'un (bir E2 enzimi) varlığına bağlıdır. Konjugasyon oluşumundan sonra ATG16, ATG5 yoluyla konjugasyona bağlanır ve daha büyük bir kompleks oluşturmak için dimerize olur (Parzych ve Klionsky, 2014). Kompleks, fagofor zarının dış yüzeyine yerleşir ve zar uzayabilirliğini artırır ancak otofagozom tamamlandığında zardan ayrılır (Mizushima v.d., 2003).

*LC3 konjugasyon sistemi:* Memeli LC3, ubikuitin benzeri bir moleküldür ve LC3'ün mayada homolojisi ATG8'dir (He v.d, 2003). Başlangıçta konjugasyon yolu translasyonla başlar, ardından LC3'ün proteaz Atg4 tarafından bölünmesi gelir. Sonuç olarak, konjugasyon için uygun bir C-terminal glisini açığa çıkaran LC3-1 üretilir. LC3-1'in açığa çıkan glisini, ATG7 (bir E1-Benzeri aktivite), ATG3 (bir E2-Benzeri aktivite) ve ATG12-ATG5-ATG16L1 (E3-Benzeri ligaz aktivitesi) tarafından lipid fosfatidiletanolamin (PE)'ye konjuge edilir ve böylelikle bir LC3-II üretilir (Parzych ve Klionsky, 2014). LC3-II oluştuğunda, fagoforun hem dış hem de iç zarının genişlemesine katkıda bulunur (Weidberg v.d., 2011). ATG8'in PE'ye konjugasyonu geri dönüşümlüdür, çünkü LC3-II daha sonra LC3'ü serbest bırakmak için ATG4 tarafından parçalanabilir (Kirisako v.d., 2000) .

**Otofagozom tamamlama ve füzyon:** Otofagozom form tamamlandığında, bir otolizozom oluşturmak üzere bir endozom ve/veya lizozom ile kaynaşmak üzere transfer edilir (Monastyrska v.d., 2009). Guanozin trifosfataz (GTPase) RAB7, lizozomlarla membran füzyonunu düzenleyebilir (Jager v.d., 2004).

### *1.8.1.3.Otofaji ve kanser ilişkisi*

Meme, yumurtalık ve prostat kanserlerinin Beclin-1'in monomerik delesyonlarına sahip olduğu gösterilmiştir. Bu da bazı kanser biyologlarının otofajinin tümör baskılayıcı özelliklere sahip olduğuna inanmalarına yol açmıştır (Liang v.d., 1999). Ayrıca Hanahan ve diğerleri otofajinin, bağımsız veya apoptoz ile uyum içinde hareket edebilen tümör oluşumuna bir engel olarak önemini vurgulanmıştır. Buna karşılık, otofaji, besin açlığı, radyoterapi ve kemoterapinin toksik etkileri dahil olmak üzere çeşitli koşullar altında kanser hücreleri üzerinde koruyucu bir etkiye sahiptir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Ek olarak, onkogen K-RAS, ATG7 ve ATG5'in yüksek haberci ribonükleik asit (mRNA) seviyelerine sahip olduğu insan meme kanseri hücresinde tespit edilmiş ve bu genler inhibe edildiğinde, hücre büyümesi ve tümör oluşumunun inhibe olduğu gösterilmiştir (kim v.d., 2011). Ayrıca

Tan ve arkadaşları sayesinde üç farklı insan kanser hücre hattında hipoksik tümör bölgelerinde otofajinin arttığı gözlenmiştir (Tan v.d., 2016). Otofaji genetik veya farmakolojik olarak engellendiğinde hücre büyümesinin durduğu (Yang v.d, 2011) ve BECLIN1'in yıkılmasının kolon kanserinde epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT)'nin baskılanmasına yol açtığı gözlemlenmiştir (Shen v.d, 2018). Bu nedenle otofaji, kansere karşı etkili bir terapötik hedef olan yeni bir kanser belirtecidir (Ravi v.d., 2022).

### **1.8.2. Nekroz**

Nekroz terimi, patolojik bir süreç (Ruffolo, 1964), normal gelişimle ilişkili olmayan bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Khalid ve Azimpouran, 2022). Nekroz terimi, bir organizmada ölü doku veya hücrelerin varlığına atıfta bulunmak için kullanılmıştır (Levin, 1998). Bu süreç, tesadüfi ve programlanmamış bir hücre ölümü türü olarak tanımlanmıştır (Wu v.d.,2012). Aynı zamanda komşu hücreler de dahil olmak üzere çok sayıda hücreyi etkileyen kontrolsüz bir süreçtir (Elmore, 2007). Nekroza genellikle ısı, ozmotik şok, mekanik stres, donma çözme ve yüksek konsantrasyonlarda hidrojen peroksit gibi şiddetli fizikokimyasal stres neden olur (Escobar v.d., 2015). Hipoksi, biyolojik faktörler ve immün reaksiyonlar da nekrozu tetikleyebilmektedir. Nekrotik hücre, sitoplazmik vakuollerin oluşumu (Khalid ve Azimpouran, 2022), sitoplazmanın artan şeffaflığı ve nükleustaki ince değişiklikler dahil olmak üzere bir dizi karakteristik morfolojik değişikliklerle karakterize edilir. Bunların arasında kromatin yoğunlaşması, düzensiz DNA parçalanması, nükleer zarın genişlemesi ve nekrotik hücrede organellerin şişmesi, hücrelerin şişmesi (onkoz) ve zar bütünlüğünün kaybı vardır (Vandenabeele v.d., 2010). Hücre zarı bütünlüğünün kaybı, nekrotik hücrenin sitoplazmik içeriğinin çevre dokulara salınmasına neden olur ve bu da daha sonra bir enflamatuar yanıtı tetikler (Elmore, 2007). Fagositik apoptotik hücrelerin yokluğundan dolayı apoptotik hücrelerin temizlenememesi, birincil nekrozun birçok özelliğini paylaşan ikincil nekrozla sonuçlanır (Krysko v.d., 2008). Ayrıca birkaç otoimmün hastalık ile de ilişkilidir (Green, 2011).

#### *1.8.2.1.Nekroptoz.*

1988'de Luster ve meslektaşları, tümör nekrozis faktör (TNF)'nin nekroza neden olabileceğini göstermiştir (Laster v.d.,1988). Toll benzeri reseptör (TLR3) agonisti (He v.d., 2011), apoptozun hücre sel inhibitörü (cIAP1/2) antagonisti (Feoktistoya v.d., 2011) ve interferon (Thapa v.d., 2013) dahil olmak üzere ölüm reseptörlerinden bağımsız olarak

hareket eden başka nekroptoz indükleyicileri de bulunmaktadır. Nekroptoz, düzenlenmiş bir nekroz şeklidir (programlı bir şekilde). Nekroptoz, kaspazın inaktivasyonu ile meydana gelmekte (kaspazdan bağımsız bir mekanizmadır) ve bu nedenle de alternatif hücre ölüm yolu olarak da adlandırılmaktadır (Wu v.d., 2012). Organizmanın gelişiminin farklı aşamalarında nekroptoz görülmüştür. Örnek olarak genç hayvanlarda kemiklerin uzaması sırasında (Roach ve Clarke, 2000); ve yetişkinlerde bağırsak epitel hücrelerinde bulunmuştur (Barkla ve Gibson, 1999). Ek olarak, iskemik beyin hasarı (felç), ekzotoksisite, miyokard enfarktüsü ve kemoterapinin neden olduğu hücre ölümü gibi bir dizi patolojik durumda nekroptoz gözlenmiştir (Vandenabeel v.d., 2008).

#### *1.8.2.2. Nekroptozisin moleküler mekanizması*

Reseptör etkileşimli serin/treonin kinaz (RIP) ailesi bir grup ser/Thr kinaz içerir. Bunlar; RIP1, RIP2, RIP3, RIP4, RIP5, RIP6 ve RIP7'dir (Meylan ve Tschopp, 2005). RIP1, RIP kinaz ailesinin ilk üyesidir. RIP1, reseptörlere bağlanmaya yardımcı olan bir ölüm domenine sahiptir (Meylan ve Tschopp, 2005). Ayrıca, RIP1 kinaz aktivitesinin nekroptoz için çok önemli olduğu düşünülmektedir. Çünkü RIP1 kinaz aktivitesi, nekrostatin 1 adı verilen küçük bir molekül tarafından inhibe edilebilir, bu da nekroptoz mekanizmasının inhibisyonuna yol açar (Degterev v.d., 2008). Tümör nekroz faktörü reseptörü-1 (TNFR1) sinyalleri uyarıldığında, RIP1 hücrenin kaderini belirleme yeteneğine sahiptir. Hücrelerin kaderi ya nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) aktivasyonu yoluyla hayatta kalma ya da apoptoz veya nekroptoz mekanizmaları yoluyla ölümdür. TNF-alfa, plazma zarında TNFR1'e bağlanır. Bu bağlanmadan sonra TNF reseptörü ile ilişkili ölüm domaini -2 (TRADD), TNF reseptör ilişkili faktör 2 (TRAF2), cIAP1/2 ve RIP1'den oluşan kompleks I meydana gelir. Kompleks I'de, RIP1, sonuçta hücrenin hayatta kalmasını sağlayan NF- $\kappa$ B yolunun aktivasyonuna yol açan çoklu ubiquitinasyon formları tarafından modüle edilir (Christofferson v.d., 2014). Klindromatosiz lizin 63 deubikitinaz (CYLD), deubikuitinazı bir enzimdir (Simonson ve Miyamoto, 2007) ve bu enzimin substratı, RIP1'dir (Wright v.d., 2007). RIP1'in deubikitinasyonu, E3 ligazları cIAP1/2'nin çıkarılmasıyla veya CYLD enzimiyle meydana geldiğinde, apoptozun başlamasına yol açan ikincil bir RIP1, Fas ilişkili ölüm domaini (FADD) ve kaspaz-8 kompleksi oluşur (Wang v.d., 2008). Aktif kaspaz-8, hem RIP1'i (Lin v.d., 1999) hem de RIP3'ü (Feng v.d., 2007) degrade etmek ve etkisiz hale getirmek için hareket eder. RIP3, nekroptoz için bir aracı olarak temsil edilir (Cho v.d.,

2009). Kaspaz -8, zVAD tarafından inhibe edildiğinde, RIP1 kinazın aktivasyonu, RIP3'ün uyarılmasına yol açar ve ardından RIP1, RIP homotipik etkileşim motifi (RHIM) aracılığıyla RIP3 ile birleşerek nekroptotik hücrelerde bir nekrozomun oluşumuna yol açar (Li v.d., 2012). Bu durum ise RIP1/PIR3'ün oto- ve trans fosforilasyonu karışık soy kinaz domeni benzeri protein (MLKL)'nin uyarılmasına sebep olur (Liu v.d., 2019). MLKL, RIP3 kinazı için bir substrat olarak temsil edilir (Sun v.d., 2012). RIP3 tarafından fosforile edilir (Sun v.d., 2012) ve daha sonra hücre zarına yer değiştirerek hücre zarının yırtılmasına neden olur (Dondelinger v.d., 2014). Ek olarak, MLKL; ER, mitokondriyal ve lizozomun geçirgenleşmesine yol açan intraselüler zarlara hareket edebilir (Wang v.d., 2014). Buna göre, in vitro nekroptotik hücre ölümü, plazma zarının yırtılması, hem kaspaz aktivasyonunun hem de kromatin yoğunlaşmasının kaybı ile karakterize edilir (Feoktistova v.d., 2011).

### **1.8.3. Apoptosis**

Kerr ve arkadaşları, hücre ölümünün bir dizi farklı morfolojik özelliğini tanımlamak için apoptoz adını ileri sürmüşlerdir (Kerr v.d., 1972). Memeli hücrelerinde programlanmış ölüm terimi, *Caenorhabditis elegans*'in nematodları üzerinde yapılan çalışmalarla anlaşılmıştır (Horvitz, 1999). Apoptoz, hücre hasarı veya dış strese maruz kalma sırasında ortaya çıkan normal gelişim ve morfogenez sırasında da ortaya çıkabilen düzenlenmiş bir hücre ölüm mekanizmasıdır (Nikoletopoulou v.d., 2013). Ayrıca, apoptoz, sonuçta hücre ölümüne yol açan kaspazlar adı verilen bir grup sistein proteaz aktivasyonuna bağlı olan enerjiye bağımlı bir süreçtir (Elmore, 2007). Apoptozun sinyalleşme süreçleri, düzensiz veya uygunsuzsa kanser (Vermeulen v.d., 2005), nörodejeneratif hastalık (Ekshyyan v.d., 2004) ve otoimmün hastalık (Mahoney ve Rosen, 2005) gibi çeşitli hastalıklara yol açtığı bilinmektedir. Apoptoz sırasında hücrelerde meydana gelen morfolojik değişiklikler ışık ve elektron mikroskobu kullanılarak gözlemlenmiştir (Häcker, 2000). Bu morfolojik değişikliklerin en önemlileri arasında hücrelerin piknozu (hücrelerin küçülmesi), sitoplazma yoğunlaşması, organeller daha sıkı paketlenmesi, karyoreksis (nukleusun parçalanması) ve kromatin yoğunlaşması yer almaktadır (Kroemer v.d., 2005). Ardından plazma zarının tomurcuklanma başlar ve sonunda tomurcuklanma sürecinin bir sonucu olarak apoptoz cisimcikleri oluşur (Elmore, 2007). Bu apoptotik cisimler, çekirdeğin parçalarını veya bozulmamış sitoplazmik organelleri içerir (galluzzi v.d., 2007). Membranın bütünlüğünün

bozulmadan kalması da önemlidir (Elmore, 2007). Ölmekte olan apoptotik hücre, makrofajlar tarafından tanınan "beni bul" ve "beni ye" sinyallerini salgılar. Bu tür sinyallerin en ünlü örneklerinden biri fosfatidilserindir (PS). Normal durumda, plazma zarının iç tarafında bulunan (Balasubramanian ve Schroit, 2003), PS'nin ortaya çıkması 'erken apoptoz'u gösterir. Geç apoptozda ise zar bütünlüğü tamamıyla kaybolmuştur. Apoptoz sırasında PS, hücre yüzeyine geçer (Stepanek .d., 2011). PS'nin memelilerde, Drosophila ve Caenorhabditis elegans'ta apoptotik hücrelerin yüzeyinde görüldüğü gösterilmiştir. PS, doğrudan fagosit reseptörlerine bağlanır veya PS'yi fagosit reseptörlerine bağlayan köprü molekülleri aracılığıyla dolaylı olarak bağlanır (Nagata v.d., 2010). Fosfatidilserin in vitro ve in vivo olarak inhibe edildiğinde, apoptotik hücre yutulmasının inhibisyonu meydana geldi (Asano v.d., 2004). Apoptotik hücreler, hücrel bileşenlerini serbest bırakmazlar. Fagositoz hızla gerçekleşir ve fagositik hücreler antiinflamatuvar sitokinler üretmez. Sonuç olarak, apoptoz sürecinde herhangi bir inflamatuvar reaksiyon meydana gelmez (Kurosaka v.d., 2003).

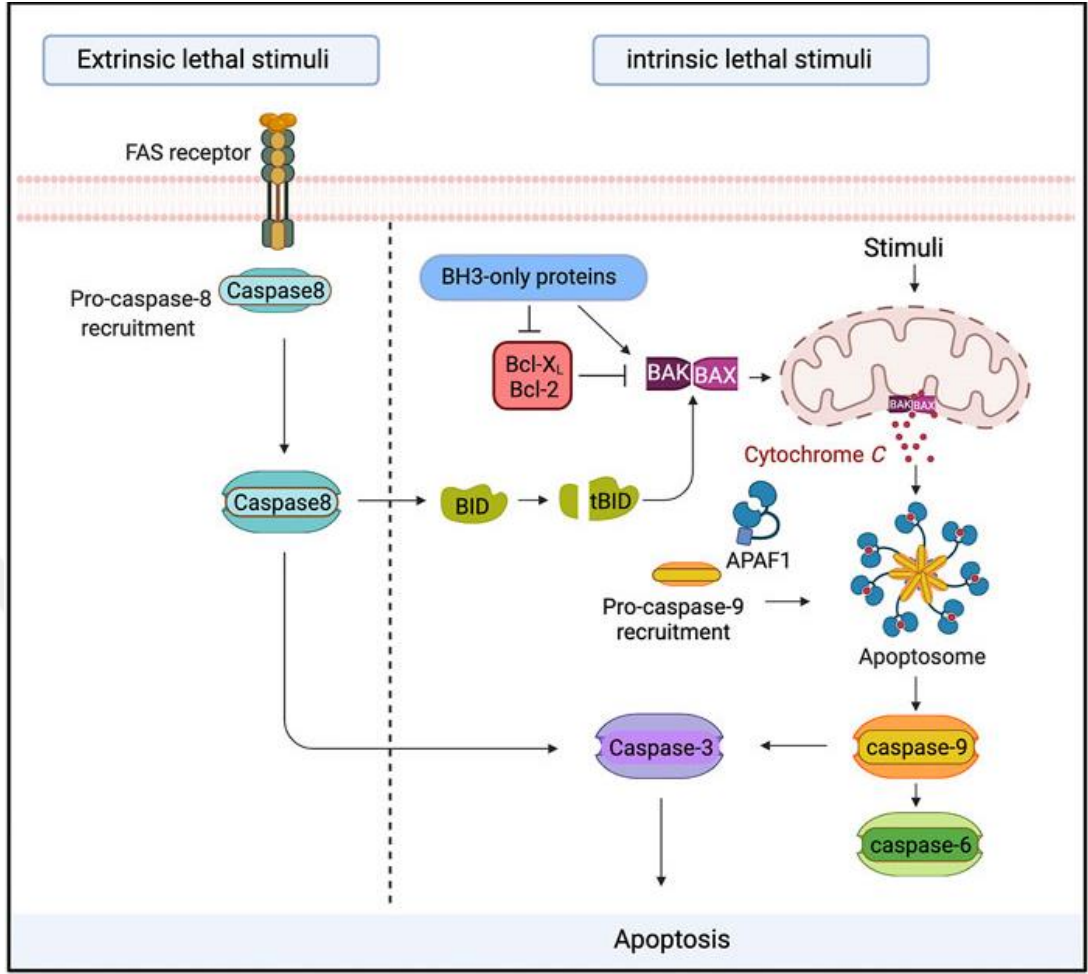
#### *1.8.3.1.Kaspazlar*

Kaspazlar (sistein proteazlar), apoptozu indükleme işlevi gören sistein proteazlar ailesine aittir. Kaspazlar normalde aktif olmayan öncül enzimler (pro-kaspaz) olarak bulunurlar, ancak bir aspartik asit kalıntısının otoproteolitik (kendi kendini aktive eden) veya başka bir kaspaz tarafından parçalanmasıyla aktive edilirler (Khan v.d.,2014). Kaspazlar, sitoplazmada veya nükleusta bir dizi farklı substratı parçalayarak apoptozun morfolojik özelliklerini indükler (Degterev v.d., 2003). Örneğin, DNA Parçalanma Faktörü (DFP-40) olarak da adlandırılan kaspazla aktive olan deoksiribonükleaz (CAD) tarafından apoptoz sırasında meydana gelen DNA parçalanmasının, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü (ICAD)'ı CAD'ye bölen ve daha sonra nükleusa giren kaspaz-3 yardımıyla meydana geldiği gösterilmiştir. Bu nedenle CAD/DFP-40'ı aktive eden kaspaz 3 apoptoz sürecinde önemlidir (Liu v.d., 1997). Kaspazların işlevleri sadece hücre ölümü ile sınırlı değildir, Örneğin; hücre farklılaşması ve iltihaplanmasında da önemli bir rol oynayabilirler. Memeli kaspazları işlevlerine göre iki gruba ayrılır: Bunlar; apoptotik kaspazlar (2,3,6,7,8,9 ve 10) ve inflamatuvar Kaspazlar (1,4,5,11 ve 12). Apoptotik kaspazlar, N-ucuna doğru belirli protein etkileşimli bağlanma bölgesinin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak iki gruba ayrılır: Başlatıcılar ve Efektör kaspazlar'dır. Memelilerde başlıca başlatıcı kaspazlar -

2, -8, -9 ve 10'dur. Bu kaspazlar kaspaz bağlayıcı domen (CARD) veya ölüm etkili domen (DED) içerir. DED bağlanma bölgesini hem kaspaz 8'de hem de kaspaz 10'da bulunurken, CARD bağlanma bölgesini hem kaspaz 2'de hem de kaspaz 9'da bulunur (shalini v.d., 2015). Bu bağlanma bölgeleri, kaspazlar ve adaptör proteinler arasındaki etkileşime aracılık eder (Kumar v.d., 2007). Ek olarak, efektör kaspazlar kısa öncül bağlanma bölgelerine sahiptir ve başlatıcı kaspazlar tarafından aktive edilir (Degterev v.d., 2003). Enflamatuar kaspazlar, N-terminal ucundaki CRAD bağlanma bölgelerine sahip oldukları için uzun öncül bağlanma bölgelerine sahip olarak sınıflandırılır (shalini v.d., 2015). Kaspaz 12, inflamasyondaki rolüne ek olarak, endoplazmik retikulumdaki stres kaynaklı apoptozda önemli bir rol oynar (Nakagawa v.d., 2000).

### *1.8.3.2. Apoptotik Yolaklar*

Apoptoza giden iki ana yol vardır: Ekstrinsik (dışsal) yol ve intrinsik (içsel) yol. Ekstrinsik yol, hücre yüzeyi ölüm reseptörleri ligandlara bağlandığında başlatılır, ancak intrinsik yol, BCL-2 ailesi proteinleri, DNA hasarı gibi hücre streslere yanıt olarak dış mitokondriyal zarın geçirgen hale gelmesine neden olduğunda tetiklenir (Campbell ve Tait, 2018). Her iki yolda da sonuçta hücre ölümüne yol açan kaspaz ailesinin aktivasyonu yer alır (Green ve Llambi, 2015). Hem ekstrinsik hem de intrinsik yollarda ortak olan, kaspaz-3'ün aktivasyonudur. Kaspaz-3, kinazlar, DNA kontrol proteinleri ve endonükleaz inhibitörleri gibi çeşitli proteinleri parçalayarak morfolojik değişikliklere neden olur (Thornberry ve Lazebnik, 1998) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Apoptozun Ana Yolları (Dehkordi v.d., 2022)

### 1.8.3.3. Ekstrinsik apoptoz yolu.

TNF süper ailesi, iltihaplanma, apoptoz, proliferasyon ve istila gibi çeşitli süreçlerde yer alan 19 ligand ve 29 reseptörden oluşur (Aggarwal v.d., 2012). TNFR'ler, sistein açısından zengin alt bağlanma bölgelerinden (subdomains) oluşan ekstraselüler bağlanma bölgesine (Naismith ve Sprang, 1998) ve apoptotik sinyal iletimi için gerekli olan ölüm bağlanma bölgesi adı verilen bir intraselüler bağlanma bölgesine sahiptir (Fulda ve Debatin, 2004). TNF ligandları, reseptörlere bağlanan çözümlü trimerik ligandlara dönüşmek için bir proteolitik süreçten geçer (Black v.d., 1997). Apoptozda, ölüm reseptörüne bağlı ekstrinsik yol, TNF ligand proteinleri ve reseptörleri arasındaki etkileşim yoluyla başlatılır. Örneğin, Fas ligandı (FASL)/CD95L ve (TNF) alfa, sırasıyla FAS ve TNF-R'yi içeren TNF ölüm reseptörlerine bağlanır (Elkholi v.d., 2011). Ölüm bağlanma bölgesini içeren TNF

reseptörleri, aynı zamanda bir bağlanma bölgesinine sahip oldukları için FADD ve TRADD gibi adaptör proteinlerini çeker. Bu proteinler daha sonra başlatıcı prokaspazlar -8 ve 10 ile birleşerek ölüm indükleyici sinyal kompleksinin (DISC) aktivasyonuna neden olur (Pobezinskaya ve liu, 2012). DISC'de kaspaz -8 ve -10, otokatalitik işleme etkinleştirilir (Ashkenazi and Salvesen, 2014). Aktif Kaspaz-8 iki şekilde apoptoza neden olur: Tip1- Kaspazlar-8 ve kaspazlar-10'u aktive ettikten sonra efektör kaspazlar 3,6,7'yi aktive ederek hücre ölümüne yol açar. Tip2- kaspaz 8 Bid'i parçalayarak mitokondriden sitokrom C'nin salınmasını uyaran ve daha sonra kaspaz-9'u aktive eden bir kesik BID (tBID) fragmanı üretir (Tait ve Green, 2010). Hüresel FLICE benzeri inhibe edici protein (cFLIP), ölüm reseptörü (DR)'ler tarafından meydana gelen hücre ölümünü önleyen bir anti-apoptotik düzenleyicidir (Dimberg v.d., 2013). FADD ve kaspaz-8, c-FLIP tarafından inaktive edilir, böylece apoptoza yol açan ekstrinsik yolu inhibe eder (Scaffidi v.d., 1999) Ayrıca, T hücresinde Fas sinyali ile indüklenen apoptoz, kaspaz-8 biyogenezini inhibe eden Toso proteini tarafından inhibe edilir (Hitoshi v.d., 1998).

#### *1.8.3.4.İntrinsik apoptoz yolu.*

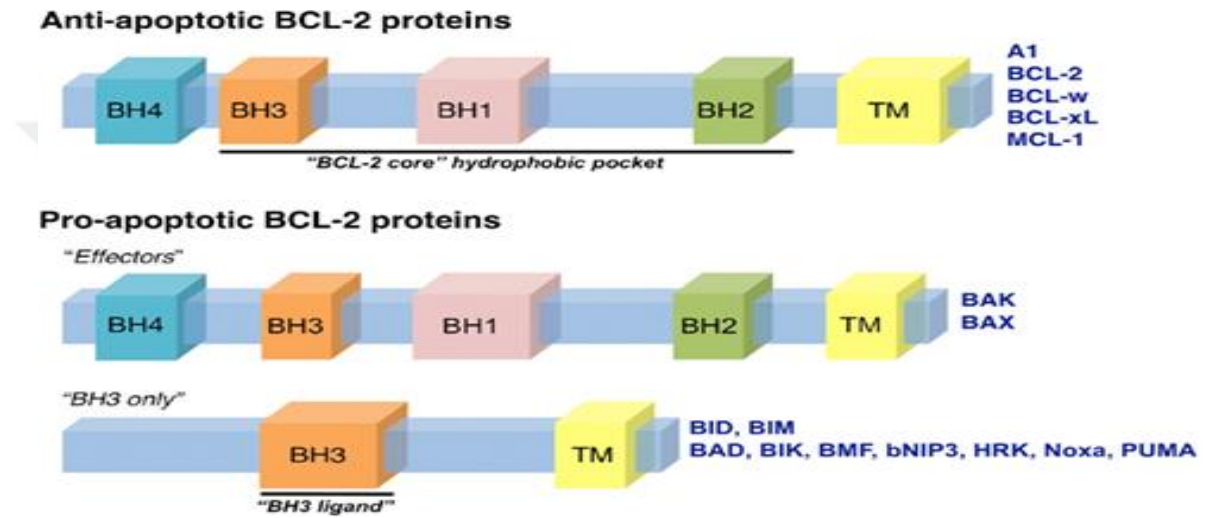
Apoptozun intrinsik yolu, reseptör sinyalleşmesinden bağımsız olarak karakterize edilir. Apoptoza yol açan mitokondriyal yolu uyaran hücre içi sinyallerin varlığına bağlıdır. Örneğin: belirli bir büyüme faktörü, hormon veya çeşitli sitokinlerin kaybı ve ayrıca DNA hasarı, intrinsik mitokondriyal yolun başlatılması için katalizörlerdir (Elmore, 2007 ;Kiraz,v.d., 2016; Bratton ve Salvesen, 2010; Elkholi v.d., 2011). Sağlıklı hücrelerde, apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf-1), sitoplazmada inaktif monomerler olarak kalır (Li v.d., 1997), ancak uygun uyaranlar varlığında Apaf-1 monomerleri, intrinsik yolda pro-kaspazı aktive eden büyük halka benzeri bir platformda toplanır (Bratton ve Salvesen, 2010). Ayrıca içsel sinyallere yanıt olarak, Bcl-2 ile ilişkili X proteini (BAX) ve BCL-2 antagonist öldürücü (BAK) efektör moleküllerini aktive eden ve anti-apoptotik grubu inhibe eden pro-apoptotik Bcl-2 homoloji 3 (BH3)-only proteinleri aktive edilir. BAK ve BAX etkinleştirildikten sonra dış mitokondriyal zarın geçirgen hale gelmesine neden olarak sitokrom C'nin mitokondriden salınmasına sebep olmaktadır (Elkholi v.d., 2011). Sitoplazmanın içine girdikten sonra, sitoplazmada sitokrom c için bir reseptör olan APaf-1'e bağlanır (Rodriguez ve Lazebnik, 1999). Bununla birlikte, Apaf-1, sitokrom c ve prokaspaz-9'dan oluşan bir apoptozom oluşturur ve prokaspaz-9 apoptozomda aktive edilir. Aktive

edilmiş kaspaz-9; kaspaz-3 ve kaspaz-7 gibi efektör kaspazları içeren bir kaspaz kaskadını aktive eder ve bu da sonuçta apoptozun yürütülmesini sağlar (Elkholi v.d., 2011). Apoptoz inhibitörü proteinleri (IAP'ler), bakulovirüslerde gen ürünleri olarak keşfedilmiştir. Tüm IAP'ler, bakulovirüs IAP tekrarlarını (BIR'ler) içerir (Crook v.d., 1993). IAP ailesi, hem başlatıcı hem de efektör kaspazların enzimatik aktivitesini inhibe ederek apoptozu inhibe etmektedir (Elkholi v.d., 2011). Örneğin; bu ailenin bir üyesi olan X'e bağlı apoptoz inhibitörü (XIAP), prokaspazları inhibe eden BIR bağlanma bölgesini içerir (Shiozaki v.d., 2003). Apoptoz oluştuğunda, kaspazların ikinci mitokondri kaynaklı aktivatörü (SMAC)/ düşük pI'ya sahip doğrudan IAP bağlama proteini (DIABLO) ve Omi / yüksek sıcaklık toplama protein A (HtrA2) gibi proapoptotik faktörler sitokrom c ile birlikte mitokondriden salınır. Bu faktörler daha sonra, bilinen bir kaspaz inhibitörü olan XIAP'ın işlevini inhibe etmek için BIR bağlanma bölgesiyle etkileşime girer (Tait ve Green, 2010). Mitokondriyal dış zar geçirgenliği (MOMP), sonuçta hücre ölümüne neden olan hem kaspaza bağımlı hem de kaspazdan bağımsız molekülleri serbest bıraktığı için öldürücüdür (Green ve Kroemer, 2004). Başka bir örnek olarak, mitokondriden çekirdeğe salınan apoptoz indükleyici faktör (AIF) ve endonükleaz G proteinleri, kaspazdan bağımsız bir şekilde ölüm olaylarını indükler. AIF, DNA parçalanmasına ve periferik nükleer kromatin yoğunlaşmasına neden olurken (Jozza v.d., 2001), endonükleaz G ise nükleer kromatin bölünmesine neden olarak oligo nükleozomal DNA parçaları üretir (Li v.d., 2001).

#### *1.8.3.5. BCL-2 ailesi*

İnsan genomunda BCL-2 protein ailesinin 25 üyesi vardır (Reed ve Pellecchia, 2005). Bu proteinler, mitokondri, endoplazmik retikulum ve sitozolde bulunmaktadır. BCL-2, insan foliküler lenfomasında t (14;18) kromozomal translokasyon bölgesinde tanımlanan ilk apoptotik düzenleyicidir (Hall v.d., 2013). Mitokondriyal yol (intrinsik yol), BCL-2 ailesinin üyeleri tarafından düzenlenir. Bu protein ailesi bir anti-apoptotik grup (A1, BCL-2, BCL-w, BCL-xL, and MCL-1) ve iki pro-apoptotik alt gruptan oluşmaktadır. Bu iki pro-apoptotik gruptan ilki BH3-only proteinleri (BAD, BID, BIK, BIM, BMF, bNIP3, HRK, Noxa, and PUMA) ve diğeri ise pro-apoptotik efektör proteinleri (BAX ve BAK) içerir. Anti-apoptotik proteinleri, dört BH bağlanma bölgesi içerir (belirlenmiş BH1-4). Pro-apoptotik efektör proteinleri de BH1-4 bağlanma bölgelerini içerirken, BH3-only proteinleri, anti-apoptotik ve efektör ile etkileşim için gerekli olan bir BH3 bağlanma bölgesini içerir. Ek olarak, tüm

BCL-2 ailesi proteinlerinde bir transmembran (TM) bağlanma bölgesini mevcuttur (şekil 1.7). Homeostaz durumunda, antiapoptotik alt aile, BAX ve BAK gibi hücre ölümü aracılarının aktivitesini inhibe ederek hücrenin hayatta kalmasını sağlar. Fakat, hücrelerde stres sinyali oluştuğunda BH3-only proteinleri doğrudan BAK ve BAX'a bağlanarak onları aktive eder. Ayrıca anti-apoptotik alt aileyi inhibe ederek dolaylı olarak BAX ve BAK'ı aktive edebilmektedir. Bunun sonucunda BAX ve BAK'ın mitokondri dış zarına girmesi sağlanır ve dış mitokondri zarı geçirgen hale gelir (Czabotar v.d., 2014).



Şekil 1.7. BCL-2 Protein Ailesi (Anvekar v.d., 2011)

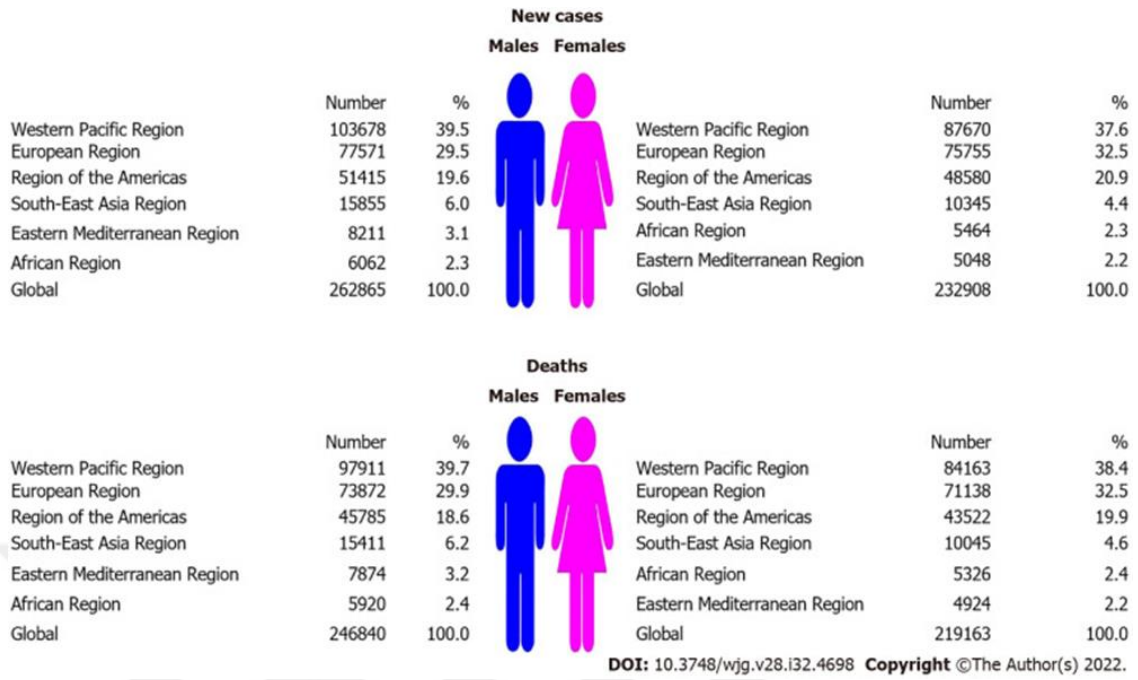
## 1.9. PANKREAS KANSERİ

Pankreas, anatomik olarak benzer ancak fonksiyonel olarak farklı olan ekzokrin ve endokrin olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (Oldfield v.d., 2017; Zhou ve Melton, 2018). Ekzokrin pankreas, pankreas kütlelerinin yaklaşık %85'ini oluştururken, endokrin pankreas pankreas kütlelerinin yaklaşık %2'sini oluşturur. Pankreasın geri kalan kısmı (%13) ise bağ doku, sinirler ve kan damarlarından oluşur. Ekzokrin pankreas, duktal ve asiner hücreler olmak üzere iki ana hücre tipinden oluşurken, endokrin pankreas, Langerhans adacıkları adı verilen küçük hücre gruplarından meydana gelir (Andersson, 2010). Pankreas kanseri, kötü prognozu ve agresif doğası nedeniyle en ölümcül kanser türlerinden biridir. GLOBOCAN 2020 verilerine göre, pankreas kanseri her iki cinsiyette de kansere bağlı ölümlerin önde gelen yedinci nedenidir (Sung v.d., 2021). Ferlay ve arkadaşları 2025 yılına

kadar pankreas kanserinin meme kanserinden daha fazla ölüme sebep olacağını öngörmektedir (Ferlay v.d., 2016). Ekzokrin hücrelerden köken alan pankreas duktal adenokarsinomu, en sık görülen pankreas kanseri türüdür ve pankreas kanseri vakalarının %85'inden fazlasını oluşturur. Pankreatik duktal adenokarsinom, invaziv duktal adenokarsinom olarak da bilinir ve genellikle ileri evrede farkedilmektedir. Bu nedenle çoğu tedavi yöntemine karşı dirençlidir (Ryan v.d., 2014). Pankreatik nöroendokrin tümörler ikinci en yaygın tipi temsil eder (Wolfgang v.d., 2013) ve pankreas tümörlerinin yaklaşık %10'unu oluşturur (Mostafa v.d., 2017). Pankreatik duktal adenokarsinomların çoğu, pankreatik intraepitelyal neoplazi (PanIN) olarak adlandırılan, pankreas kanalları içindeki mikroskopik proliferatif epitelyal lezyonlardan kaynaklanır (Hruban v.d., 2001). Bu PanIN lezyonları, yapısal ve sitolojik atipiye dayalı olarak PanIN-1, PanIN-2 ve PanIN-3 olarak derecelendirilir. Ayrıca, az sayıda pankreatik duktal adenokarsinom, intraduktal papiller müsinöz neoplazmalar (IPMN'ler) veya müsinöz kistik neoplazmalar (MCN'ler) olarak adlandırılan makroskopik kistikten kaynaklanır (Kamisawa v.d., 2016). Pankreas duktal adenokarsinomunun teşhisindeki önemli bir histolojik özelliği ise stromal desmoplazi ile karakterize olmasıdır (Jacobetz v.d., 2013). Bundan başka pankreas adenokarsinomun teşhisinde yardımcı olabilecek histolojik özellikler de vardır. Bezlerin rastgele düzenlenmesi, nükleer pleomorfizm, eksik glandüler lümen ve lenfovasküler invazyon bunlardan birkaçıdır (Kamisawa v.d., 2016).

### **1.9.1. İnsidans Ve Mortalite İstatistikleri**

Küresel olarak, 2020'de her iki cinsiyette pankreas kanserinden kaynaklanan toplam yeni vaka ve ölüm sayısı sırasıyla 495.773 ve 466.003'tür. Erkeklerde, Afrika bölgesi en düşük yeni pankreas kanseri vakası ve ölüm sayısını kaydederken, Doğu Akdeniz bölgesi kadınlarda en düşük yeni pankreas kanseri vakası ve ölümü rapor edilmiştir. Buna zıt olarak, Batı Pasifik Bölgesinde ise, her iki cinsiyette de en yüksek yeni vaka sayısı ve pankreas kanseri ölümü meydana gelmiştir (Şekil 1.8).



**Şekil 1.8.** DSÖ Bölgelerine Ve Cinsiyete Göre 2020'de Yeni Pankreas Kanseri Vakalarının Ve Ölümünün Sayısına İlişkin İstatistikler (Ilic ve Ilic, 2022)

### 1.9.2. Risk Faktörleri

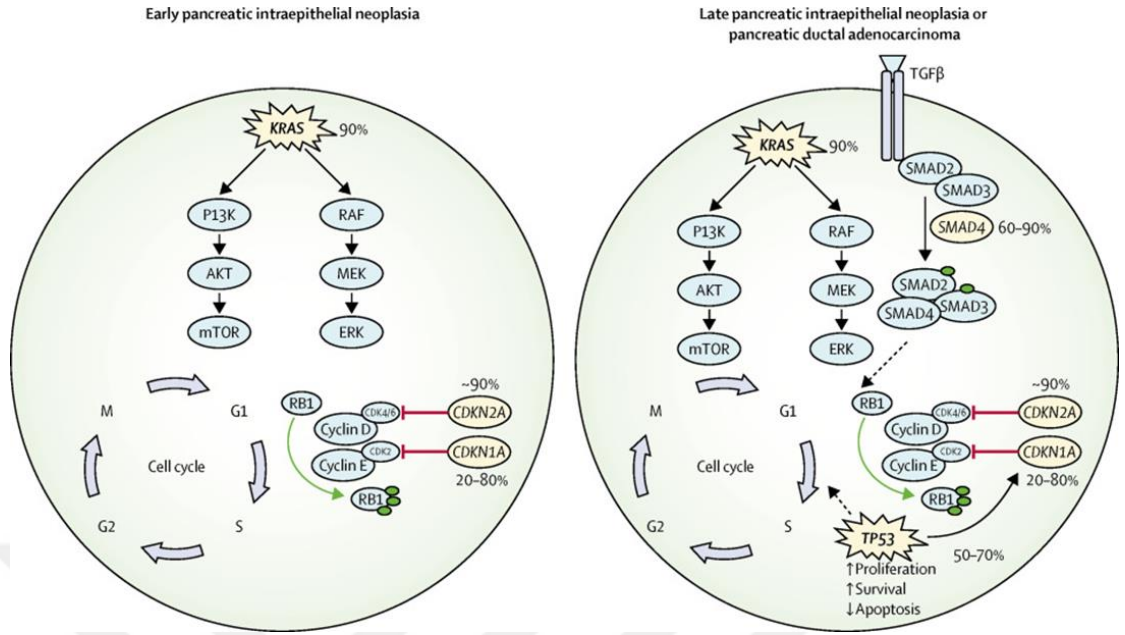
Ailesel pankreas kanseri (FPC), pankreas kanserinin görülme sıklığında yaklaşık %10 oranında rol oynamaktadır (Petersen, 2015). Aile öyküsünün yanı sıra, çoğu pankreas kanseri vakası yaklaşık olarak sporadiktir (>%80). Örneğin: sigara içmek, obezite, tip 2 diyabet ve kronik pankreatit, pankreas kanseri riskiyle bağlantılıdır (Yeo, 2015).

### 1.9.3. Belirtiler

Pankreas kanseri semptomları genellikle hastalığın seyrinde geç ortaya çıkar ve bu da erken teşhisi zorlaştırır (Kamisawa v.d., 2016). Pankreas kanseri belirtileri büyük ölçüde tümörün yeri ve evresine bağlıdır. Pankreas baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç bölgeye ayrılmıştır. Pankreasın baş kısmı yaklaşık 60-70%, gövde ve kuyruk kısımları ise ortalama 20-25% pankreas kanser vakalarını oluşturmaktadır. Semptomların başlamasının nedeni safra kanalının ve / veya pankreas kanalının tıkanmasıdır. Pankreas kanserinin yaygın semptomları arasında sarılık, kilo kaybı, karın ağrısı, steatore ve diyabet yer alır (Ducreux v.d., 2015).

#### 1.9.4. Pankreas Kanseri İlerlemesinin Moleküler Karakterizasyonu

Bir grup genetik değişikliğin varlığı ile karakterize edilen pankreas intraepitelyal neoplazisi, pankreas adenokarsinomunun oluşumundan sorumludur. Örneğin, erken pankreatik intraepitelyal neoplazide (derece 1 ve 2) kodon 12'deki KRAS'ta bir nokta mutasyonu meydana gelir. KRAS mutasyonu, hem RAF/MAPK hem de PI3K/AKT yollarında sürekli aktiviteyi indükler. Pankreatik duktal adenokarsinomların %90'ında KRAS mutasyonu bulunur. Ek olarak, erken pankreatik intraepitelyal neoplazide (derece 2) yer alan CDKN2A/p16 ve CDKN1A/p21 gibi sikline bağımlı kinaz inhibitörlerinin değişimleri, nihayetinde G1 fazından S fazına hücre döngüsü geçişini arttırır. Bu değişiklikler, tümör baskılayıcı gen CDKN2A'nın etkisizleştirilmesi ve onkogen CDKN1A'nın aşırı ekspresyonuna sebep olur. Ayrıca, geç evre (derece 3) pankreas intraepitelyal neoplazisinde, iki tümör baskılayıcı gen olan TP53 ve SMAD4'ün inaktivasyonu sırasıyla pankreas duktal karsinomlarının %50-70'ine ve %60-90'ına neden olur (Şekil 1.9). NF-κB'nin, birçok pankreatik duktal adenokarsinom (PDAC) hastasında yapısal olarak aktif olduğu bulunmuştur (Wang v.d., 1999). Bu aktivite esas olarak kodon 12 içindeki bir KRAS mutasyonu tarafından yürütölmektedir. RAS mutanı, AP-1 aracılığıyla p62 ifadesini indükler. Bu dönüştürölmüş p62, TRAF6'nın ifadesini pozitif olarak düzenler. Sonuç olarak, PDAC ilerlemesi ile ilişkili olan nükleer faktör kappa-B kinaz inhibitörü (IKK)2/beta ve NF-κB'nin sürekli aktivitesi oluşur. Ek olarak KRAS mutasyonu, AP-1 aktivasyonu yoluyla 1L-1 afa ekspresyonunu indükler. 1L-1alfa aşırı ekspresyonu, PDAC hastalığında NF-κB aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir (Ling v.d., 2012).



**Şekil 1.9.** Pankreatik İntraepitelyal Neoplazinin Erken Ve Geç Dönemlerinde Bozulan Moleküler Yol (Mizrahi v., 2020)

## 1.9.5. Tedavi

### 1.9.5.1. Cerrahi

Cerrahi tedavi, kanserin teşhis, tedavi ve yayılmasının önlenmesi amacıyla tercih ediliyor olup, kanserin vücudun geri kalanına yayılmamış olması halinde cerrahi tedavinin yüksek oranda iyileşme şansı verdiği inaniilmektedir (Mathur v.d., 2015). Özellikle rezektabi veya borderline rezektabi pankreas kanseri olan hastalarda pankreas kanseri ameliyatı en iyi seçenektir. (Evans v.d., 2009). Pankreas kanseri için cerrahi teknikler üç türe ayrılır. Bunlar; Pankreatikoduodenektomi, Splenektomi ile Distal Pankreatektomi ve Total Pankreatektomi'dir (Kamisawa v.d., 2016). Pankreasın kafa bölgesinde bulunan tümörler de çoğunlukla pankreatikoduodenektomi kullanılırken pankreasın gövde veya kuyruğundaki mevcut tümörlerde ise splenektomi ile distal pankreatektomi uygulanmaktadır (Mizrahi v.d., 2020). Ayrıca, kanser pankreas organının tüm bölgelerine yayılmışsa, pankreasın tamamının çıkarılmasını içeren total pankreatektomi de yapılmaktadır (Kamisawa v.d., 2016).

### *1.9.5.2. Neoadjuvan ve adjuvan tedavi*

Neoadjuvan tedavinin amacı, primer tümörün boyutunu küçültmek ve cerrahi olarak çıkarılmasını daha kolay ve daha etkili hale getirmektir (Herrerros-Villanueva v.d., 2012). Ameliyat sonrası adjuvan kemoterapinin yapılma amacı ise cerrahi tedavi sonrası vücutta kalan kanser hücrelerini ortadan kaldırmak içindir (Sudhakar, 2009). Neoadjuvan tedavi ve adjuvan kemoterapi, rezektabl ve borderline rezektabl pankreas kanseri hastalarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bu nedenle, preopratif kemoradyoterapi (radyoterapi ve kemoterapi kombine ) tedavisi olan hastalarda, cerrahiye kıyasla daha yüksek bir R0 rezeksiyon oranına ve daha uzun hastaliksız sağ kalıma sahip olduğu tespit edilmiştir (Versteijne v.d., 2020). Ek olarak, adjuvan kemoterapinin rolünün, ameliyattan sonra fluorourasil ve folinik asit birlikte kombine edildiğinde, hiç kemoterapi olmayan hastaların durumuna kıyasla sağkalımı oranında artış olduğu gösterilmiştir (Neoptolemos v.d., 2001).

### *1.9.5.3. Kemoterapi*

Kemoterapi, hem hücre proliferasyonunu hem de tümör büyümesini inhibe etmek için kimyasalların kullanılmasını ifade eder. Ek olarak, bulaşıcı hastalıkları tedavi etmek için kemoterapi de kullanılır. Bu tedavi yöntemi kendi içinde iki kategoriye ayrılır. Bunlar sırasıyla; kanser kemoterapisi ve antimikrobiyal kemoterapi'dir . Kemoterapi ilaçları, sistemik seviyelere ulaşmak için ağızdan, kas içinden veya damardan verilebilir (Amjad v.d., 2023). Geleneksel kemoterapi kanser hücrelerini öldürür, ancak sorun seçici olmamasıdır. Bu da kanser hücrelerini olduğu kadar kemik iliği hücreleri, kıl kökü hücreleri ve gastrointestinal sistem hücreleri gibi normal, hızla bölünen hücreleri de etkiler. Sonuç olarak, kanser tedavisi sırasında istenmeyen yan etkilere neden olur (Ferrara ve Kerbel, 2005). Bu nedenle kombine kemoterapi kullanmak önemlidir. Bu kemoterapi türünde daha düşük dozda ilaç kullanımına odaklanılıp ilacın etkinliği artırılıp, yan etkiler ve sistemik toksisite azaltılmaktadır (Mayer ve Janoff, 2007). Standart kemoterapi kullanılan metastatik pankreas kanserli hastaların ortalama sağ kalım oranı 5.65 aydır (Burris v.d., 1997). Fakat kombine tedavisi ile hastaların genellikle daha iyi bir sağkalım gösterdiği tespit edilmiştir. Örneğin, gemsitabinin nab-paklitaksel ile kombinasyonu, tek başına gemsitabin ile karşılaştırıldığında genel sağkalımı iyileştirmiştir (Von Hoff v.d., 2013 ). FOLFIRINOX (oksalipatin, folinik asit, irinotekan, fluorourasil bolus, fluorourasil enjeksiyonu ile

yapılmıştır), tek başına gemsitabinden daha iyi yanıt ve daha yüksek genel sağkalım gösteren metastatik pankreas kanseri için bir seçenek olarak gösterilmektedir (Conroy v.d., 2011).

#### *1.9.5.4. Radyasyon tedavisi*

X-ışınları Röntgen tarafından keşfedilmiş ve bundan 3 yıl sonra kanser tanı ve tedavisinde radyasyon kullanılmaya başlanmıştır (Sudhakar, 2009). Radyoterapi tüm kanser hastalarının yaklaşık %50'sini tedavi etmektedir (Delaney v.d., 2005). Tek başına veya diğer tedavi biçimleriyle kombine halinde kullanılabilir (Mathur v.d., 2015). Bu radyasyon iyonlaştırıcı radyasyon olarak adlandırılır çünkü içinden geçtiği dokuların hücrelerinde iyon üretir ve enerji depolar. Sonuç olarak, biriken bu enerji kanser hücrelerini öldürebilir veya sonunda kanser hücrelerinin ölümüne yol açan genetik değişikliklere neden olabilir (Baskar v.d., 2012). Bu nedenle kanser hücrelerini yok edebilen yüksek enerjili parçacıklar veya dalgalar kullanan bu tedavi yöntemine radyoterapi denir (Mathur v.d., 2015). 20. yüzyılın başlarında, araştırmacılar iyonlaştırıcı radyasyonun terapötik bir ajan olduğu kadar kanserojen olarak da hareket edebileceğini keşfetmişlerdir (Sudhakar, 2009). Radyoterapinin amacı, normal hücreyi düşük dozda radyasyona maruz bırakırken, kanserli hücreyi yüksek dozda radyasyona maruz bırakmaktır. Bu şekilde kanser hücrelerinin onarım sistemi bozulur ve kanser hücreleri ortadan kaldırılır (Begg v.d., 2011). Örneğin, kemoterapi ve radyoterapi kombinasyonunun lokal olarak ilerlemiş pankreas kanseri olan hastalarda sağkalımı tek başına kemoterapiden daha iyi iyileştirdiğini gösteren bir çalışma bulunmaktadır (Loehrer v.d., 2011). Yine başka bir çalışmada ise, sürekli sistemik kemoterapiye kıyasla radyokemoterapi eklenmesi, lokalize olmuş ileri pankreas kanseri olan hastalarda sağkalımı uzatmamıştır (Takaori v.d., 2016). Bu nedenle, radyokemoterapinin hayatta kalmaya katkıda bulunup bulunmadığını görmek için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Kamisawa v.d., 2016).

#### *1.9.5.5. Hedefe yönelik tedavi*

Reseptörler, büyüme faktörleri, kinaz kaskadı, apoptoz ve anjiyogenezde yer alan moleküller normalde sağlıklı dokularda bulunur, ancak kanser meydana geldiğinde ya birikime ya da mutasyona uğrarlar. Bu nedenle inhibe edilmeleri gerekmektedir (Hanahan ve Weinberg, 2011). Spesifik olarak sadece kanser hücrelerini hedefleyen bu tedavi yöntemine hedefli tedavi denir. Hedefe yönelik tedavinin amacı, normal hücrelere zarar vermeden tümör büyümesini engellemektir (Padma, 2015). Hedefe yönelik tedavi,

monoklonal antikörlerin veya küçük moleküllü inhibitörlerin kullanılmasıyla gerçekleşir (Gerber, 2008). Örneğin, ilerlemiş pankreas kanseri olan hastalarda, tirozin kinaz reseptörünü hedef alan erlotinib'in gemsitabine eklenmesiyle, tek başına gemsitabine kıyasla sağkalımı önemli ölçüde arttırdığı gözlemlenmiştir (Moore v.d., 2007). Ayrıca Salirasib, güçlü bir RAS inhibitörü ve sentetik küçük bir moleküldür. Bunu hücre zarından aktif RAS proteinlerini parçalayarak yapar. Bu nedenle gemsitabine salirasibinin eklenmesi pankreas kanseri için etkili bir tedavi olduğu düşünülmektedir (Bustinza-Linares v.d., 2010).

## 1.10. BOR

### 1.10.1. Borun Kimyasal Yapısı

Bor, metaloid ailesine ait atom numarası 5 olan ve molekül ağırlığı 10.81 g/mol olan doğal bir üründür (Panza ve Prospero, 2012). Ayrıca, bor bir Lewis asidi gibi davranır. Boş bir p orbitaline sahiptir ve elektrofiliktir. Bu nedenle biyolojik nükleofillerle koordineli bir kovalent bağ oluşturma yeteneğine sahiptir (Fernandes v.d., 2019). Ayrıca doğada element halinde bulunmaz, sodyum ve oksijen ile birleşerek bileşikler oluşturur (Uluisik v.d., 2018). Bor metali içeren bazı borat örnekleri şunlardır; Borik Asit, Bor Oksit, Sodyum Perborat Monohidrat, Sodyum perborat tetrahidrat, ...vb (Khaliq v.d., 2018).



Şekil 1.10. Gıda Ve İlaç İdaresi Tarafından Onaylanmış Bor İçeren İlaçlar (Fernandes v.d., 2019)

### 1.10.2. Borun Faydaları Ve Kaynağı

Bor, hayvanlar ve insanlar için gerekli bir besin maddesidir (Devirian ve Volpe, 2003). Borun ana kaynakları toprak ve sudur (Samman v.d., 1998). Sıklıkla cam, deterjan ve tarımda kullanılmaktadır (Pahl v.d., 2001). İnsanlar günlük yaşamlarında bor içeren birçok ürünü sebze, meyve ve kuruyemiş yoluyla tüketmektedir (Khaliq v.d., 2018). Ancak yüksek dozlarda alındığında akut ve kronik toksisite semptomlarına neden olmaktadır. Akut semptomlar olarak en sık kusma, ishal ve mide bulantısı görülmektedir. Kronik semptomlarda ise iştah ve kilo kaybı, seminal hacimde azalma ve cinsel aktivitede azalma gibi durumlar çoğunlukla gözlemlenmektedir (Hadrup v.d., 2021). Bor vücutta borik asit şeklinde bulunur (Hunt, 1998). İnsan vücudundaki toplam bor içeriği, kemiklerde, saçta ve tırnaklarda yüksek konsantrasyonlarda ve vücut sıvılarında (kan, serum ve idrar gibi) düşük konsantrasyonlarda bulunduğundan 3 ila 20 mg arasında değişmektedir (Devirian ve Volpe, 2003). Bor; bitki, insan ve hayvan sağlığı dahil olmak üzere birçok organizmada biyolojik fonksiyonlarda önemli bir rol oynamaktadır (Ulu v.d., 2022 ). Ayrıca, doku onarımını ve yenilenmesini uyarır (Benderdour v.d., 2000). Ek olarak, bor embriyogenezde (Eckhert ve Rowe, 1999), bağışıklık tepkisinde (Hunt, 2003), beyin ve psikolojik fonksiyonda (Penland, 1998) önemli bir rol oynamaktadır. Kalsiyum, D vitamini ve fosfor gibi mineral grupları ile etkileşime girdiği için kemik oluşumunda ve korunmasında önemli bir işleve sahiptir (Ghanizadeh v.d., 2014). Diğer bir göze çarpan özelliği ise anti-mikrobiyal etkiye sahip olmasıdır (Şezanka ve Sigler, 2008). Bor; toksik, oksidan ve oksidatif stres etkilerine neden olan hastalıklara karşı koruyucu etkiye sahiptir (Ayhanci v.d., 2020). Örneğin borik asit, hepatotoksistide antioksidan ve anti-apoptotik etkilere sahiptir (Sogut v.d., 2018). Sodyum perborat tetrahidratın (SPT), UV radyasyona maruz kalan insan keratinositleri üzerinde apoptoza karşı koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Abdik, 2022). Bor bileşikleri, antiinflamatuvar özelliklere sahiptir ve ayrıca menopozdan sonra östrojen seviyelerindeki düşüşü telafi etmek için çalışırlar (Mahabir v.d., 2008). Yapılan araştırmalarda, borik asidin ağızdan düşük dozlarda alınması vücut ağırlığını azalttığı için borik asit ile obezite arasında bir ilişki olduğuna dikkat çekilmiştir (Aysan v.d., 2013). Ayrıca, bor açısından zengin bir diyetin, sağlıklı yaşlanmayı ve uzun ömürlülüğü desteklediği öngörülmektedir (Nielsen , 2018). Bor eksikliği canlılar arasında önemli sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Örneğin, hayvanlar aleminde, hem Afrika pençeli kurbağasında (Fort v.d., 2002) hem de zebra

balığında (Rowe ve Eckhert, 1999) bor eksikliği, üremeyi ve embriyonik gelişimi olumsuz etkilediği gösterilmiştir.

### **1.10.3. Borun Anti-Kanser Aktivitesi**

Bor, prostat, meme, rahim ağzı ve akciğer kanseri gibi birçok kanser türü için bir kemoterapi ajanı olarak temsil edilmektedir (I Scorei ve Popa, 2010). Borik asit, hücre göçünü ve invazyonu önleyebilir ve ayrıca insan kanseri prostat hücre hatlarının çoğalmasını azaltabilmektedir (Barranco v.d., 2009). Ek olarak, borik asit, prostat kanseri hücrelerinde oksidatif strese, artmış apoptoza ve hücre büyümesinin inhibisyonuna neden olur (Hacioglu v.d., 2020). Prostat kanseri için diyetle kullanılan bor, steroid hormon seviyelerini düzenleyebilir, bu nedenle diyetle bor alımının artırılması, prostat kanseri riskinin azalmasına yol açmaktadır (Cui v.d., 2004). Bor alımı rahim ağzı kanseri ile ilişkili hücre patolojik belirtileri azalttığı için rahim ağzı kanserini etkilemektedir (Korkmaz v.d., 2007). Bor bileşiklerinin kanser tedavisindeki en önemli özelliklerinden biri programlanmış hücre ölümünü uyarması ve hücre bölünmesini önlemesidir (I Scorei ve Popa, 2010). Örneğin, bir bor türevi olan SPT'nin, tümör baskılayıcı ve proapoptotik genlerin ekspresyonunu uyararak ve anti-apoptotik genlerin ekspresyonunu inhibe ederek apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Cebeci v.d., 2022). Ayrıca SPT, zoledronik asit (ZOL) ile birleştirilip kanser hücrelerine uygulandığında proliferatif etkiye sahip olan NF-KB ifadesi azalmaktadır (Abdik, 2021). Proteazom inhibitörü PS-341 (Bortezomib) ise, skuamöz hücreli karsinomda NF-kB yolunun aktivasyonunu inhibe eder (Sunwoo v.d., 2001). Ek olarak, Borik asidin AKT sinyal yolunu inhibe etme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Kahraman ve Göker, 2022). Borun diğer bir avantajı ise birkaç bor bileşiğinin, sağlıklı hücre hatları için toksik olmayan potansiyele sahip olmasıdır (Alak v.d., 2019). Örneğin, SPT'nin insan normal akciğer fibroblastı MRC-5 hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Cebeci v.d., 2022).

### **1.11. AMAÇ**

Pankreas kanserinin şiddetli ve agresif bir kanser olduğu bilinmektedir. Birçok tedavi seçeneği vardır, ancak etkili değildir, bu nedenle yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç vardır. Bor, insan sağlığı için yararlı en önemli minerallerden birisidir. Borun insan sağlığında birçok avantajı vardır: doku onarımı ve rejenerasyonunu sağlar, kemik sağlığını iyileştirir, bağışıklık tepkisini artırır, beyin sağlığını ve hormon dengesini korur. Ek olarak, birçok

kanserin tedavisine katkıda bulunduğu ve kanserin gelişimini azalttığı gösterilmiştir. Bu nedenle bu tezin amacı, SPT'nin pankreas kanseri hücresi MIAPaCa-2 üzerindeki etkilerini proliferasyon ve apoptoz açısından değerlendirmektir.

## **2. MATERYAL VE YÖNTEMLER**

### **2.1. Hücre Kültürü**

MIAPaCa-2, 65 yaşındaki beyaz bir erkekten alınan pankreas neoplastik dokusundan türetilen bir epitel hücre hattıdır. MIAPaCa-2 hücre hattı, Kültür Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nden temin edilmiştir. MIAPaCa-2, %1 penisilin/streptomisin/amfoterisin (PSA) ve %10 fetal sıgır serumu (FBS) ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle's yüksek glikozlu besiyerinde (DMEM,Gibco,UK) kültürlenmiş ve %5 CO<sub>2</sub>, 37 °C'de inkübe edilmiştir. Hücrelerin pasajı %0.25 Tripsin/EDTA (Gibco,UK) uygulanarak yapılmıştır. SPT, Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümünden temin edilmiştir. SPT odanın sıcaklığında saklanır.

### **2.2. Hücre Açma, Hücre Pasajlama ve Hücre Dondurma Protokolü.**

MIAPaCa-2 hücrelerinin bulunduğu kriyovial tüp -80 dereceden çıkarılmış ve daha sonra hızla çözülmüştür. Ardından, tüm hücreler kriyovial tüplerden almış ve önceden 5 ml besiyeri içeren 15 ml'lik bir falkon içerisine koyularak 1500 rpm 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj tamamlandıktan sonra süpernatat atılmış ve pellet 1 ml DMEM besiyerinde çözülmüştür. Ardından, istenilen miktarda hücre alınarak besiyeri içeren yeni bir flaska eklenmiş ve inkübatöre bırakılmıştır. Sonrasında, hücre ~%70-80 büyüme oranına ulaştığında pasajlanmıştır. Bunun için ilk önce hücrelerin üzerindeki besiyeri atılmış, ardından 1X fosfat tamponlu tuz (PBS) eklenerek yıkanmıştır. Yıkama sonrasında, %0.25 Tripsin/ EDTA eklenmiş ve uygun koşulları sağlayan bir inkübatöre aktarılıp 4 dakika beklendikten sonra mikroskop altında hücrelerin kalkıp kalkmadığı kontrol edilmiştir. Hücreler kalktıktan sonra eklediğimiz Tripsin kadar taze besiyeri eklenerek hücreler serolojik pipet yardımıyla toplanmış ve santrifüj için hazır hale getirilmiştir. Santrifüjleme aşaması tamamlandıktan sonra süpernatant atılarak pellet 1 mL DMEM-yüksek glikozlu besiyeri içinde çözülmüştür. Daha sonra ihtiyacımız kadar hücre yeni bir flaska aktarılmış

ve mikroskop altında kontrol edilmiştir. Ancak hücrelerin dondurulması gerekiyorsa hücre pasajı için yapılan adımlar uygulanarak sadece DMEM besiyerinde çözdürmek yerine dondurma besiyeri ortamında çözülmüştür. Dondurma besiyeri %10 dimetil sülfoksit (DMSO) ve %90 FBS'den oluşmuştur. Dondurma besiyerinde çözdürülen hücreler, kriyovial tüpe aktarılarak ardından -80 °C'de saklanmıştır.

### **2.3. Sodyum Perborat Tetrahidratın (SPT) Hazırlanması**

1 mg / ml konsantrasyonlu sodyum perborat tetrahidrat stoğu tartılır ve ideal bir konsantrasyonda olacak şekilde uygun miktarda besiyerinde çözülür. Daha sonra tamamen çözülmesi için vortekslendi ve kullanılmadan önce 0.22µm filtreden geçirildi. Kullanılacak SPT her deneyden önce taze olarak hazırlandı.

### **2.4. Hücre Canlılık Analizi (MTT Testi)**

MTT reaktifi, canlı hücrelerin mitokondriyal iç zarının yanı sıra hücre zarından geçebilen bir Tetrazolyum tuzudur (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür)( Ghasemi v.d., 2021). Bu reaktif, canlı hücrelerde 37°C'de dehidrogenaz enzimi tarafından çözünmeyen bir formazan boyasına indirgenir. Ayrıca çözünmeyen formazan tuzu, çözüldürücü ajanların eklenmesiyle çözülmektedir (Kamiloglu v.d., 2020). MTT deneyi, 96 kuyucuklu tabakların her kuyusuna 5.000 hücre olacak şekilde ekilerek gece boyunca 37 °C'de ve %5 karbon dioksitte bir inkübatöre yerleştirilmiştir. 24 saat sonra hücreler farklı dozlarda ilaca (750-500-250-125-62,5 µg/ml) maruz bırakılmış ve 24, 48 ve 72 saat sürelerde sonuç almak için inkübatöre yerleştirilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra, 96 kuyucuklu bir tabağın her bir kuyucuğuna 10 uL/kuyu MTT ( 5 mg MTT için 20 mL 1XPBS) reaktifi eklenmiş ve 37 °C, %5 CO<sub>2</sub>'de bir inkübatörde 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sona erdikten sonra besiyeri her kuyucuktan çekilmiş ve her kuyucuğa 100 uL DMSO eklenerek 5 dakika karanlık ortamda bırakılmıştır. Ardından, 570 nm'deki absorbans, iMark tm mikropılaka okuyucusu (Bio-Rad) kullanılarak değerlendirilmiştir.

### **2.5. Apoptoz Analizi**

Annexin V/ Propidyum iyodür (PI) protokolü, apoptotik hücrelerin çalışmasında yaygındır (Rieger v.d., 2011). Normal hücrelerin iç zarlarında fosfatidilserin eksprese ettikleri için doğal olarak hidrofobik oldukları ilkesine dayanmıştır. Ancak hücreler apoptoz

geçirdiğinde, iç zar döner ve böylece dış zar yüzeyinde fosfatidilserin görüntülenir, bu da Annexin V'e bağlanmayı kolaylaştırır (Lakshmanan ve Batra , 2013). Annexin V'in fosfolipid ile ilişkili proteinler ailesine ait olduğu ve Kalsiyum (2+) iyonlarının varlığında fosfatidilserin'e bağlandığı bilinmektedir (Reutelingsperger ve Van Heerde, 1997) . Ayrıca PI nükleer bir boyadır ve zarın geçirgenliğine bağlı olarak hücrelere girme özelliğine sahiptir. PI, bozulmamış bir plazma zarının varlığı nedeniyle canlı veya erken apoptotik hücreleri boyamamaktadır. Bununla birlikte, geç apoptotik ve nekrotik hücrelerde, plazma ve nükleer zarların bütünlüğü azalmış ya da direkt bozulmuştur. Bu yüzden de PI hücre zarından geçip boyar (Rieger v.d., 2011) . İlk olarak, 6 kuyucuklu tabakların her kuyusuna 150.000 hücre ekilmiştir. 24 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra, hücreler 62.5 ve 125 µg/ml SPT ile muamele edilmiş ve 24 saat boyunca inkübatörde bırakılmıştır. Hücreler birinci grup negatif kontrol (ilaçsız), ikinci grup 62,5 ug/ml SPT ve üçüncü grup 125 ug/ml SPT olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. İnkübasyon süresi sona erdiğinde hücreler toplanmış ve 1 mL 1XPBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti elde edilmiştir. Her bir hücre grubuna 200 ul bağlama tamponu uygulanarak hücre pelleti çözdürülmüştür. Kontrol grubu, biri boyalı ve biri boyasız olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Boyalanmamış kontrol grubu hariç her gruba 5ul Annexin V-FITC eklenerek karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinden sonra boyanmamış kontrol grubu hariç her gruba 5ul PI eklenmiştir. Ardından, sonuçlar bir akış sitometre sistemi ( BD Accuri™ C6 ) kullanılarak analiz edilmiştir.

## **2.6. Hücre Döngüsü Analizi**

Hücreler farklı dozlarda ilaçla muamele edildikten sonra hücrelerin hangi evrede olduğunu belirlemek için hücre döngüsü analizi kullanılmıştır. İlk olarak, 6 kuyucuklu tabakların her kuyusuna 150.000 hücre ekilmiştir. 24 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra, hücreler 62.5 ve 125 µg/ml SPT ile muamele edilmiş ve 24 saat boyunca inkübatörde bırakılmıştır. Hücreler birinci grup negatif kontrol (ilaçsız), ikinci grup 62,5 ug/ml SPT ve üçüncü grup 125 ug/ml SPT olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. İnkübasyon süresi sona erdiğinde hücreler toplanmış ve 1 mL 1XPBS çözeltisi ile yıkanmıştır. Sonrasında süpernatant uzaklaştırılmış ve hücre pelleti elde edilmiştir. Hücreleri fikse etmek için her hücre grubuna 1 mL %70 etanol eklenmiş ve -20°C'de 2 saat bırakılmıştır. İnkübasyon süresinden sonra, etanolün atılması için santrifüj tekrarlanmıştır. Daha sonra hücreler 1 mL

1XPBS ile yıkanmış ve santrifüjleme işlemi bir kez daha tekrarlanarak süpernant atılmıştır. Her hücre grubuna 460 uL 1XPBS, 20 uL RNaz (2 mg/ml) ve 20 uL PI'den oluşan bir solüsyon eklenerek pellet çözdürülmüş ve hücreler 30 dakika inkübatörde bırakılmıştır. Sonuçlar akış sitometre sistemi (BD Accuri™ C6) kullanılarak analiz edilmiştir.

## **2.7. Mikroskop Aracılı Yöntemler**

### **2.7.1. Işık Mikroskobu**

İlk olarak, 6 kuyucuklu tabakların her kuyusuna 150.000 hücre ekilmiştir. 24 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra, hücreler 62.5 ve 125 µg/ml SPT ile muamele edilmiş ve 24 saat boyunca inkübatörde bırakılmıştır. Hücreler birinci grup negatif kontrol (ilaçsız), ikinci grup 62,5 ug/ml SPT ve üçüncü grup 125 ug/ml SPT olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. İnkübasyon bitiminden sonra, meydana gelen morfolojik değişiklikleri tespit etmek için hücreler, ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

### **2.7.2. Floresan Mikroskobu**

#### *2.7.2.1.3, 3'-Diheksiloksakarbosiyenin iyodür (DIOC6) Boyama*

İlk olarak, 6 kuyucuklu tabakların her kuyusuna 150.000 hücre ekilmiştir. 24 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra, hücreler 62.5 ve 125 µg/ml SPT ile muamele edilmiş ve 24 saat boyunca inkübatörde bırakılmıştır. Hücreler birinci grup negatif kontrol (ilaçsız), ikinci grup 62,5 ug/ml SPT ve üçüncü grup 125 ug/ml SPT olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. 24 saatin sonunda eski besiyeri kaldırılmıştır ve her bir kuyuya 1 ml taze besiyeri ve her bir kuyuya 8 ul seyreltik DIOC6 boyası (1 ul boya : 9 ul besiyeri) eklenmiştir. Daha sonra 37°C'de 15 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, 482 nm'de Eksitasyon ve 502 nm'de Emisyon ile mavi bir filtre üzerinde görüntü elde etmek için invert floresan mikroskobu kullanıldı. Yeşil renk göstergesi mitokondriyal membran potansiyelinin varlığını gösterdi.

#### *2.7.2.2. Propidyum İyodür (PI) Boyama*

İlk olarak, 6 kuyucuklu tabakların her kuyusuna 150.000 hücre ekilmiştir. 24 saatlik bir inkübasyon süresinden sonra, hücreler 62.5 ve 125 µg/ml SPT ile muamele edilmiş ve 24 saat boyunca inkübatörde bırakılmıştır. Hücreler birinci grup negatif kontrol (ilaçsız), ikinci grup 62,5 ug/ml SPT ve üçüncü grup 125 ug/ml SPT olmak üzere üç gruba ayrılmıştır. 24

saat sonra eski besiyerini değiştirmeye gerek kalmadan her kuyucuğa 1 µl PI boyası eklenmiştir. Daha sonra 37 °C'de 10 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra, 493 nm'de Eksitasyon ve 636 nm'de Emisyon ile yeşil bir filtre üzerinde görüntü elde etmek için invert bir floresan mikroskobu kullanıldı. Ölü hücrelerin varlığı kırmızı renkle gösterildi.

## **2.8. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time-PCR) Analizi.**

125 µg/ml'de SPT'nin etkisi altında apoptozla ilişkili genlerin (Kaspaz 9, BAX) ve tümör baskılayıcı genlerin (P53) mRNA ekspresyonunu belirlemek için qPZR analizi kullanılmıştır. Başlangıçta, hücreler 6 kuyucuklu tabaklara (100.000 hücre/kuyu) ekilerek hücrelerin tutunması için 24 saat inkübatörde bekletilmiştir. 24 saatin sonunda kültüre edilen hücrelere 125 µg/ml SPT eklenerek ve 24 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından, yüksek saflıkta bir RNA izolasyon kiti (Roche, ABD) kullanılarak total RNA izole edilmiştir. Bu kite dayalı olarak, belirli bir RNA izolasyon protokolü izlenmiştir. İlk olarak, her grup için hücreler, 1X PBS eklenerek süspansiyon edilmiştir. Daha sonra lizis/bağlama solüsyonu eklenerek birkaç kez vortekslenmiştir. Vortekslendikten sonra filtreli tüpe aktarıldı ve santrifüjlendi. Daha sonra bir filtre tüpüne DNaz Tamponu eklenmiş ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra yıkama tamponuyla 3 defa yıkanıp santrifüjlenmiştir. Ardından süpernant atılmış ve elüsyon tamponu eklenip santrifüjlenmiştir. Son olarak, RNA içeren kısım Nanodrop 2000 ile ölçülmüştür. İzole edilen total RNA daha sonra yüksek doğrulukta bir cDNA sentez kiti (Roche, ABD) kullanılarak cDNA sentezi için kullanılmıştır. Ayrıca bu kit, aşağıdaki adımları içeren özel bir cDNA sentez protokolü de içermektedir. PZR tüpüne 11 µl dH<sub>2</sub>O ve örnek eklenmiştir. Ayrıca, bir PZR tüpüne 2 µL random hegzamer primeri eklenmiş, ardından 65 °C'de 10 dakika boyunca bir termal cycle cihazına yerleştirilmiştir. Daha sonra 4 ul reaksiyon tamponu, 0.5 ul RNAse inhibitörü, 2 ul dNTP ve 0.5 ul ters transkriptazdan oluşan karışım hazırlanmıştır. 10 dakika sonunda karışım solüsyonundan 7 µL alınarak her örneğe eklenmiş ve spesifik PZR koşulları altında termocyclerda döndürülmüştür. Reaksiyon bittikten sonra örneğe 80 µL dH<sub>2</sub>O eklenmiştir. Daha sonra 5 ul SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems TM), 0.5 ul forward dizisi ve 0.5 ul reverse dizi içeren ilgili genler için spesifik primerler (Tablo 2.1) ve 2 ul distile sudan oluşan bir karıştırma solüsyonu hazırlanarak qPZR gerçekleştirilmiştir. qPZR plakasına 8 µL karışım ve 2 µL

örnek (cDNA) eklenmiştir. Ardından plakayı qPZR koşulları altında iCycler qPZR Sistemine (CFX96 RTPCR Sistemi, Bio-Rad, Hercules, CA) yerleştirmiştir (Tablo 2.2). 18S housekeeping gen olarak kullanılmıştır.

**Tablo 2.1: qPZR Analizinde Kullanılan Primerler**

Primer adı	Primer dizisi
Kaspaz -9	F5'GTGAACTTCTGCCGTGAGTC3' R5'CTGACAGCCGTGAGAGAGAA3'
BAX	F5'TGCAGAGGATGATTGCCGCCG3' R5'ACCCAACCACCCTGGTGTGG3'
P53	F5'GCCCAACAACACCAGCTCCT3' R5'CCTGGGCATCCTTGAGTTCC3'
18S	F5'GTAACCCGTTGAACCCATT3' R5'CCATCCAATCGGTAGTAGCG3'

**Tablo 2.2: qPZR Koşulları**

Basamak Adı	Sıcaklık(°C)	Süre	Tekrar Sayısı
İlk Denatürasyon	95°C	5dk	1
Denatürasyon	95°C	0:15 sn	36
Bağlanma	59°C	0:30 sn	
Uzama	72°C	0:30 sn	
Son uzama	72°C	10dk	1

<b>Erime Eğrisi</b>	-0.5°C/ döngü	12sn	110
---------------------	---------------	------	-----

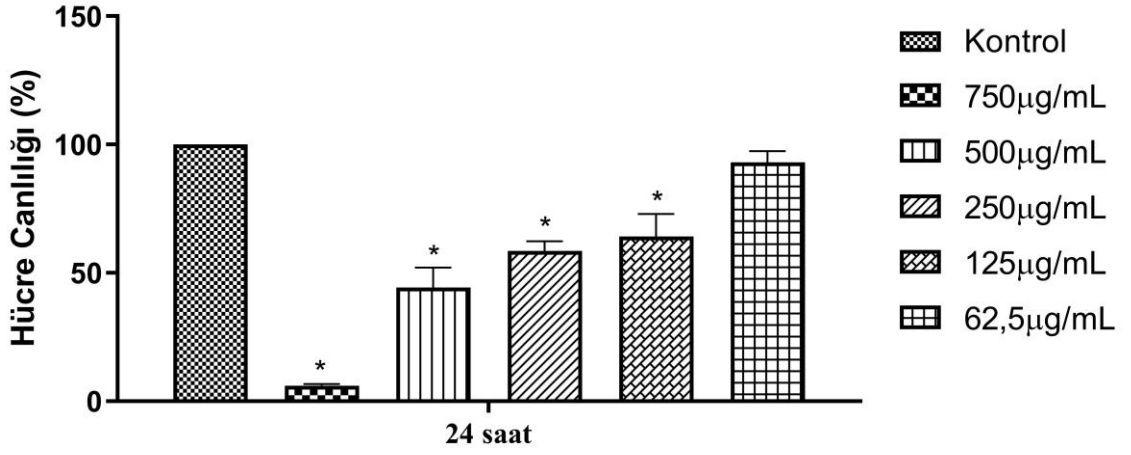
## 2.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel olarak değerlendirmek için tüm deneysel verilere tek yönlü varyans analizi ve Tukey post hoc testleri uygulanmıştır. \*P<0.05 değerleri anlamlı kabul edilmiştir.

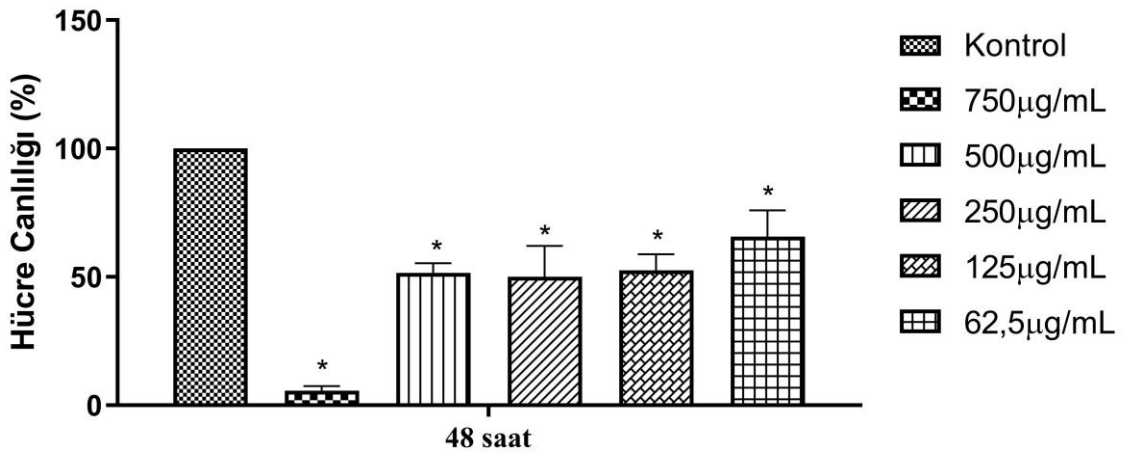
## 3. SONUÇLAR

### 3.1. Hücre Canlılık Analizi

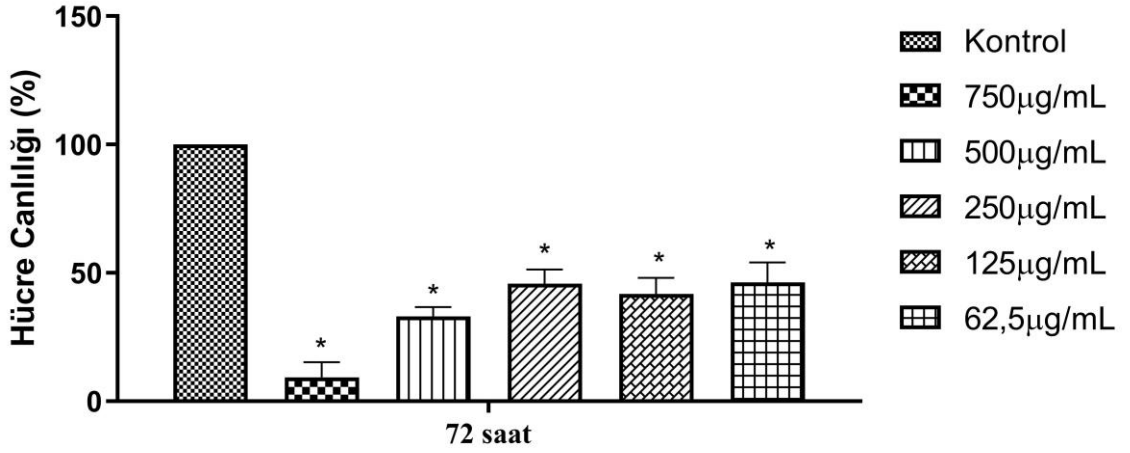
Farklı SPT konsantrasyonlarının pankreas kanseri hücrelerinin (MIAPaCa-2 hücreleri) canlılığı üzerindeki etkileri 24, 48 ve 72 saat aralıklarla uygulanan MTT testi ile belirlendi. 24 saatlik süre içinde farklı SPT konsantrasyonları (750, 500, 250, 125 ve 62.5 µg/ml) uygulandığında, hücre canlılığının sonucu sırasıyla %10, %47, %60, %70 ve %93 şeklindedir (şekil 3.1). 48 saatlik süre boyunca SPT konsantrasyonları uygulandığında ise hücre canlılığının sonucu sırasıyla %10, %50, %49, %55, %60 şeklindedir (şekil 3.2). Son olarak, 72 saatlik süre boyunca SPT konsantrasyonları uygulandığında, hücre canlılığının sonucu sırasıyla %14, %30, %48, %45, %48 şeklindedir (şekil 3.3). Bu sonuçlara göre 24 saat sonunda SPT 62,5 µg/mL dışındaki bütün dozlarda hücre canlılığı önemli oranda azalmıştır. Ek olarak, 48 ve 72. saatlerde SPT, tüm dozlarda hücre canlılığında anlamlı bir azalma gösterdi. Sonuç olarak, 750, 500 ve 250 µg/ml gibi yüksek dozlar yerine 62,5 ve 125µg/ml olan düşük dozlar çalışmanın devamında kullanılmak üzere tercih edilmiştir. 125µg/ml SPT dozunun 24 saatte hücreler üzerinde etkisi gözlemlendiği için inkübasyon süresi 24 saat olarak seçilmiştir. Bu dozların da önemli ölçüde hücreleri öldürdüğü ve kanserli hücrelerin büyümesini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (şekil 3.4).



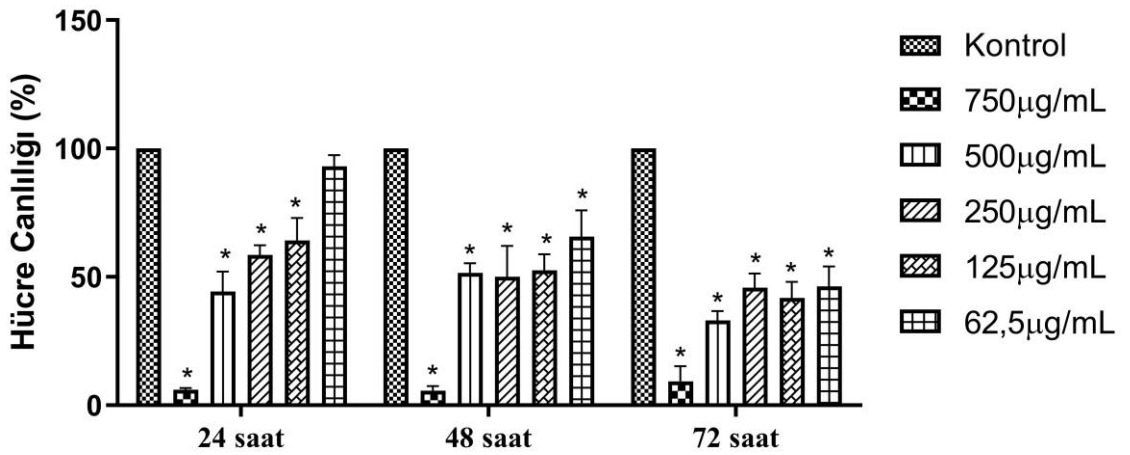
Şekil 3.1. Farklı SPT Konsantrasyonlarının 24 Saatte MIAPaCa-2 Pankreatik Hücre Hattının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi.



Şekil 3.2. Farklı SPT Konsantrasyonlarının 48 Saatte MIAPaCa-2 Pankreatik Hücre Hattının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi.



Şekil 3.3. Farklı SPT Konsantrasyonlarının 72 Saatte MIAPaCa-2 Pankreatik Hücre Hattının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi.

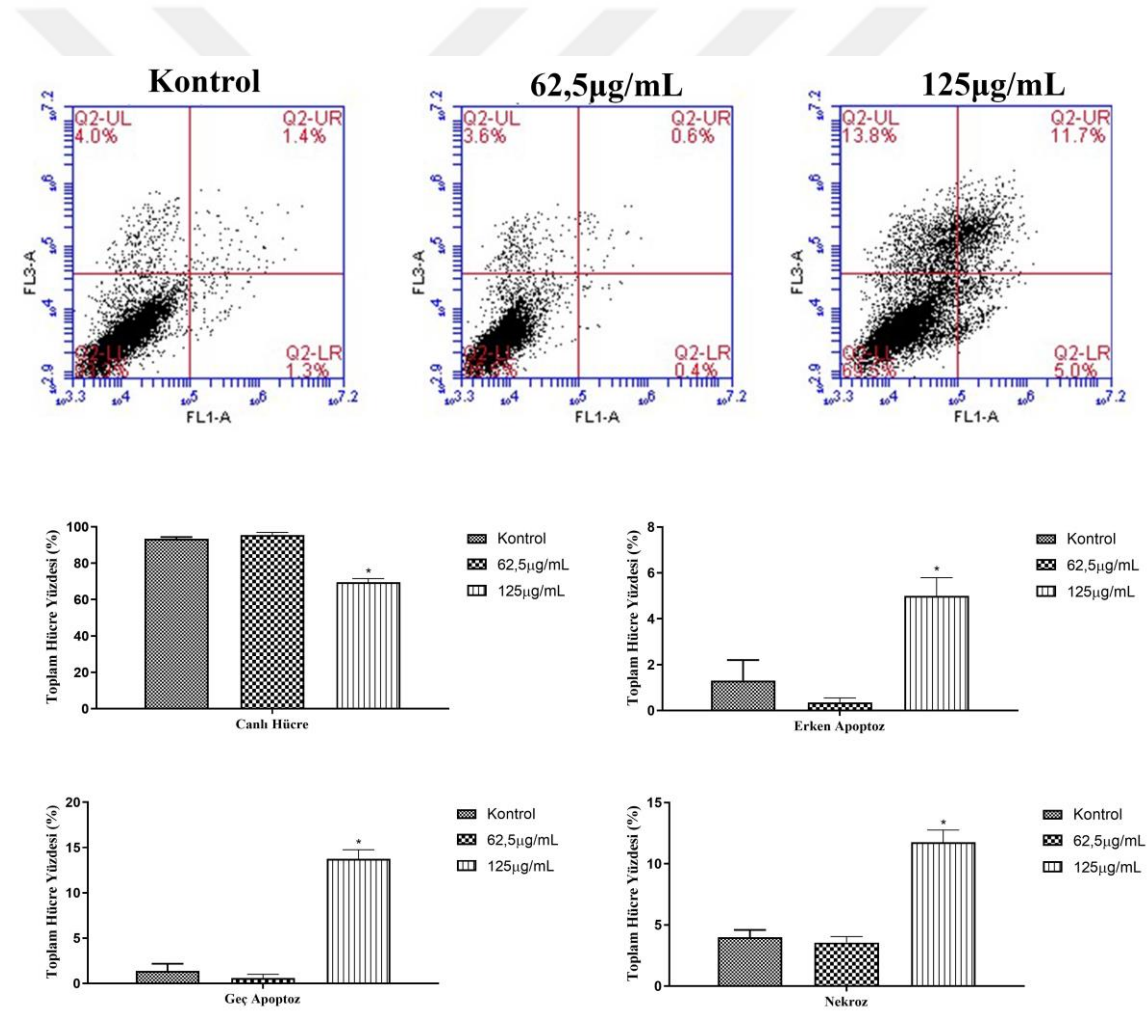


Şekil 3.4. Farklı SPT Konsantrasyonlarının 24, 48 ve 72. Saatlerde MIAPaCa-2 Pankreatik Hücre Hattının Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi.

### 3.2. Apoptoz Analizi

SPT'nin pankreas kanseri hücrelerini apoptoza götürüp götürmediğini araştırmak için Annexin V-PI analizi yapılmıştır. MIAPaCa-2 hücrelerine 62,5 ve 125 µg/ml SPT uygulandıktan 24 saat sonra gruplardaki canlı hücre, erken ve geç apoptotik ve nekrotik hücre oranları belirlendi. Buna göre kontrol, 62,5 µg/ml ve 125 µg/ml gruplarında canlı hücre yüzdesi sırasıyla %93,34, %95,49 ve %69,54 olarak belirlenmiştir. Kontrol, 62,5 µg/ml ve 125 µg/ml gruplarında erken apoptotik hücrelerin yüzdesinin sırasıyla %1,3, %0,4

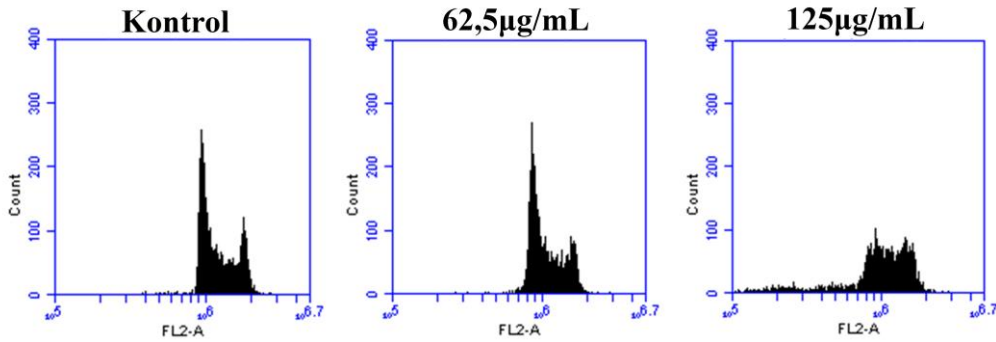
ve %5,0 olduğu belirlenmiştir. Kontrol, 62,5 µg/ml ve 125 µg/ml gruplarında geç apoptoz durumundaki hücrelerin yüzdesi sırasıyla %1,4, %0,6 ve %11,7 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, kontrol, 62,5 µg/ml ve 125 µg/ml gruplarında nekrotik hücrelerin yüzdeleri sırasıyla %4, %3,6 ve %13,8 olarak belirlenmiştir. 62,5 µg/ml grubu ile 125 µg/ml grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; 62,5 µg/ml grubunun sonuçları kontrol grubu ile benzer olurken, 125 µg/ml grubunda apoptotik hücre yüzdesinde anlamlı oranda artış görülmüştür. Yani 125 µg/ml grubunda erken apoptotik, geç apoptotik ve nekrotik hücre yüzdelerinin anlamlı oranda arttığı, canlı hücre yüzdesinin anlamlı oranda azaldığı görülmüştür (şekil 3.5).

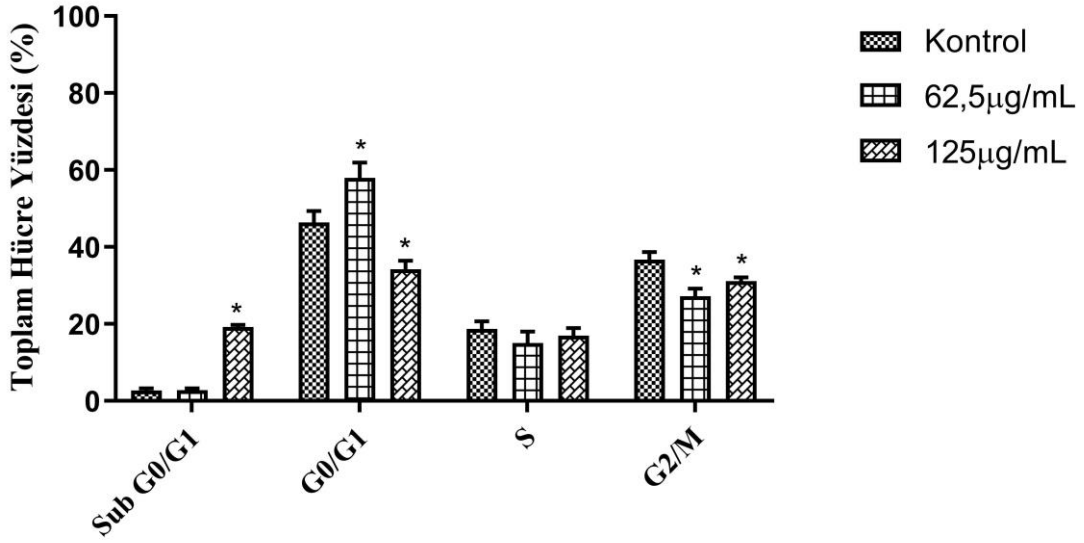


**Şekil 3.5.** 24 Saat SPT Tedavisi Uygulanan MIAPaCa-2 Pankreatik Kanser Hücre Hattındaki Canlı Hücre, Erken Apoptoz, Geç Apoptoz Ve Nekroz Oranlarının Grafiksel Gösterimi.

### 3.3. Hücre Döngüsü Analizi

SPT'nin pankreas kanseri hücrelerini hangi fazda durdurduğunu göstermek için hücre döngüsü analizi yapılmıştır. Bu nedenle MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinin hücre döngüsü dağılımını belirlemek için 24 saat boyunca iki dozda (62,5 ve 125 µg/ml) SPT uygulanmıştır. Kontrol grubunda, apoptotik hücre popülasyonunu temsil eden sub-G0/G1 fazındaki hücrelerin oranı %1,45, G0/G1 fazındaki hücrelerin oranı %42, S fazındaki hücrelerin oranı %19 ve G2/M fazındaki hücrelerin oranı %39 olarak belirlenmiştir. 62,5 µg/mL dozundaki SPT tedavisinden sonra, sub-G0/G1 fazındaki hücrelerin oranı %2,78, G0/G1 fazındaki hücrelerin oranı %57,99 ve S fazındaki hücrelerin oranı %15,08 ve G2/M fazındaki hücrelerin oranı %27,18 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 62,5 µg/mL SPT uygulaması yapılan hücrelerde, G0/G1 fazındaki hücre yüzdesinin arttığı ve G2/M fazındaki hücre yüzdesinin azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte, 125 µg/ml SPT tedavisinden sonra subG0/G1'deki hücrelerin oranı %19,19, G0/G1 fazındaki hücrelerin oranı %34,18, S fazındaki hücrelerin oranı %16,95 ve G2/M'deki hücrelerin oranı %31,15 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, 125 µg/mL SPT uygulamasının, subG0/G1 fazındaki hücre yüzdesini önemli ölçüde arttırdığı ve G0/G1 ve G2/M fazlarındaki hücre yüzdesini düşürdüğü görülmüştür. 125 µg/mL SPT dozunda subG0/G1 fazındaki hücre yüzdesinin artmasının apoptoz sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür (şekil 3.6).

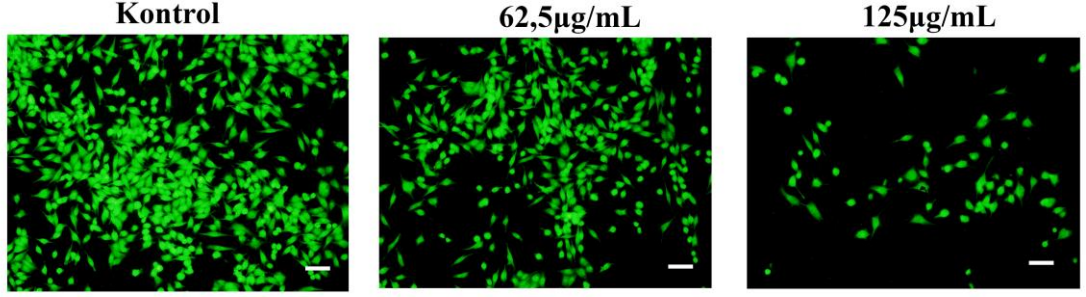




Şekil 3.6. 24 Saat SPT Tedavisi Uygulanan MIAPaCa-2 Pankreatik Kanser Hücre Hattındaki Hücre Döngüsü Faz Dağılımı.

### 3.4. DIOC6 Boyası

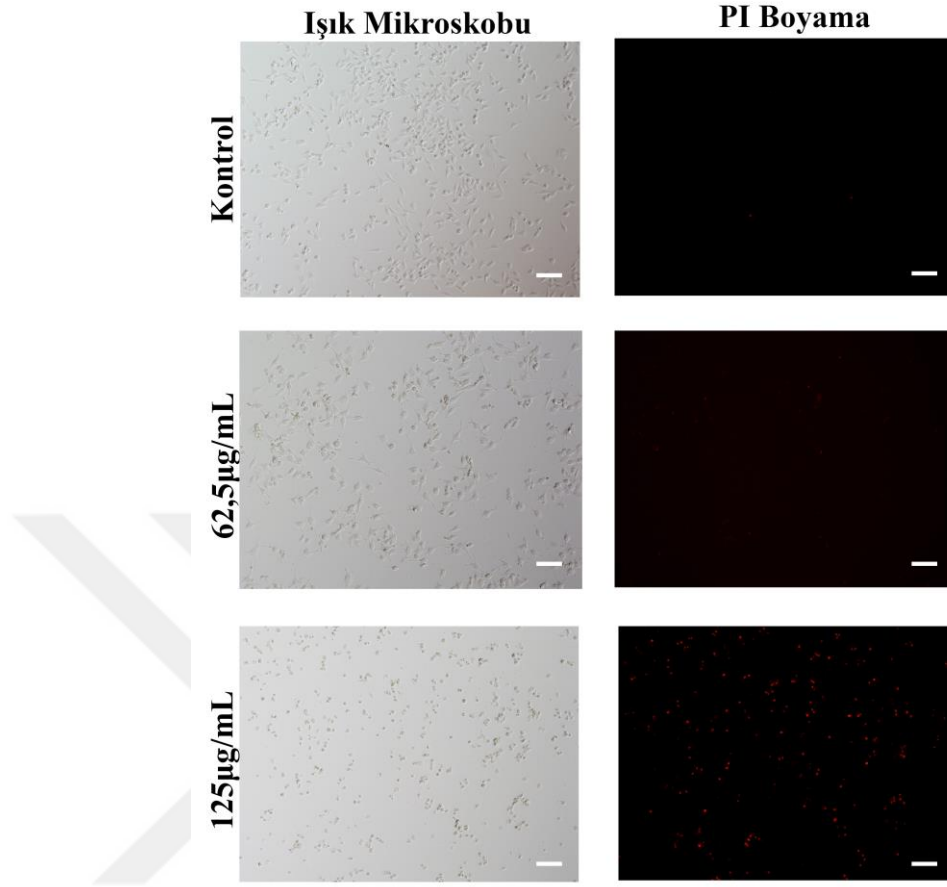
Önceki bulgulara dayanarak, SPT'nin MIAPaCa-2 pankreatik kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü gözlenmiştir. Buna ek olarak, SPT'nin mitokondriyal membran potansiyeli üzerindeki etkisini incelemek için DIOC6 boyaması yapılmıştır. Kontrol grubunda DIOC6 boyasının floresan yoğunluğunun yüksek olduğu görülürken, 62.5 µg/mL SPT'de DIOC6 boyasının floresan yoğunluğunun kontrol grubuna göre biraz daha az olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, 125 µg/ml SPT'de, DIOC6 boyasının floresans yoğunluğunda kontrol grubuna göre önemli bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bu da hücrelerin apoptoza gitmesiyle mitokondriyal membran potansiyeli arasında bir ilişkili olduğunu göstermektedir (şekil 3.7).



**Şekil 3.7.** 24 Saat SPT Tedavisi Uygulanan MIAPaCa-2 Pankreatik Kanser Hücre Hattında DIOC6 Boyası Sonucunda Elde Edilen Floresan Mikroskop Sonuçları.

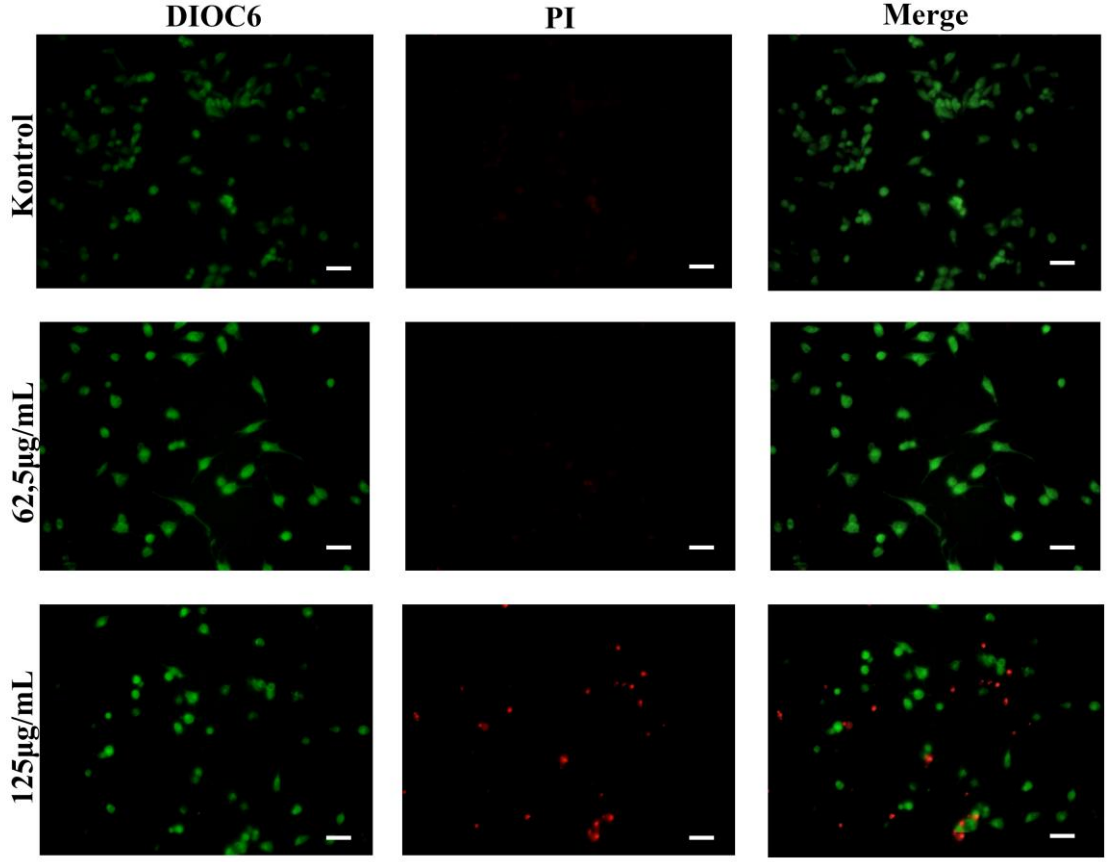
### 3.5. Propidyum İyodür Boyası Ve Işık Mikroskobu

Önceki bulgulara dayanarak, SPT'nin MIAPaCa-2 pankreatik kanser hücrelerini apoptoza götürdüğü gözlenmiştir. Bunu doğrulamak için, ışık mikroskobu altında hücrelerde morfolojik değişikliklerin meydana gelip gelmediğini ve ayrıca PI boyaması yapılarak floresan mikroskop altında apoptotik hücrelerin görülüp görülmediğine bakılmıştır. Kontrol grubundaki hücreler sağlıklı bir hücre morfolojisi gösterdi. Ayrıca 62,5 µg/ml dozunda SPT uygulandığında bu gruptaki hücreler kontrol grubu hücrelerine benzer bir morfoloji gösterirken, 125 µg/ml dozunda SPT uygulandığında bu gruptaki hücreler kontrol grubu hücrelerinden çok farklı bir morfoloji göstermiştir. Bu değişikliklerin en önemlileri arasında hücrelerin küçülmesi, hücrelerin yuvarlaklaşması, DNA fragmentasyonu ve kromatin yoğunlaşması yer almaktadır. Üstelik kontrol grubundaki MIAPaCa-2 hücreleri PI boyaması sonucunda ışığa göstermemişken ve 62,5 µg/ml SPT ile tedavi edilen hücreler kontrol grubuna benzer sonuçlar göstermiştir. Bununla birlikte, hücreler 125 µg/ml SPT ile muamele edildiğinde kontrol grubuna göre, apoptotik hücrelerin çekirdekleri PI ile boyanmıştır (şekil 3.8).



**Şekil 3.8.** Işık Mikroskobu Altında 24 Saatlik SPT Tedavisine Maruz Kaldıktan Sonra MIAPaCa-2 Hücre Hattının Morfolojik Değişikliklerinin Ve PI Boyaması Sonucunda Floresan Mikroskopu Altında Apoptotik Hücrelerin Görüntülenmesi.

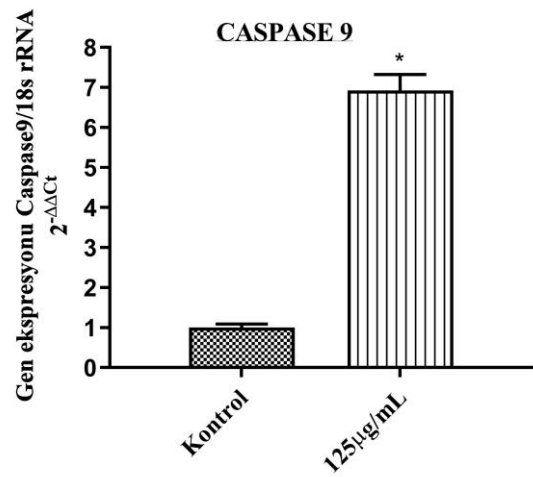
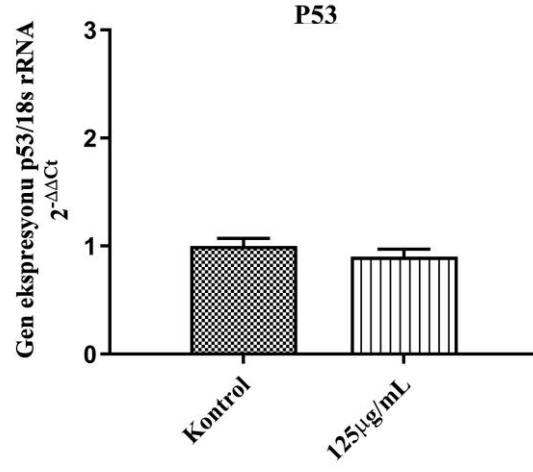
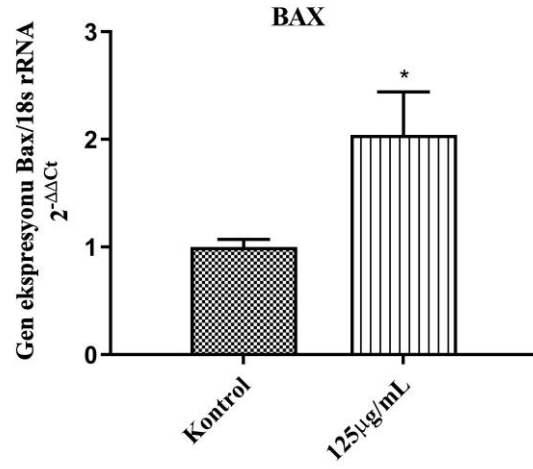
SPT'nin etkisi MIAPaCa-2 hücreleri üzerinde incelendi ve ardından DIOC6/PI boyaları ile boyanmıştır. Kontrol grubundaki hücreler, DIOC6 boyaması sonrası yüksek bir flüoresan yoğunluğu gösterdi ancak PI boyaması sonrası flüoresans ışına görülmedi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 62.5 ug/ml SPT dozuna maruz bırakılan hücrelerde DIOC6 boyaması sonrası floresan yoğunluğunda hafif bir azalma ve PI boyasından sonra ise hafif bir artış gösterdi. Bununla birlikte, 125 µg/ml SPT dozuna maruz bırakılan hücrelerde DIOC6 boyaması sonrasında floresan yoğunluğunda önemli bir azalma ve PI boyaması sonrasında floresan yoğunluğunda önemli bir artış görülmüştür. Bu da 125 µg/ml SPT uygulaması sonrasında programlanmış hücre ölümü meydana geldiğini göstermektedir (şekil 3.9).



**Şekil 3.9.** MIAPaCa-2 Hücre Hattında 24 Saat SPT Tedavisine Maruz Kaldıktan Sonra DIOC6 Ve PI Boyaması Sonucunda Floresan Mikroskobu Altında Hücrelerin Görüntülenmesi.

### 3.6. Kantitatif PZR Analizi

qPZR, 125 µg/ml SPT dozunun etkisi altında MIAPaCa-2'deki apoptozla ilişkili ve tümör baskılayıcı genlerin ifade düzeylerini saptamak için kullanılmıştır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 125 µg/ml SPT uygulaması sonrası BAX ve Kaspaz -9 gibi proapoptotik genlerin ifade seviyeleri önemli ölçüde artarken (sırasıyla 1,9 kat ve 6,9 kat), p53 tümör baskılayıcı geninin ifade seviyesi önemli bir değişiklik göstermemiştir (şekil 3.10).



**Şekil 3.10.** 24 Saat SPT Tedavisi Uygulanan MIAPaCa-2 Pankreatik Kanseri Hücre Hattındaki BAX, P53 ve Kaspaz 9 Gen Ekspresyon Seviyeleri Üzerindeki Etkisinin Grafiksel Gösterimi.

#### 4. TARTIŞMA

Kanser, hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve invazyonu ile karakterize edilen bir hastalıktır (Mathur v.d., 2015). Kanser oluşumu, karsinogenez adı verilen birkaç aşamada gerçekleşir. Bu nedenle karsinogenez, başlama, gelişme ve ilerlemeyi içeren çok adımlı bir süreç olarak tanımlanır. Bu, hücrenin pre-paraneoplastik bir durumdan neoplastik bir duruma geçmesine neden olur (Salvadori v.d., 2013). Metastaz, kansere bağlı ölümlerin birincil nedenidir. Anormal hücrelerin birincil bölgelerini terk edip kan dolaşımına girerek kan damarlarındaki basınca direnmesi, ikincil alandaki yeni hücrel ortama uyum sağlaması ve bağışıklık hücrelerinin yok edilmesinden sağ çıkmasıyla oluşur (Maitra, 2019). Apoptoz, hücre oluşumu oranı ile hücre ölümü arasında homeostatik bir denge sağlamak için ortaya çıkan oldukça düzenlenmiş bir hücre ölümü şeklidir. Apoptoz, dokuların yenilenmesi, enflamatuvar hücrelerin sonlandırılması gibi bir dizi hayati süreçte ve kanser ve nörolojik bozukluklar gibi bir dizi hastalığın önlenmesinde önemli bir rol oynar (Obeng v.d., 2020). Apoptoz mekanizması iki şekilde tetiklenir: dışsal yol ve içsel yol. Dışsal yol, hücre yüzeyi reseptörleri ligandlarına bağlandığında meydana gelirken, içsel yol, aynı hücre içinde dış mitokondriyal zarın geçirgenliğine neden olan farklı apoptotik uyaranlar tarafından aktive edildiğinde meydana gelir. Her iki yol da hücre ölümünden nihai olarak sorumlu olan kaspaz ailesinin aktive olmasına yol açar (Green ve Llambi, 2015).

Pankreas kanseri ileri evrelerde saptanması ve yaşama şansının düşük olması nedeniyle en ölümcül kanserler arasında yer almaktadır (Liu v.d., 2023). Çevresel ve genetik faktörler pankreas kanseri oluşumuna katkıda bulunur (Hruban v.d., 2010). Pankreas kanseri olan hastalarda cerrahi tedavi öncelikli olarak tercih edilir (Evans v.d., 2009). Cerrahi tedavide daha iyi sonuçlar elde etmek için ameliyat öncesi neoadjuvan tedavi (Versteijne v.d., 2020) ve ameliyat sonrası adjuvan kemoterapi (Neoptolemos v.d., 2001) kullanılmaktadır. İkincisi, metastatik pankreas kanseri olan hastalarda kemoterapi bir diğer seçenektir. İki kemoterapinin kombinasyonu, tek bir kemoterapiden daha iyi bir sonuç verir (Von Hoff v.d., 2013). Üçüncüsü, radyasyon tedavisi, kemoradyasyon gibi, lokal olarak ilerlemiş pankreas kanseri olan hastalar için bir seçenektir (Loehrer v.d., 2011). Ancak bazı çalışmalar bunu kabul etmemiştir (Takaori v.d., 2016), bu nedenle daha fazla çalışma ve araştırmaya ihtiyaç vardır (Kamisawa v.d., 2016). Dördüncüsü, hedefe yönelik tedavi;

yalnızca tümör büyümesini hedefler, bu nedenle ilerlemiş pankreas kanseri olan hastalar için en iyi seçenektir (Moore v.d., 2007).

Eser element bor, kimyasal sembol B ile bilinir. 10.81 g/mol atom kütesine ve atom numarası 5'e sahiptir ( Uluisik v.d., 2018). Bor elementi hem hayvanlarda hem de insanlarda önemli bir rol oynar (Devirian ve Volpe, 2003). Bor eksikliği ile hastalıklar arasında bir ilişki vardır (Beattie ve Peace, 1993). Son on yılda, bor türevleri, toksik olmayan yapıları ve kanser önleyici özellikleri nedeniyle kanser önleyici maddeler olarak kabul edilmiştir (Cebeci v.d., 2022). Günlük bor alımı kansere karşı koruyucu etki gösterir ve tümör gelişimini engeller (Barranco v.d., 2009). Bu çalışmada, borun sitotoksik etkisi MTT testi ile belirlendi. MTT testi, temel olarak mitokondriyal enzimlerin aktivitesini ölçerek hücrelerin mitokondriyal fonksiyonunun belirlenmesi yoluyla hücre canlılığını belirler (Aslantürk, 2018). MTT sonuçlarına göre, SPT'nin hücre canlılığında bir azalmaya neden olmuştur. Bu sonuç, bor türevlerinin doza bağlı olarak hücreler üzerinde sitotoksik etkilere sahip olduğunu kanıtlayan diğer çalışmalarla tutarlıdır. Mohammed ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, bor türevleri 500 ug / ml sodyum pentaborat pentahidrat (SPP) ve 50 ug / ml SPT birleştirildi, bu da meme kanseri hücrelerinin çoğalmasının inhibisyonu ile sonuçlandı (Mohammed v.d., 2023).

Fosfatidilserin, apoptotik hücrelerin dış tabakasında bulunan bir proteindir. Annexin-V'nin hücre yüzeyinde PS'ye bağlanma yeteneği olduğu bilinmektedir (Plesca v.d., 2008). Apoptozun erken evresindeki hücreler, plazma zarının bütünlüğü ile karakterizedir ve bu hücreler fagositler tarafından fagositlenir. Ancak bu gerçekleşmezse, plazma zarı kaybı ile karakterize edilen apoptozun geç aşamasına girmeye başlarlar. Bu, PI gibi bazı küçük moleküllerin geçişine izin verir (Stepanek v.d., 2011). Bu nedenle canlı hücreler, hem Annexin V hem de PI yokluğu ile karakterizedir. Erken apoptotik hücreler, Annexin V varlığı ve PI yokluğu ile karakterize olurken geç apoptotik hücreler, hem Annexin V hem de PI varlığı ile karakterizedir (Plesca v.d., 2008). Bu çalışmada, 125 µg/ml SPT ile 24 saatlik muameleden sonra apoptozu belirlemek için yapılan Annexin V/PI testi, MIA PaCa-2 hücrelerinde hem erken hem de geç apoptotik hücre yüzdelerinin önemli ölçüde arttığını ortaya koymuştur. Sonuçlarımızla tutarlı olarak, bor türevlerinin kanser hücrelerinde

apoptoza neden olduğunu gösteren daha önce yapılmış bazı çalışmalar vardır ((Mohammed v.d., 2023); (Cebeci v.d., 2022).

Hücre döngüsü, hücre büyümesini ve bölünmesini düzenleyen bir dizi olayı içerdiğinden, bir hücrenin yaşamı boyunca temel ve önemli bir süreçtir. Hücre döngüsü dört faza ayrılır: nükleik asit öncesi sentez fazını temsil eden G1 fazı, DNA sentez fazını temsil eden S fazı, hücrenin mitoz fazına girmeye hazırlandığı fazı temsil eden G2 fazı, ve hücrenin bölünmesini ve hücresel bileşenlerin aralarında eşit olarak dağılımını temsil eden M fazı (Han-Shu v.d.,2019). Hücre döngüsünün düzensizliği, tümör oluşumunun ayırt edici özelliklerinden biridir (Wang v.d., 2009). Ayrıca, sub-G0/G1 fazı, apoptoz sırasında meydana gelen DNA kaybı fazını temsil eder (Newbold v.d., 2014). Bu çalışmada, SPT'nin hücrelerin hangi fazda durmasına neden olduğuna bakılmıştır. MIAPaCa-2 hücrelerine 125 µg/ml SPT muamelesinde, sub-G1 fazındaki hücre yüzdesi önemli ölçüde artmıştır. Ek olarak, önceki çalışmalar SPT'nin anti-kanser etkisinin olduğunu ve sub-G0/G1 aşamasında hücre durmasına neden olduğunu göstermiştir (Cebeci v.d., 2022).

Bunlara ek olarak, mitokondriyal membran potansiyelini ölçmek için hücrelere DIOC6 boyaması yapılmıştır (Wahi v.d., 2021). Mitokondriyal membran potansiyeli, mitokondrilerin sağlık durumunu ortaya koymaktadır. Mitokondriyal membran bütünlüğünün kaybı anlamına gelen mitokondriyal membran potansiyelinde bir azalma meydana geldiğinde, bu proapoptotik sinyalleşmenin başladığını gösterir (Chang v.d., 2013). Bu çalışmada da 125 µg/ml SPT'nin, mitokondriyal membran potansiyelinde önemli bir azalmaya neden olduğu görülmüştür. SPT'nin etkisine benzer olarak, mitokondriyal membran potansiyelinde önemli bir azalmaya neden olan bazı antikanser ajan örnekleri vardır. Skuamöz hücreli karsinomda mitokondriyal membran potansiyelinde önemli bir azalmaya neden olan Emodin bunlardan birisidir (Wahi v.d., 2021). Bir hücre apoptoz geçirdiğinde, mikroskop altında gözlemlenebilen çeşitli morfolojik değişikliklere uğrar: hücrelerin büzülmesi, hücrelerin dairesel bir şekil alır, DNA parçalanması, kromatin yoğunlaşması ve plazma zarında tomurcuklanma oluşması ( galluzzi v.d., 2007). MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücreleri, 125 µg/ml SPT muamelesinin etkisi altında meydana gelen apoptoz nedeniyle morfolojik değişikliklere uğradığı görülmüştür. Benzer şekilde, akciğer kanseri hücrelerinin, epidermal büyüme faktörü reseptörünün inhibitörü tedavinin etkisi

altında meydana gelen apoptoz nedeniyle morfolojik değişikliklere uğradığı gösterilmiştir (galluzzi v.d., 2007). PI boyası, DNA'yı boyayan kırmızı bir floresan boyadır. Sağlıklı membranlı canlı hücrelerde DNA'yı boyayamazken, yırtılmış membranlı ölü hücrelerde DNA'yı boyayabilir (Stiefel v.d., 2015). Apoptoz, MIAPaCa-2 tümör hücrelerine 125 µg/ml SPT eklendiğinde meydana geldi ve bu ölü hücreler ( apoptotik hücreler ) PI ile tespit edildi (şekil 3.8). İntrinsik veya mitokondriyal apoptoz yolundaki en önemli noktalardan biri, proapoptotik BAX ve BAK'ın aktivasyonu ve bunların mitokondri dış zarına translokasyonudur. Böylece bu zar geçirgen hale gelir. Sonuç olarak, sitokrom c iç mitokondriyal membran boşluğundan salınır ve Apaf-1 reseptörüne bağlanır. Daha sonra procaspase 9 ile ilişkilendirilir, böylece proteazom olarak bilinen kompleks bir protein oluşturulur. Bu kompleksin içinde, aşağı yönde efektör kaspazları aktive eden kaspaz-9 aktive edilir (Dehkordi v.d., 2022). BAX ve Kaspaz-9'un apoptozun içsel sürecine dahil olduğu açıktır, bu nedenle gerçek zamanlı PZR ile 125 µg/ml SPT muamelesinin etkisi altında MIAPaCa-2 tümör hücrelerini incelerken, hem BAX hem de Kaspaz-9'un gen ifadeleri incelenmiş ve önemli ölçüde arttıkları tespit edilmiştir. p53 tümör baskılayıcı gen, hem içsel hem de dışsal apoptoz yollarının önemli bir düzenleyicisidir (Kiraz v.d., 2016). MIAPaCa-2 hücrelerine 125 µg/ml SPT uygulandığında p53 gen ifade seviyesi önemli bir değişiklik göstermemiştir.

Sonuç olarak, SPT'nin MIAPaCa-2 pankreas kanseri hücrelerinin proliferasyonunu azalttığı ve hücreleri apoptoza götürdüğü gösterilmiştir. SPT'nin pankreas kanseri için umut verici bir terapötik aday olabileceği düşünülmektedir, ancak daha detaylı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

## REFERENSLAR

- Abdik, E. A. (2022). The Protective Effects of Sodium Pentaborate Tetrahydrate Against UVB-induced Apoptosis in Human Keratinocytes. *Hittite Journal of Science and Engineering*, 9(3), 213-218.
- Abdik, H. (2021). Combined effects of zoledronic acid and sodium pentaborate pentahydrate on proliferation, migration and apoptosis of human neuroblastoma cell line. *Middle East Journal of Science*, 7(1), 24-35.
- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., & Kim, J. H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 119(3), 651-665.
- Alak, G., Parlak, V., Yeltekin, A. Ç., Ucar, A., Çomaklı, S., Topal, A., ... & Türkez, H. (2019). The protective effect exerted by dietary borax on toxicity metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 216, 82-92.
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., & Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant cK-ras genes. *Cell*, 53(4), 549-554.
- Amjad MT, Chidharla A, Kasi A. Cancer Chemotherapy. (2023). In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Retrieved from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564367/>*
- Andersson, B. (2010). *Acute pancreatitis-severity classification, complications and outcome* (Vol. 2010, No. 60). Lund University.
- Anvekar, R. A., Asciolla, J. J., Missert, D. J., & Chipuk, J. E. (2011). Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment. *Frontiers in oncology*, 1, 34.
- Asano, K., Miwa, M., Miwa, K., Hanayama, R., Nagase, H., Nagata, S., & Tanaka, M. (2004). Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces

- autoantibody production in mice. *The Journal of experimental medicine*, 200(4), 459-467.
- Ashkenazi, A., & Salvesen, G. (2014). Regulated cell death: signaling and mechanisms. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 337-356.
- Aslantürk, Ö. S. (2018). In vitro cytotoxicity and cell viability assays: principles, advantages, and disadvantages. *Genotoxicity-A predictable risk to our actual world*, 2, 64-80.
- Ayhanci, A., Tanriverdi, D. T., Sahinturk, V., Cengiz, M., Appak-Baskoy, S., & Sahin, I. K. (2020). Protective effects of boron on cyclophosphamide-induced bladder damage and oxidative stress in rats. *Biological trace element research*, 197, 184-191.
- Aysan, E., Sahin, F., Telci, D., Erdem, M., Muslumanoglu, M., Yardimci, E., & Bektasoglu, H. (2013). Mechanism of body weight reducing effect of oral boric acid intake. *International Journal of Endocrinology*, 2013.
- Balasubramanian, K., & Schroit, A. J. (2003). Aminophospholipid asymmetry: a matter of life and death. *Annual review of physiology*, 65(1), 701-734.
- Barkla, D. H., & Gibson, P. R. (1999). The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology*, 31(3), 230-238.
- Barranco, W. T., Kim, D. H., Stella Jr, S. L., & Eckhert, C. D. (2009). Boric acid inhibits stored Ca<sup>2+</sup> release in DU-145 prostate cancer cells. *Cell Biology and Toxicology*, 25, 309-320.
- Barrett, J. C. (1993). Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environmental health perspectives*, 100, 9-20.
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences*, 9(3), 193.
- Beattie, J. H., & Peace, H. S. (1993). The influence of a low-boron diet and boron supplementation on bone, major mineral and sex steroid metabolism in postmenopausal women. *British journal of nutrition*, 69(3), 871-884.
- Begg, A. C., Stewart, F. A., & Vens, C. (2011). Strategies to improve radiotherapy with targeted drugs. *Nature Reviews Cancer*, 11(4), 239-253.

- Benderdour, M., Van Bui, T., Hess, K., Dicko, A., Belleville, F., & Dousset, B. (2000). Effects of boron derivatives on extracellular matrix formation. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 14(3), 168-173.
- Bennett, M., Macdonald, K., Chan, S. W., Luzio, J. P., Simari, R., & Weissberg, P. (1998). Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science*, 282(5387), 290-293.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., ... & Cerretti, D. P. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature*, 385(6618), 729-733.
- Bos, J. L. (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer research*, 49(17), 4682-4689.
- Boutry, J., Tissot, S., Ujvari, B., Capp, J. P., Giraudeau, M., Nedelcu, A. M., & Thomas, F. (2022). The evolution and ecology of benign tumors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1877(1), 188643.
- Boyle, P., Autier, P., Bartelink, H., Baselga, J., Boffetta, P., Burn, J., ... & Zur Hausen, H. (2003). European Code Against Cancer and scientific justification: third version (2003). *Annals of oncology*, 14(7), 973-1005.
- Bratton, S. B., & Salvesen, G. S. (2010). Regulation of the Apaf-1–caspase-9 apoptosome. *Journal of cell science*, 123(19), 3209-3214.
- Bray, F., Laversanne, M., Weiderpass, E., & Soerjomataram, I. (2021). The ever-increasing importance of cancer as a leading cause of premature death worldwide. *Cancer*, 127(16), 3029-3030
- Burman, C., & Ktistakis, N. T. (2010). Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS letters*, 584(7), 1302-1312.
- Burriss, H. 3., Moore, M. J., Andersen, J., Green, M. R., Rothenberg, M. L., Modiano, M. R., ... & Tarassoff, P. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of clinical oncology*, 15(6), 2403-2413.

- Bustinza-Linares, E., Kurzrock, R., & Tsimberidou, A. M. (2010). Salirasib in the treatment of pancreatic cancer. *Future Oncology*, 6(6), 885-891.
- Campbell, K. J., & Tait, S. W. (2018). Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open biology*, 8(5), 180002.
- Cebeci, E., Yüksel, B., & Şahin, F. (2022). Anti-cancer effect of boron derivatives on small-cell lung cancer. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 70, 126923.
- Chai, C., Wu, H. H., Abuetabh, Y., Sergi, C., & Leng, R. (2022). Regulation of the tumor suppressor PTEN in triple-negative breast cancer. *Cancer Letters*, 527, 41-48.
- Chang, H. Y., Huang, H. C., Huang, T. C., Yang, P. C., Wang, Y. C., & Juan, H. F. (2013). Flow cytometric detection of mitochondrial membrane potential. *Bio-protocol*, 3(8), e430-e430.
- Chen, Y., & Klionsky, D. J. (2011). The regulation of autophagy—unanswered questions. *Journal of cell science*, 124(2), 161-170.
- Cho, Y., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T. D., Guildford, M., & Chan, F. K. M. (2009). Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*, 137(6), 1112-1123.
- Christofferson, D. E., Li, Y., & Yuan, J. (2014). Control of life-or-death decisions by RIP1 kinase. *Annual review of physiology*, 76, 129-150.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., ... & Ducreux, M. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *New England journal of medicine*, 364(19), 1817-1825.
- Cooper G. M. (2000). Tumor Suppressor Genes. (2nd Ed). *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Retrieved from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9894/>
- Cooper, G. M. (2000). Oncogenes. (2nd Ed). *The Cell: A Molecular Approach*. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Retrieved from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9840/>

- Crespo, J. L., Díaz-Troya, S., & Florencio, F. J. (2005). Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 139(4), 1736-1749.
- Crook, N. E., Clem, R. J., & Miller, L. K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *Journal of virology*, 67(4), 2168-2174.
- Cui, Y., Winton, M. I., Zhang, Z. F., Rainey, C., Marshall, J., De Kernion, J. B., & Eckhert, C. D. (2004). Dietary boron intake and prostate cancer risk. *Oncology reports*, 11(4), 887-892.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews Molecular cell biology*, 15(1), 49-63.
- Dahia, P. L. (2000). PTEN, a unique tumor suppressor gene. *Endocrine-related cancer*, 7(2), 115-129.
- Dannenberg, J. H., & te Riele, H. P. (2006). The retinoblastoma gene family in cell cycle regulation and suppression of tumorigenesis. *Cell Cycle Regulation*, 183-225.
- Das, C. K., Banerjee, I., & Mandal, M. (2020). Pro-survival autophagy: An emerging candidate of tumor progression through maintaining hallmarks of cancer. *In Seminars in Cancer Biology*, 66, 59-74.
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., ... & Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949-954.
- De Duve, C., & Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annual review of physiology*, 28(1), 435-492.
- De Verdier, M. G., Hagman, U., Peters, R. K., Steineck, G., & Övervik, E. (1991). Meat, cooking methods and colorectal cancer: a case-referent study in Stockholm. *International Journal of Cancer*, 49(4), 520-525.
- Degterev, A., Boyce, M., & Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*, 22(53), 8543-8567.

- Degterev, A., Hitomi, J., Gemscheid, M., Ch'en, I. L., Korkina, O., Teng, X., ... & Yuan, J. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature chemical biology*, 4(5), 313-321.
- Dehkordi, M. H., Munn, R. G., & Fearnhead, H. O. (2022). Non-canonical roles of apoptotic caspases in the nervous system. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 840023.
- Delaney, G., Jacob, S., Featherstone, C., & Barton, M. (2005). The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 104(6), 1129-1137.
- Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M. S., & Pfeifer, G. P. (1996). Preferential formation of benzo [a] pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*, 274(5286), 430-432.
- Deretic, V., & Levine, B. (2009). Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell host & microbe*, 5(6), 527-549.
- Deshpande, A., & Hinds, P. W. (2006). The retinoblastoma protein in osteoblast differentiation and osteosarcoma. *Current molecular medicine*, 6(7), 809-817.
- Deter, R. L., & De Duve, C. (1967). Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *The Journal of cell biology*, 33(2), 437-449.
- Devenish, R. J., & Klionsky, D. J. (2012). Autophagy: mechanism and physiological relevance 'brewed' from yeast studies. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 4, 1354.
- Devirian, T. A., & Volpe, S. L. (2003). The physiological effects of dietary boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(2), 219-231
- Dimberg, L. Y., Anderson, C. K., Camidge, R., Behbakht, K., Thorburn, A., & Ford, H. L. (2013). On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene*, 32(11), 1341-1350.

- Dondelinger, Y., Declercq, W., Montessuit, S., Roelandt, R., Goncalves, A., Bruggeman, I., ... & Vandenabeele, P. (2014). MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates. *Cell reports*, 7(4), 971-981.
- Ducreux, M., Cuhna, A. S., Caramella, C., Hollebecque, A., Burtin, P., Goéré, D., ... & Arnold, D. (2015). Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 26, v56-v68.
- Eckhart, C. D., & Rowe, R. I. (1999). Embryonic dysplasia and adult retinal dystrophy in boron-deficient zebrafish. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine: The Official Publication of the International Society for Trace Element Research in Humans*, 12(3), 213-219
- Edison, N., Zuri, D., Maniv, I., Bornstein, B., Lev, T., Gottfried, Y., ... & Larisch, S. (2012). The IAP-antagonist ARTS initiates caspase activation upstream of cytochrome C and SMAC/Diablo. *Cell Death & Differentiation*, 19(2), 356-368.
- Eggert, J. (2011, February). The biology of cancer: what do oncology nurses really need to know. *In Seminars in oncology nursing* (Vol. 27, No. 1, pp. 3-12). WB Saunders.
- Ekshyyan, O., & Aw, T. Y. (2004). Apoptosis: a key in neurodegenerative disorders. *Current neurovascular research*, 1(4), 355-371.
- Elkholi, R., Floros, K. V., & Chipuk, J. E. (2011). The role of BH3-only proteins in tumor cell development, signaling, and treatment. *Genes & cancer*, 2(5), 523-537.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495-516.
- Engeland, K. (2022). Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death & Differentiation*, 29(5), 946-960.
- Escobar, Ma. L., Echeverría, O. M., & Vázquez-Nin, G. H. (2015). Necrosis as Programmed Cell Death. *Cell Death - Autophagy, Apoptosis and Necrosis*, 419-434.
- Evans, D. B., Farnell, M. B., Lillemoe, K. D., Vollmer, C., Strasberg, S. M., & Schulick, R. D. (2009). Surgical treatment of resectable and borderline resectable pancreas cancer: expert consensus statement. *Annals of surgical oncology*, 16(7), 1736-1744.

- Ezzat, S., Asa, S. L., Couldwell, W. T., Barr, C. E., Dodge, W. E., Vance, M. L., & McCutcheon, I. E. (2004). The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 101(3), 613-619.
- Faguet, G. B. (2015). A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database. *International journal of cancer*, 136(9), 2022-2036.
- Feng, S., Yang, Y., Mei, Y., Ma, L., Zhu, D. E., Hoti, N., ... & Wu, M. (2007). Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cellular signalling*, 19(10), 2056-2067.
- Feoktistova, M., Geserick, P., Kellert, B., Dimitrova, D. P., Langlais, C., Hupe, M., ... & Leverkus, M. (2011). cIAPs block Ripoptosome formation, a RIP1/caspase-8 containing intracellular cell death complex differentially regulated by cFLIP isoforms. *Molecular cell*, 43(3), 449-463.
- Ferlay, J., Partensky, C., & Bray, F. (2016). More deaths from pancreatic cancer than breast cancer in the EU by 2017. *Acta oncologica*, 55(9-10), 1158-1160.
- Fernandes, G. F. S., Denny, W. A., & Dos Santos, J. L. (2019). Boron in drug design: Recent advances in the development of new therapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 179, 791-804.
- Ferrara, N., & Kerbel, R. S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 438(7070), 967-974.
- Folkman, J., & Kalluri, R. (2004). Cancer without disease. *Nature*, 427(6977), 787-787.
- Fort, D. J., Rogers, R. L., McLaughlin, D. W., Sellers, C. M., & Schlekot, C. L. (2002). Impact of boron deficiency on *Xenopus laevis*: a summary of biological effects and potential biochemical roles. *Biological trace element research*, 90, 117-142.
- Fulda, S., & Debatin, K. M. (2004). Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 1705(1), 27-41.
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death and differentiation*, 14(7), 1237-1243.

- Garrett, C. T. (1986). *Oncogenes*. *Clinica chimica acta*, 156(1), 1-40.
- Gerber, D. E. (2008). Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American family physician*, 77(3), 311-319.
- Ghanizadeh, G., Babaei, M., Naghii, M. R., Mofid, M., Torkaman, G., & Hedayati, M. (2014). The effect of supplementation of calcium, vitamin D, boron, and increased fluoride intake on bone mechanical properties and metabolic hormones in rat. *Toxicology and industrial health*, 30(3), 211-217.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12827.
- Glick, D., Barth, S., & Macleod, K. F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology*, 221(1), 3-12.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., & Marais, R. (2007). Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, 445(7130), 851-857.
- Green, D. R. (2011). The end and after: how dying cells impact the living organism. *Immunity*, 35(4), 441-444.
- Green, D. R., & Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305(5684), 626-629.
- Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(12), a006080.
- Hacioglu, C., Kar, F., Kacar, S., Sahinturk, V., & 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. *Biological Trace Element Research*, 193, 400-409.
- Häcker, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*, 301, 5–17 (2000).
- Hadrup, N., Frederiksen, M., & Sharma, A. K. (2021). Toxicity of boric acid, borax and other boron containing compounds: A review. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 121, 104873.

- Hakim, D. N., Pelly, T., Kulendran, M., & Caris, J. A. (2015). Benign tumours of the bone: A review. *Journal of bone oncology*, 4(2), 37-41.
- Hall, C., Troutman, S. M., Price, D. K., Figg, W. D., & Kang, M. H. (2013). Bcl-2 family of proteins as therapeutic targets in genitourinary neoplasms. *Clinical genitourinary cancer*, 11(1), 10-19.
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discovery*, 12(1), 31-46.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5), 646-674.
- Han-Shu, F. A. N. G., Ming-Fei, L. A. N. G., & Jing, S. U. N. (2019). New methods for cell cycle analysis. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 47(9), 1293-1301.
- He, H., Dang, Y., Dai, F., Guo, Z., Wu, J., She, X., ... & Yu, L. (2003). Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family and detection of a novel type of modification for MAP1LC3B. *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 29278-29287.
- He, S., Liang, Y., Shao, F., & Wang, X. (2011). Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(50), 20054-20059
- He, T., Zhang, X., Hao, J., & Ding, S. (2021). Phosphatase and tensin homolog in non-neoplastic digestive disease: More than just tumor suppressor. *Frontiers in Physiology*, 12, 684529.
- Herreros-Villanueva, M., Hijona, E., Cosme, A., & Bujanda, L. (2012). Adjuvant and neoadjuvant treatment in pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology: WJG*, 18(14), 1565.
- Hitoshi, Y., Lorens, J., Kitada, S. I., Fisher, J., LaBarge, M., Ring, H. Z., ... & Nolan, G. P. (1998). Toso, a cell surface, specific regulator of Fas-induced apoptosis in T cells. *Immunity*, 8(4), 461-471.
- Horvitz, H. R. (1999). Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Cancer research*, 59(7), 1701s-1706s.

- Hruban, R. H., Adsay, N. V., Albores-Saavedra, J., Compton, C., Garrett, E. S., Goodman, S. N., ... & Offerhaus, G. J. A. (2001). Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *The American journal of surgical pathology*, 25(5), 579-586.
- Hruban, R. H., Canto, M. I., Goggins, M., Schulick, R., & Klein, A. P. (2010). Update on familial pancreatic cancer. *Advances in surgery*, 44(1), 293-311
- Hsu, P. P., Kang, S. A., Rameseder, J., Zhang, Y., Ottina, K. A., Lim, D., ... & Sabatini, D. M. (2011). The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. *Science*, 332(6035), 1317-1322.
- Hunt, C. D. (1998). Regulation of enzymatic activity: one possible role of dietary boron in higher animals and humans. *Biological trace element research*, 66, 205-225.
- Hunt, C. D. (2003). Dietary boron: an overview of the evidence for its role in immune function. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine: The Official Publication of the International Society for Trace Element Research in Humans*, 16(4), 291-306.
- I Scorei, R., & Popa, R. (2010). Boron-containing compounds as preventive and chemotherapeutic agents for cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly current medicinal chemistry-Anti-Cancer agents)*, 10(4), 346-351.
- Ilic, I., & Ilic, M. (2022). International patterns in incidence and mortality trends of pancreatic cancer in the last three decades: A joinpoint regression analysis. *World Journal of Gastroenterology*, 28(32), 4698.
- Ismail, A., Gerner, E., & Lance, P. (2008). Colorectal Cancer Prevention. In: *Fundamentals of Cancer Prevention*. Springer, Berlin, Heidelberg. 291-312.
- Itakura, E., Kishi, C., Inoue, K., & Mizushima, N. (2008). Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular biology of the cell*, 19(12), 5360-5372.
- Jacinto, E., & Hall, M. N. (2003). Tor signalling in bugs, brain and brawn. *Nature reviews Molecular cell biology*, 4(2), 117-126.

- Jacobetz, M. A., Chan, D. S., Neesse, A., Bapiro, T. E., Cook, N., Frese, K. K., ... & Tuveson, D. A. (2013). Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut*, 62(1), 112-120.
- Jager, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., & Eskelinen, E. L. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of cell science*, 117(20), 4837-4848.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., ... & Penninger, J. M. (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410(6828), 549-554.
- Juhasz, G., & Neufeld, T. P. (2006). Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source. *PLoS biology*, 4(2), e36.
- Kahraman, E., & Göker, E. (2022). Boric acid exert anti-cancer effect in poorly differentiated hepatocellular carcinoma cells via inhibition of AKT signaling pathway. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 73, 127043.
- Kamada, Y., Yoshino, K. I., Kondo, C., Kawamata, T., Oshiro, N., Yonezawa, K., & Ohsumi, Y. (2010). Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy. *Molecular and cellular biology*, 30(4), 1049-1058.
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349.
- Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T., & Takaori, K. (2016). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 388(10039), 73-85.
- Katti, A., Diaz, B. J., Caragine, C. M., Sanjana, N. E., & Dow, L. E. (2022). CRISPR in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, 22(5), 259-279.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239-257.
- Khalid, N., & Azimpouran, M. (2022). Necrosis - StatPearls - NCBI Bookshelf. Necrosis - StatPearls - NCBI Bookshelf. *National library of medicine*, Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557627/>

- Khaliq, H., Juming, Z., & Ke-Mei, P. (2018). The physiological role of boron on health. *Biological trace element research*, 186, 31-51.
- Khan, K. H., Blanco-Codesido, M., & Molife, L. R. (2014). Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. *Critical reviews in oncology/hematology*, 90(3), 200-219.
- Kim, M. J., Woo, S. J., Yoon, C. H., Lee, J. S., An, S., Choi, Y. H., ... & Lee, S. J. (2011). Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 12924-12932.
- Kiraz, Y., Adan, A., Kartal Yandim, M., & Baran, Y. (2016). Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumor Biology*, 37(7), 8471-8486.
- Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., ... & Ohsumi, Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *The Journal of cell biology*, 151(2), 263-276.
- Kontomanolis, E. N., Koutras, A., Syllaios, A., Schizas, D., Mastoraki, A., Garmpis, N., ... & Fasoulakis, Z. (2020). Role of oncogenes and tumor-suppressor genes in carcinogenesis: a review. *Anticancer research*, 40(11), 6009-6015.
- Korkmaz, M., Uzgören, E., Bakırdere, S., Aydın, F., & Ataman, O. Y. (2007). Effects of dietary boron on cervical cytopathology and on micronucleus frequency in exfoliated buccal cells. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 22(1), 17-25.
- Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., ... & Melino, G. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell death and differentiation*, 12(12), 1463-1467.
- Kroemer, G., Mariño, G., & Levine, B. (2010). Autophagy and the integrated stress response. *Molecular cell*, 40(2), 280-293.
- Krysko, D. V., Berghe, T. V., D'Herde, K., & Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3), 205-221.
- Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death & Differentiation*, 14(1), 32-43.

- Kurosaka, K., Takahashi, M., Watanabe, N., & Kobayashi, Y. (2003). Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *The Journal of Immunology*, 171(9), 4672-4679.
- Lakshmanan, I., & Batra, S. K. (2013). Protocol for apoptosis assay by flow cytometry using annexin V staining method. *Bio-protocol*, 3(6), e374-e374.
- Lakshmi, B., Janardhanan, K. K. (2018). Role of Reactive Oxygen Species and Mutagens in Carcinogenesis. *Recent Advances in Biotechnology vol. I Fermentation Production of  $\alpha$ -Ketoglutaric Acid. Shree Publishers & Distributors*. Retrieved from: <file:///D:/d/thesis/CARCINOGENESIS%202.pdf>
- Laster, S. M., Wood, J. G., & Gooding, L. R. (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *The Journal of Immunology*, 141(8), 2629-2634
- Levin, S. (1998). Apoptosis, necrosis, or oncosis: what is your diagnosis? A report from the Cell Death Nomenclature Committee of the Society of Toxicologic Pathologists. *Toxicological sciences*, 41(2), 155-156.
- Levine, A. J., & Oren, M. (2009). The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature reviews cancer*, 9(10), 749-758.
- Levine, B., & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*, 6(4), 463-477.
- Levine, B., & Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *The Journal of clinical investigation*, 115(10), 2679-2688.
- Li, J., McQuade, T., Siemer, A. B., Napetschnig, J., Moriwaki, K., Hsiao, Y. S., ... & Wu, H. (2012). The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis. *Cell*, 150(2), 339-350.
- Li, L. Y., Luo, X., & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412(6842), 95-99.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *cell*, 91(4), 479-489.

- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B. H., & Jung, J. U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nature cell biology*, 8(7), 688-698.
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402(6762), 672-676.
- LiberTexts. (2020). Carcinogenesis. *APUS: An Introduction to Nutrition*. (1 Ed). Retrieved from:  
[https://med.libretexts.org/Courses/American\\_Public\\_University/APUS%3A\\_An\\_Introduction\\_to\\_Nutrition\\_\(Byerley\)/APUS%3A\\_An\\_Introduction\\_to\\_Nutrition\\_1st\\_Edition/07%3A\\_Nutrition\\_and\\_Cancer/7.02%3A\\_Carcinogenesis](https://med.libretexts.org/Courses/American_Public_University/APUS%3A_An_Introduction_to_Nutrition_(Byerley)/APUS%3A_An_Introduction_to_Nutrition_1st_Edition/07%3A_Nutrition_and_Cancer/7.02%3A_Carcinogenesis)
- Lin, Y., Devin, A., Rodriguez, Y., & Liu, Z. G. (1999). Cleavage of the death domain kinase RIP by caspase-8 prompts TNF-induced apoptosis. *Genes & development*, 13(19), 2514-2526.
- Ling, J., Kang, Y. A., Zhao, R., Xia, Q., Lee, D. F., Chang, Z., ... & Chiao, P. J. (2012). KrasG12D-induced IKK2/ $\beta$ /NF- $\kappa$ B activation by IL-1 $\alpha$  and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer cell*, 21(1), 105-120.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., & Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 89(2), 175-184.
- Liu, Y., Jang, H., Zhang, M., Tsai, C. J., Maloney, R., & Nussinov, R. (2022). The structural basis of BCR-ABL recruitment of GRB2 in chronic myelogenous leukemia. *Biophysical Journal*, 121(12), 2251-2265.
- Liu, Y., Liu, T., Lei, T., Zhang, D., Du, S., Girani, L., ... & Wang, Y. (2019). RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy. *International journal of molecular medicine*, 44(3), 771-786.

- Liu, Z., Parveen, N., Rehman, U., Aziz, A., Sheikh, A., Abourehab, M. A., ... & Kesharwani, P. (2023). Unravelling the enigma of siRNA and aptamer mediated therapies against pancreatic cancer. *Molecular Cancer*, 22(1), 1-22.
- Loehrer Sr, P. J., Feng, Y., Cardenes, H., Wagner, L., Brell, J. M., Cella, D., ... & Benson III, A. B. (2011). Gemcitabine alone versus gemcitabine plus radiotherapy in patients with locally advanced pancreatic cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group trial. *Journal of Clinical Oncology*, 29(31), 4105.
- Maehama, T., & Dixon, J. E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 273(22), 13375-13378.
- Mager, D. L. (2006). Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure? A review. *Journal of translational medicine*, 4(1), 1-18.
- Mahabir, S., Spitz, M. R., Barrera, S. L., Dong, Y. Q., Eastham, C., & Forman, M. R. (2008). Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women. *American journal of epidemiology*, 167(9), 1070-1080.
- Mahoney, J. A., & Rosen, A. (2005). Apoptosis and autoimmunity. *Current opinion in immunology*, 17(6), 583-588.
- Maitra, A. (2019). Molecular envoys pave the way for pancreatic cancer to invade the liver.
- Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J. C., Gautier, F., Juin, P., ... & Kroemer, G. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *The EMBO journal*, 26(10), 2527-2539.
- Maria Fimia, G., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., ... & Cecconi, F. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*, 447(7148), 1121-1125.
- Mathur, G., Nain, S., & Sharma, P. K. (2015). Cancer: an overview. *Academic Journal of Cancer Research*, 8 (1), 01-09.
- Mayer, L. D., & Janoff, A. S. (2007). Optimizing combination chemotherapy by controlling drug ratios. *Molecular interventions*, 7(4), 216.

- McGrath, R. A., & Williams, R. W. (1966). Reconstruction in vivo of irradiated *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid; the rejoining of broken pieces. *Nature*, 212(5061), 534-535.
- Meylan, E., & Tschopp, J. (2005). The RIP kinases: crucial integrators of cellular stress. *Trends in biochemical sciences*, 30(3), 151-159.
- Mizrahi, J. D., Surana, R., Valle, J. W., & Shroff, R. T. (2020). Pancreatic cancer. *The Lancet*, 395(10242), 2008-2020.
- Mizushima, N. (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current opinion in cell biology*, 22(2), 132-139.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., ... & Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of cell science*, 116(9), 1679-1688.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., & Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *nature*, 451(7182), 1069-1075.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, 107-132.
- Mohammed, E. E., Türkel, N., Yigit, U. M., Dalan, A. B., & Sahin, F. (2023). Boron Derivatives Inhibit the Proliferation of Breast Cancer Cells and Affect Tumor-Specific T Cell Activity In Vitro by Distinct Mechanisms. *Biological Trace Element Research*, 1-16.
- Monastyrska, I., Rieter, E., Klionsky, D. J., & Reggiori, F. (2009). Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. *Biological Reviews*, 84(3), 431-448.
- Moore, M. J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J. R., Gallinger, S., ... & Parulekar, W. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of clinical oncology*, 25(15), 1960-1966.

- Mostafa, M. E., Erbarut-Seven, I., Pehlivanoglu, B., & Adsay, V. (2017). Pathologic classification of " pancreatic cancers": current concepts and challenges. *Chinese clinical oncology*, 6(6), 59-59.
- Myers, M. P., Stolarov, J. P., Eng, C., Li, J., Wang, S. I., Wigler, M. H., ... & Tonks, N. K. (1997). P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), 9052-9057.
- Nagata, S., Hanayama, R., & Kawane, K. (2010). Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell*, 140(5), 619-630.
- Naismith, J. H., & Sprang, S. R. (1998). Modularity in the TNF-receptor family. *Trends in biochemical sciences*, 23(2), 74-79.
- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., & Yuan, J. (2000). Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- $\beta$ . *Nature*, 403(6765), 98-103.
- Nenclares, P., & Harrington, K. J. (2020). The biology of cancer. *Medicine*, 48(2), 67-72.
- Neoptolemos, J. P., Dunn, J. A., Stocken, D. D., Almond, J., Link, K., Berger, H., ... & members of the European Study Group for Pancreatic Cancer. (2001). Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 358(9293), 1576-1585.
- Newbold, A., Martin, B. P., Cullinane, C., & Bots, M. (2014). Detection of apoptotic cells using propidium iodide staining. *Cold spring harbor protocols*, 2014(11), pdb-prot082545.
- Nielsen, F. H. (2018). Boron in aging and longevity. *trace elements and minerals in health and longevity*, 163-177.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(12), 3448-3459.
- Obeng, E. (2020). Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. *Brazilian Journal of Biology*, 81, 1133-1143.

- Oldfield, L. E., Connor, A. A., & Gallinger, S. (2017). Molecular events in the natural history of pancreatic cancer. *Trends in cancer*, 3(5), 336-346.
- Padma, V. V. (2015). An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine*, 5(4), 1-6.
- Pahl, M. V., Culver, B. D., Strong, P. L., Murray, F. J., & Vaziri, N. D. (2001). The effect of pregnancy on renal clearance of boron in humans: a study based on normal dietary intake of boron. *Toxicological Sciences*, 60(2), 252-256.
- Panza, L., Prosperi, D. (2012). Boron Chemistry. In: Sauerwein, W., Wittig, A., Moss, R., Nakagawa, Y. (eds) *Neutron Capture Therapy* (pp.77-98). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Parsa, N. (2012). Environmental factors inducing human cancers. *Iranian journal of public health*, 41(11), 1.
- Parzych, K. R., & Klionsky, D. J. (2014). An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 20(3), 460-473.
- Penland, J. G. (1998). The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Biological trace element research*, 66, 299-317.
- Petersen, G. M. (2015). Familial pancreatic adenocarcinoma. *Hematology/Oncology Clinics*, 29(4), 641-653.
- Plesca, D., Mazumder, S., & Almasan, A. (2008). DNA damage response and apoptosis. *Methods in enzymology*, 446, 107-122
- Pobezinskaya, Y. L., & Liu, Z. (2012). The role of TRADD in death receptor signaling. *Cell Cycle*, 11(5), 871-876.
- Pyo, J. O., Nah, J., & Jung, Y. K. (2012). Molecules and their functions in autophagy. *Experimental & molecular medicine*, 44(2), 73-80.
- Rabinowitz, J. D., & White, E. (2010). Autophagy and metabolism. *Science*, 330(6009), 1344-1348.
- Ravi, S., Alencar Jr, A. M., Arakelyan, J., Xu, W., Stauber, R., Wang, C. C. I., ... & Pereira, R. M. (2022). An Update to Hallmarks of Cancer. *Cureus*, 14(5).

- Reed, J. C., & Pellicchia, M. (2005). Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood*, 106(2), 408-418.
- Reutelingsperger, C. P. M., & Van Heerde, W. L. (1997). Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 53, 527-532.
- Şezanka, T., & Sigler, K. (2008). Biologically active compounds of semi-metals. *Studies in natural products chemistry*, 35, 835-921.
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., & Barreda, D. R. (2011). Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (50), e2597.
- Roach, H. I., & Clarke, N. M. P. (2000). Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis: new observations on the mammalian growth plate. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 82(4), 601-613.
- Rodenhuis, S., van de Wetering, M. L., Mooi, W. J., Evers, S. G., van Zandwijk, N., & Bos, J. L. (1987). Mutational activation of the K-ras oncogene. *New England Journal of Medicine*, 317(15), 929-935.
- Rodriguez, J., & Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & development*, 13(24), 3179-3184.
- Rowe, R. I., & Eckhart, C. D. (1999). Boron is required for zebrafish embryogenesis. *Journal of experimental biology*, 202(12), 1649-1654.
- Ruffolo, P. R. (1964). The Pathogenesis of Necrosis: I. Correlated Light and Electron Microscopic Observations of the Myocardial Necrosis Induced by the Intravenous Injection of Papain. *The American Journal of Pathology*, 45(5), 741.
- Ryan, D. P., Hong, T. S., & Bardeesy, N. (2014). Pancreatic adenocarcinoma. *New England Journal of Medicine*, 371(11), 1039-1049.
- Saeki, H., & Sugimachi, K. (2001). Carcinogenic risk factors. *Japan Medical Association Journal*, 44(6), 245-249
- Salvadori, D. M. F., & da Silva, G. N. (2013). Genetic instability in normal-appearing and tumor urothelium cells and the role of the TP53 gene in the toxicogenomic effects of

- antineoplastic drugs. *In Advances in the Scientific Evaluation of Bladder Cancer and Molecular Basis for Diagnosis and Treatment*. IntechOpen.
- Samman, S., Naghii, M. R., Wall, P. L., & Verus, A. P. (1998). The nutritional and metabolic effects of boron in humans and animals. *Biological Trace Element Research*, 66, 227-235.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Krammer, P. H., & Peter, M. E. (1999). The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(3), 1541-1548.
- Schultz, M., Parzinger, H., Posdnjakov, D. V., Chikisheva, T. A., & Schmidt-Schultz, T. H. (2007). Oldest known case of metastasizing prostate carcinoma diagnosed in the skeleton of a 2,700-year-old Scythian king from Arzhan (Siberia, Russia). *International Journal of Cancer*, 121(12), 2591-2595.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death & Differentiation*, 22(4), 526-539.
- Shen, H., Yin, L., Deng, G., Guo, C., Han, Y., Li, Y., ... & Zeng, S. (2018). Knockdown of beclin-1 impairs epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(8), 7022-7031.
- Shiozaki, E. N., Chai, J., Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S. M., ... & Shi, Y. (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Molecular cell*, 11(2), 519-527.
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2022). Cancer statistics, 2022. *CA: a cancer journal for clinicians*, 72(1), 7-33.
- Simonsen, A. & Tooze, S. A. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J. Cell Biol.* 186, 773–782 (2009).
- Simonson, S. J., Wu, Z. H., & Miyamoto, S. (2007). CYLD: a DUB with many talents. *Developmental cell*, 13(5), 601-603.
- Sinha, T. (2018). Tumors: Benign and malignant. *Cancer Therapy & Oncology International Journal*, 10(3), 52-54.

- Sogut, I., Paltun, S. O., Tuncdemir, M., Ersoz, M., & Hurdag, C. (2018). The antioxidant and antiapoptotic effect of boric acid on hepatotoxicity in chronic alcohol-fed rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 96(4), 404-411.
- Stepanek, O., Brdicka, T., Angelisova, P., Horvath, O., Spicka, J., Stockbauer, P., ... & Horejsi, V. (2011). Interaction of late apoptotic and necrotic cells with vitronectin. *PLoS One*, 6(5), e19243.
- Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K., & Ren, Q. (2015). Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC microbiology*, 15, 1-9.
- Sudhakar, A. (2009). History of cancer, ancient and modern treatment methods. *Journal of cancer science & therapy*, 1(2), 1.
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., ... & Wang, X. (2012). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, 148(1-2), 213-227.
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209-249.
- Sunwoo, J. B., Chen, Z., Dong, G., Yeh, N., Bancroft, C. C., Sausville, E., ... & Van Waes, C. (2001). Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor- $\kappa$ B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 7(5), 1419-1428.
- Tait, S. W., & Green, D. R. (2010). Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(9), 621-632.
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cuauling, H. D., Sun, M., Sato, Y., ... & Wang, H. G. (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature cell biology*, 9(10), 1142-1151.
- Takaori, K., Bassi, C., Biankin, A., Brunner, T. B., Cataldo, I., Campbell, F., ... & Johnson, C. D. (2016). International Association of Pancreatology (IAP)/European Pancreatic

- Club (EPC) consensus review of guidelines for the treatment of pancreatic cancer. *Pancreatology*, 16(1), 14-27.
- Tan, Q., Wang, M., Yu, M., Zhang, J., Bristow, R. G., Hill, R. P., & Tannock, I. F. (2016). Role of autophagy as a survival mechanism for hypoxic cells in tumors. *Neoplasia*, 18(6), 347-355.
- Temin, H. M. (1974). On the origin of RNA tumor viruses. *Annual review of genetics*, 8(1), 155-177.
- Thapa, R. J., Nogusa, S., Chen, P., Maki, J. L., Lerro, A., Andrade, M., ... & Balachandran, S. (2013). Interferon-induced RIP1/RIP3-mediated necrosis requires PKR and is licensed by FADD and caspases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(33), E3109-E3118.
- Thornberry, N. A., & Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science*, 281(5381), 1312-1316.
- Ulu, Z. O., Bolat, Z. B., & Sahin, F. (2022). Integrated transcriptome and in vitro analysis revealed anti-proliferative effect of sodium perborate on hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 73, 127011.
- Ulusik, I., Karakaya, H. C., & Koc, A. (2018). The importance of boron in biological systems. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 45, 156-162.
- Vandenabeele, P., Declercq, W., & Berghe, T. V. (2008). Necrotic cell death and 'necrostatins': now we can control cellular explosion. *Trends in biochemical sciences*, 33(8), 352-355.
- Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., & Kroemer, G. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(10), 700-714.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., & Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(5), 329-341.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Annals of hematology*, 84(10), 627-639.

- Versteijne, E., Suker, M., Groothuis, K., Akkermans-Vogelaar, J. M., Besselink, M. G., Bonsing, B. A., ... & van Tienhoven, G. (2020). Preoperative chemoradiotherapy versus immediate surgery for resectable and borderline resectable pancreatic cancer: results of the Dutch randomized phase III PREOPANC trial. *Journal of clinical oncology*, 38(16), 1763.
- Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., ... & Renschler, M. F. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *New England journal of medicine*, 369(18), 1691-1703.
- Vousden, K. H., & Prives, C. (2009). Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*, 137(3), 413-431.
- Wahi, D., Soni, D., & Grover, A. (2021). A Double-Edged Sword: The anti-Cancer effects of emodin by inhibiting the redox-protective protein MTH1 and augmenting ROS in NSCLC. *Journal of Cancer*, 12(3), 652.
- Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L. F., ... & Wang, X. (2014). Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Molecular cell*, 54(1), 133-146.
- Wang, L., Du, F., & Wang, X. (2008). TNF- $\alpha$  induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, 133(4), 693-703.
- Wang, W., Abbruzzese, J. L., Evans, D. B., Larry, L., Cleary, K. R., & Chiao, P. J. (1999). The nuclear factor- $\kappa$ B RelA transcription factor is constitutively activated in human pancreatic adenocarcinoma cells. *Clinical Cancer Research*, 5(1), 119-127.
- Wang, Y., Ji, P., Liu, J., Broaddus, R. R., Xue, F., & Zhang, W. (2009). Centrosome-associated regulators of the G 2/M checkpoint as targets for cancer therapy. *Molecular cancer*, 8, 1-13.
- Weidberg, H., Shpilka, T., Shvets, E., Abada, A., Shimron, F., & Elazar, Z. (2011). LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis. *Developmental cell*, 20(4), 444-454.
- Welch, H. G., & Black, W. C. (2010). Overdiagnosis in cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(9), 605-613.

- Wolfgang, C. L., Herman, J. M., Laheru, D. A., Klein, A. P., Erdek, M. A., Fishman, E. K., & Hruban, R. H. (2013). Recent progress in pancreatic cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*, 63(5), 318-348.
- Woroniecka, R., Rymkiewicz, G., Szafron, L. M., Blachnio, K., Szafron, L. A., Bystydziński, Z., ... & Grygalewicz, B. (2022). Cryptic MYC insertions in Burkitt lymphoma: New data and a review of the literature. *Plos one*, 17(2), e0263980.
- Wright, A., Reiley, W. W., Chang, M., Jin, W., Lee, A. J., Zhang, M., & Sun, S. C. (2007). Regulation of early wave of germ cell apoptosis and spermatogenesis by deubiquitinating enzyme CYLD. *Developmental cell*, 13(5), 705-716.
- Wu, W., Liu, P., & Li, J. (2012). Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Critical reviews in oncology/hematology*, 82(3), 249-258.
- Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), 471-484.
- Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., ... & Kimmelman, A. C. (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & development*, 25(7), 717-729.
- Yeo, T. P. (2015). Demographics, epidemiology, and inheritance of pancreatic ductal adenocarcinoma. *In Seminars in oncology*, 42(1), 8-18. WB Saunders.
- Zheng, W., Gustafson, D. R., Moore, D., Hong, C. P., Anderson, K. E., Kushi, L. H., ... & Cerhan, J. R. (1998). Well-done meat intake and the risk of breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(22), 1724-1729.
- Zhou, Q., & Melton, D. A. (2018). Pancreas regeneration. *Nature*, 557(7705), 351-358.