



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BORAKS PENTAHİDRAT'IN GLİOBLASTOMAMULTİFORME
HÜCRE HATTI ARACILIĞIYLA TEDAVİ POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

BURAK ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. MEHMET KORKMAZ

MANİSA
2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BORAKS PENTAHİDRAT'IN GLİOBLASTOMAMULTİFORME
HÜCRE HATTI ARACILIĞIYLA TEDAVİ POTANSİYELİNİN
ARAŞTIRILMASI**

BURAK ÇELİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. MEHMET KORKMAZ

(Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Erdal BALCAN

(Jüri Üyesi)

Dr.Öğr.Üyesi Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN

(Jüri Üyesi)

MANİSA-2019

YÜKSEK LİSANS TEZ SINAVI TUTANAĞI

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Burak ÇELİK'in Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı "**Boraks Pentahidrat'ın Glioblastoma Multiforme Hücre Hattı Aracılığıyla Tedavi Potansiyelinin Araştırılması**" başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" kararı verilmiştir.27/05/2019

İmza

Jüri Üyesi:

Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Erdal BALCAN (Manisa Celal Bayar Üni. Öğretim Üyesi)

Dr.Öğr.gör. Burcu ERBAYKENT (Uludağ Üni. Öğretim Üyesi)
TEPEDELEN

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 31.05.19 tarih ve.17.11.... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bilal HABEŞ GÜMÜŞ
Enstitü Müdürü Vekili

T.C
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
ULUSAL TEZ MERKEZİ

TEZ VERİ GİRİŞ FORMU

Referans No	10251106
Yazar Adı / Soyadı	BURAK ÇELİK
T.C.Kimlik No	30280361058
Telefon	5549345800
E-Posta	burak4293@hotmail.com
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	BORAKS PENTAHİDRAT'IN GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE HATTI ARACILIĞIYLA TEDAVİ POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI
Tezin Tercümesi	BORAKS PENTAHİDRAT'IN GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE HATTI ARACILIĞIYLA TEDAVİ POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI
Konu	Tıbbi Biyoloji = Medical Biology
Üniversite	Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Enstitü / Hastane	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2019
Sayfa	68
Tez Danışmanları	PROF. DR. MEHMET KORKMAZ
Dizin Terimleri	
Önerilen Dizin Terimleri	Apoptoz=Apoptoz, Boraks Pentahidrat=Boraks Pentahidrat, Glioblastoma Multiforme=Glioblastoma Mutiforme, Sitotoksite=Sitotoksite, U-87 MG=U-87 MG

19.06.2019

İmza:.....

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışının olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığını beyan ederim.

BURAK ÇELİK
2019



TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitim hayatımda bilgileri ve imkânları ile bana destek olan danışmanım Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ'a ve üniversitemizin değerli akademisyeni Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ'a; bilimsel bilgi ve birikimleri ile sağladıkları desteklerden dolayı Dr.Öğr. Üyesi Burcu ERBAYKENT TEPEDELEN'e ve Dr.Öğr. Üyesi Ayşegül DALMIZRAK'a; araştırmalarım boyunca destek veren ekip arkadaşım Yüksek Lisans Öğrencisi Ezgi ERSÖZ'e; tüm yaşamım boyunca bana maddi ve manevi destek olan aileme teşekkür ederim.

Burak ÇELİK
Manisa, 2019

İÇİNDEKİLER

Sayfa

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
TABLO DİZİNİ	v
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	vi
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ	3
2. GENEL BİLGİ	5
2.1. KANSER.....	5
2.1.1. Astrositler.....	6
2.1.1.1. Glioma.....	7
2.1. Glioblastoma Multiforme (Gbm)	9
2.2. BOR	10
2.3. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI	14
2.3.1. Apoptoz.....	15
2.3.2. Otofaji	17
2.3.3. Nekroz	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. HÜCRE HATTININ TEMİN EDİLMESİ.....	22
3.2.HÜCRE HATTININ ÇOĞALTILMASI VE PASAJLANMASI.....	22
3.3.HÜCRE HATTININ DONDURULMASI VE SAKLANMASI	23
3.4.HÜCRE SAYIMI	24
3.5.HÜCRE KİNETİĞİNİN BELİRLENMESİ	25
3.6.HÜCRE HATTININ İKİLENME SÜRELERİNİN BELİRLENMESİ.....	25
3.7.BPH'IN HAZIRLANMASI.....	25
3.8.BPH'IN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ VE IC ₅₀ DEĞERİNİN HESAPLANMASI..	25
3.9.HÜCRELERİN ÖLÜM TİPLERİNİN BELİRLENMESİ.....	26
3.9.1.Apoptotik Değerinin Belirlenmesi	26
3.9.2.Otofajik Değerinin Belirlenmesi	27
4. BULGULAR.....	30

4.1.U-87 MG HÜCRE HATTININ İKİLENME SÜRESİNİN BELİRLENMESİ VE KİNETİĞİNİN OLUŞTURULMASI	30
4.2. GBM HÜCRE HATTI U-87 MG HÜCRE KÜLTÜRÜNDE BPH'IN HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ (MTT ANALİZİ)	31
4.3. U-87 MG HÜCRE HATTININ KÜLTÜRÜNDE BPH'IN TETİKLEDİĞİ ÖLÜM MEKANİZMASININ SAPTANMASI.....	32
4.3.1. Apoptoz Yönünden Değerlendirme	32
4.3.2. Otofajik Yönden Değerlendirme.....	33
5. TARTIŞMA	35
6. KAYNAKLAR	38
7. EKLER	50
8. ÖZGEÇMİŞ.....	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Nöron ve glia hücrelerinin farklılaşması (Huse ve Holland 2010).....	6
Şekil 2.2. Sinir sistemi hücrelerinin sınıflandırılması (Hubbard ve Binder 2016).	7
Şekil 2.3. Primer beyin ve/veya merkezi sinir sistemi gliomlarının dağılımı (Steven B. ve Abdullah K.G. 2016).....	9
Şekil 2.4. Primer ve sekonder glioblastoma oluşumuna yol açan moleküler ve genetik değişiklikler (Steven B. ve Abdullah K.G. 2016)	10
Şekil 2.5. BPH'nin kimyasal yapısı ve fiziksel görünüşü (Etimaden, 2014).....	11
Şekil 2.6. B elementinin insan vücudunda ki metabolizması (Ruya K. ve Ayşen Y. 2017)...	12
Şekil 2.7. Klinikte kullanılan B maddelerinin kimyasal yapısı (Das B.C. ve ark. 2013).....	13
Şekil 2.8. Hücre ölüm mekanizmaları (Tan C.P. ve ark. 2014). (A.Apoptoz; iç yolak ve dış yolak olmak üzere iki farklı şekilde başlatılabilen bir hücre ölüm çeşididir. Her iki yol da efektör olan caspase 3'ün aktivasyonuna yol açar. Caspase 3 hücre ölümünün esas basamağıdır. B.Otofaji, otofagozom adı verilen kendi kendini sindirebilen çift zarlı vezikülleri içeren bir yoldur. mTOR tarafından tetiklenir. C. Nekroz, Apoptoza alternatif olarak DNA hasarı veya enfeksiyon gibi hasarlara karşı hücre nekroptozu sürüklenir (Peixoto MS. ve ark. 2017).)	15
Şekil 2.9. Apoptozu başlatan iki alternatif yol; iç ve dış yolda apoptoz (De Almagro M.C. ve Vucic D. 2012).....	16
Şekil 2.10. Otofaji mekanizmaları (Mizushima ve ark. 2008).....	18
Şekil 2.11. Makrotofajiye genel bakış (Kristiane ve ark. 2017)	19
Şekil 2.12. Nekroz oluşumu (Ashida H. ve ark. 2011)	21
Şekil 4.1. Absorbans değerinin zamana bağlı değişiminde hücre sayısı grafiği.....	30
Şekil 4.2. U-87 MG hücre hattının zamana bağlı hücre sayısı eğrisi.....	31
Şekil 4.3. U-87 MG hücre hattının BPH'nin artan konsantrasyonlarında 24., 48. ve 72. saatlerinde BPH'nin artan konsantrasyonlarında U-87 MG hücre hattının canlılığının MTT yöntemi ile belirlenmesi (*p<0.01, **p<0.001).....	32
Şekil 4.4. GBM hücre kültüründe BPH'nin IC ₅₀ konsantrasyonu ile (IC ₅₀ : 2454µM) 72 saat muamele edilen U-87 MG hücrelerinin canlı ve apoptotik evreleri	33
Şekil 4.5. BPH'nin IC ₅₀ konsantrasyonu ile (IC ₅₀ : 2454µM) muamele edilen U-87 MG hücrelerinin otofaji indüksiyon oranı ve ortalama otofaji yoğunluğu.....	34

TABLO DİZİNİ

Tablo

Sayfa

Tablo 4.1. U-87 MG hücre hattında 24.,48.,72. saatte BPH'ın farklı konsantrasyonlardaki % canlılık ölçüm değerleri	32
Tablo 4.2. U-87 MG hücre hattının BPH'ın IC50 konsantrasyonu ile muamelesi sonrası canlı ve apoptotik yönden değerlendirilmesi	33
Tablo 4.3. BPH'ın IC50 konsantrasyonu ile muamele edilmiş U-87 MG hücre hattının otofaji indüksiyon oranının ve ortalama otofaji yoğunluğunun karşılaştırılması.....	34



KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

7-AAD	7-aminoactinomycin D
μ M	Mikro molar
μ l	Mikro litre
APAF1	Apototikpeptidaz aktive edici faktör -1
Atg	Otofaji ilişkili gen
ATP	Adenozintrifosfat
B	Bor
BAD	Bcl-2 ilişkili hücre ölüm agonisti
BAK	Bcl-2 antagonisti
BAX	Bcl-2 ilişkili x proteini
BCL-2	B-hücre lenfoma 2
BCL-XL	Bcl-2-benzeri 1
BH3	Bcl-2 homojeni 3
BID	Bh3'le etkileşen domain ölüm agonisti
BIM	Bcl-2-aracılı mediatörü
BNCT	Bor nötron yakalama terapisi
BPH	Boraks Pentahidrat
CD95	Farklılaşma Kümesi 95
CO ₂	Karbondioksit
DEP	Düzensiz Egl-10 ve Pleckstrin
Depcor	Dep alanı içeren mtor etkileşen protein
DISC	Ölüm indükleyici sinyal kompleksi
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR4/5	Ölüm reseptörü 4/5
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FADD	Fas ilişkili ölüm domaini
FBS	Fetal dana serumu
FDA	Gıda ve ilaç dairesi
FIP-200	200 kDa'lıkfokal adezyon kinaz ailesi ile etkileşen protein
FLICE	FADD benzeri IL-1b dönüştürücü enzim

FLIP	FLICE inhibitör proteini
GβL	Memeli G proteini β-altbirim benzeri protein
GBM	Glioblastomamultiforme, IV evre Astrositoma
Gln	Glutamin
Hsp73	heatshock protein 73
IC ₅₀	Hücre proliferasyonunu %50 inhibe eden konsantrasyon değeri
KASPAZ	Sisteine bağlı aspartat yönlendirmeli proteazlar
LC3	Hafif zincir 3
MDR	Çoklu ilaç direnci geni
MEM	Minimum essentialmedia
MLKL	mixedlineagekinase benzeri domaini
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
mTOR	Rapamisin memeli hedefi
mTORC1	Rapamisin memeli hedef kompleksi-1
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaBC1	Sodyum bağımlı borat taşıyıcı 1
NAD	nikotinamitadenindinükleotit
NFKB	Nüklear faktör kappa B
NOXA	Forbol-12-miristat-13-asetat ile indülenen protein
p53	Protein 53
p150	İnsan 150-kDa protein
PBS	Fosfat tuz tamponu
PE	Fosfatidiletanolamin
Phe	Fenilalenin
PI3K	Fosfotidilinozitol 3 kinaz
PS	Fosfatidilserin
Psp3P	Pombe serin proteaz 3 proteini
PSS	Periferal sinir sistemi
PUMA	Apoptoz p53 upregüle modülatörü
RAPTOR	Mtor'un düzenleyici ilişkili protein
RIPK3	Reseptör etkileşimli protein kinaz 3
RNA	Ribonükleik asit

ROS	Reaktif oksijen miktarı
TNF	Tümör nekroz faktörü
TRAIL	Tümör nekroz faktörü ile ilgili apoptoz-indükleyici ligand
ULK	UNC-51 benzeri kinaz
Vps	Vacuolar protein sıralama
Vps34	Vakuoler protein sıralama 34
WHO	Dünya sağlık örgütü



BORAKS PENTAHİDRAT'IN GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE HATTI ARACILIĞIYLA TEDAVİ POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Adı Soyadı: BURAK ÇELİK

Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji

ÖZET

Amaç: Çalışmadaki amacımız bu alanda yeni bir bor bileşiği olan Boraks pentahidrat (BPH)'ın 4. evre beyin kanseri olan glioblastomamultiforme (GBM) hücre hattı U-87MG üzerinde sitotoksik etkisinin ve bununla birlikte hangi hücre ölüm mekanizmasının tetiklendiğinin araştırılmasıdır.

Gereç ve yöntem: BPH'ın U-87 MG hücre hattındaki sitotoksik etkisi MTT yöntemi ile ölçülmüştür. Ardından, belirlenen IC₅₀ dozu ile apoptoz ve otofaji yönünden floresan tabanlı bir teknike çalışan Muse® hücre analiz cihazı kullanılmıştır. Elde edilen veriler, GraphPadprism istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Sitotoksisite deneyleri sonucunda U-87 MG üzerinde BPH' ın IC₅₀ değeri 2,454 µM bulunmuştur. IC₅₀ değerine bağlı olarak apoptotik yönden kontrol grubunda %3 deney grubunda %41 oranında hücre ölümü bulunmuştur(P<0,01). Otofaji yönünden değerlendirmede ise kontrol grubunda 1,0 oranında yoğunluk değeri bulunurken deney grubunda 1,2 oranında değer bulunmuştur(p>0,01). Bulguların istatistik açıdan değerlendirilmesi sonucunda apoptoz yönünden anlamlı bir sonuç gözlenirken; otofajik yönden anlamsız olduğu saptanmıştır.

Sonuç: Bu veriler ışığı altında BPH'ınGBM'e model oluşturan U-87 MG hücre hattı üzerinde sitotoksik bir etkinin olduğu görülmüştür. Bu etkinin otofaji hücre ölüm mekanizması yerine apoptoz mekanizması üzerinden gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, BPH'ınapoptozu uyaran kemoterapötiklere karşı dirençli olan GBM tedavisinde kullanılabilecek bir madde olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Sözcükler: Apoptoz, Boraks Pentahidrat, Glioblastomamultiforme, Sitotoksite, U-87 MG

INVESTIGATION OF THE TREATMENT POTENTIAL OF BORAKS PENTAHYDRATE WITH GLYOBLASTOMA MULTIMEDIA CELL LINE

Name-Surname: BURAK ÇELİK

Advisor: Prof. Dr. Mehmet KORKMAZ

Department: Medicalbiology

ABSTRACT

Aim: The aim of this study is to investigate the cytotoxic effect of borax pentahydrate (BPH), in this area new boron compound, on glioblastoma multiforme (GBM) cell line U-87MG, which is a new boron compound, and which cell death mechanism is triggered.

Material and methods: The cytotoxic effect of BPH's U-87 MG cell line was measured by MTT assay. Then, a technically operated Muse® cell analyzer with a fluorescent base was used in the direction of apoptosis and autophagy with the determined IC50 dose. The obtained data were evaluated using GraphPad prism statistics program.

Results: As a result of cytotoxicity experiments, the IC50 value of BPH in U-87 MG was found to be 2,454 µM. In the apoptotic control group, 41% of cell deaths were found in the 3% test group ($P < 0,01$), depending on the IC50 value. In the autophagy evaluation, the control group had a density value of 1,0 and the experimental group had a value of 1,2 ($p > 0,01$). Statistical evaluation of the findings showed a significant effect on apoptosis; autophagic direction.

Conclusions: This was found to be a cytotoxic effect on the U-87 MG cell line modeling BPH's GBM under the light of this data. It has been determined that this effect is achieved via apoptosis mechanism instead of autophagy cell death mechanism. These results suggest that BPH may be an agent that can be used in the treatment of GBM which is resistant to apoptosis-stimulating chemotherapeutics.

Keywords: Apoptosis, Boraxpentahydrate, Glioblastomamultiforme,
Cytotoxicity, U-87 MG



1. GİRİŞ

Beyin tümörleri akciğer, meme ve böbrek gibi periferik kanserlerin metastatik lezyonlarından oluşur. Bu tümörler bulundukları bölgeye göre primer ve metastatik beyin tümörleri olarak sınıflandırılmaktadır. Gliomlar primer beyin tümörlerinden biri olarak; astrositoma, oligodendroglioma ve oligoastrocitoma gibi tümörleri kapsayan bir alt sınıftır. Bu tümörler arasında görülme sıklığı en fazla olan tümör ise astrositomalardır. Astrositoma Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 4 evrede sınıflandırılmaktadır. GBM ise bu sınıflandırma içerisinde en agresif formdur. GBM için sağkalım süresi 12-15 ay arası olarak belirlenmiştir. Bu sürenin uzatılamamasının sebebi olarak, çoklu ilaç direnci ve uygulanan tedavi sırasında kullanılan ilaçların kan-beyin bariyerini geçememesi gösterilmektedir (Hubbard ve ark. 2016; Louis ve ark. 2016.).

Bor (B), periyodik cetvelin 5. sırasında ve 3A grubunda olup tek metal olmayan element olma özelliği taşımaktadır. Doğada kolemanit ve tinkal gibi bileşikler halinde bulunmaktadır. Oksijen ile de bileşik oluşturabilmektedir ve bu bileşikler Borat olarak adlandırılmaktadır (Demirtaş 2010; Bilgiç ve Dayık 2013.).

Apoptoz ve otofaji, genetik olarak düzenlenmiş, hücre kaderini düzenleyen evrimsel olarak korunan süreçlerdir. Hem apoptoz hem de otofaji, gelişimde ve normal fizyolojide ve çok çeşitli hastalıklarda önemlidir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, bu iki süreç arasındaki belirgin farklılıklara rağmen, düzenlemelerinin yakından bağlantılı olduğunu ve aynı düzenleyicilerin bazen hem apoptozu hem de otofajiyi kontrol edebildiklerini göstermektedir (Thorburn 2008).

Yapılan çalışmalarda B içeren bileşiklerin genel olarak canlılar üzerinde herhangi bir karsinojenik veya mutajenik etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir (Murray 1998; Fail ve ark. 1998). B bakımından zengin bölgede yaşayan bireyler üzerinde yapılan bir epidemiyolojik çalışma sonucunda, elementin herhangi bir genotoksik etkisine rastlanılmamış ve genetik hasarı tedavi edici bir etkisinin olabileceği kanısına varılmıştır (Uçkun 2006). Korkmaz ve ark. tarafından yürütülen

benzer bir epidemiyolojik çalışmada B bakımından zengin bölgede yaşayan 472 ve B yönünden fakir bölgede yaşayan 587 olmak üzere toplamda 1059 kadından servikalsmear alınmış ve sadece B yönünden fakir olan bölgede yaşayan kadınlardan 15’inde sitopatolojik bulgulara rastlanmıştır (Korkmaz ve arkadaşları 2007).

Deneysel olarak prostat kanseri hücre hatlarında yapılan bir çalışmada ise B’ nin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak anti-proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir (Barranco ve ark. 2007).

Bu çalışmada, insan GBM hücre hattı U-87 MG zerinde BPH’ın konsantrasyon ve zamana bağlı olarak sitotoksik etkisinin belirlenmesi ve bu etkiyi hangi ölüm mekanizması üzerinden gerçekleştirdiğinin tespiti hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİ

2.1. KANSER

Kanser, belirli bir doku veya organda tek tip veya birden fazla hücrede mutasyon sonucu oluşan, sınırsız bölünme yeteneğine sahip olan hücrelerin meydana gelmesi ile sonuçlanan karmaşık genetik bir olaydır. Normal hücrelerde büyümenin tetiklendiği veya baskılanabildiği bir denge var iken; kanserli hücrede bu denge yok edilmiş ve bu dengeyi sağlayan proteinleri kodlayan genlerde de mutasyonların varlığı söz konusudur (Hanahan ve Weinberg 2011).

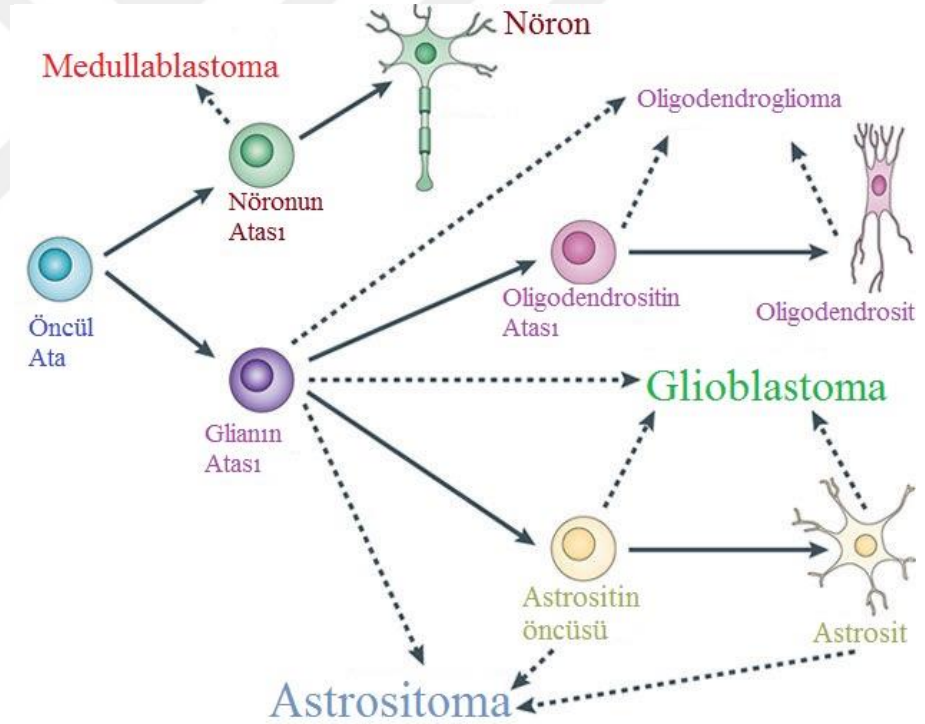
Normal hücreler, sessiz durumdan aktif duruma geçmeden önce mitojenik büyüme sinyallerine ihtiyaç duyarlar. Bu sinyaller transmembran reseptörler vasıtasıyla hücrenin içine iletilir. Bu sinyallerin yokluğunda normal hücre çoğalamaz. Kanser hücreleri büyüme sinyalleri taklit ederek bu işlemleri gerçekleştirmektedir (Alimandi ve ark. 1997). Bu anormal büyüme, organizmada hücrenin çoğalmasında, farklılaşmasında ve sağ kalımında rol oynayan genlerde oluşan mutasyonlar sonucu gözlemlenir (Lieberman ve Marks 2013). İlk mutasyon hücrelerin genetik olarak homojen bir kopya elde etmek için bölünmelerine sebep olur. Bunu takiben oluşan mutasyonlar hücrenin büyümek için gerekli potansiyelini arttırmaya yönelik olmaktadır. Sonuçta oluşan hücre topluluğu (tümör), içerisinde farklı özelliklere sahip alt kopyalar (klonlar) meydana getirir ve böylelikle kanser hücrelerinin oluşturduğu tümör heterojen bir yapı kazanır. Gelişen ve büyüyen mutasyonlu hücrelerin sayısı arttıkça sağlıklı hücrelerin işlevlerini baskılar (Frederick ve ark. 2003; Macdonald ve ark. 2004).

Tümör köken aldığı dokuda bulunduğu sürece benign olarak adlandırılır. İnvazyon yeteneği kazandığında ise malign olarak tanımlanır. Malign tümörlerin en belirgin özelliği farklı doku veya organlara metastaz yapabilmesidir. Bu sayede farklı

dokularda normal hücreleri baskılayabilir ve göç ettiği dokuda tümör oluşumunu gerçekleştirebilirler (Cooper ve Hausman 2015).

2.1.1. ASTROSİTLER

Sinir sistemi hücreleri nöronlar ve nöronlardan daha fazla sayıda olan glialar olmak üzere iki tip hücreden oluşmaktadır. Glia hücreleri, nöronların arasında yer alıp onları çevreleyen, fiziksel bariyer görevi gören, besin ve oksijen temini için iyon kanallarını içeren, atıkları uzaklaştıran ve nöronlar arasındaki iletişimi sağlayan sinir hücreleridir (Mihailoff ve Haines 2018). Nöron ve glia hücrelerinin farklılaşması şekil 2.2’de gösterilmiştir. Glia hücrelerinin bir alt tipi olan astrositler MSS’de en fazla sayıda bulunan hücrelerdir. Aynı zamanda astroglia olarak tanımlanır (Guo ve ark. 2014; Verkhratsky ve Parpura 2017).

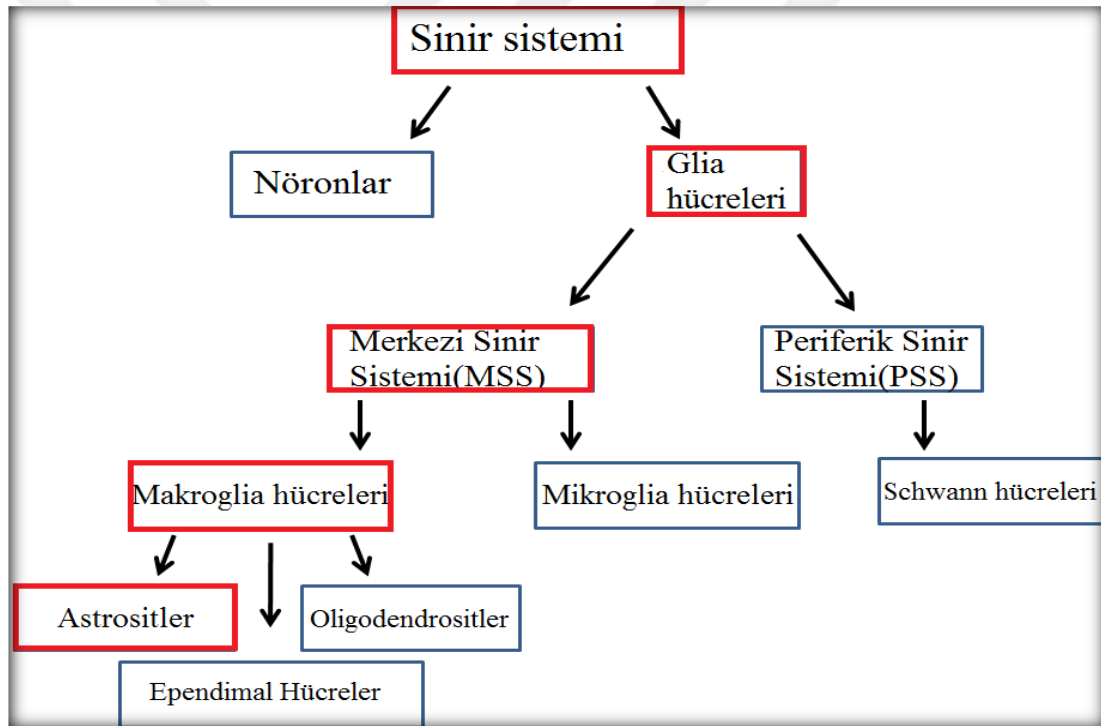


Şekil 2.1. Nöron ve glia hücrelerinin farklılaşması (Huse ve Holland 2010).

Merkezi sinir sisteminin büyük bir kısmını oluşturan astrositler, nöron hücreleri gibi yıldızsı formda olup yalancı ayak benzeri çok sayıda uzantıya sahiptir.

Astrositleri diğer glia hücrelerinden ayıran önemli özelliklerin bazıları; elektrikle uyarılabilme, çok negatif membran potansiyeli, nörotransmitter nakil araçlarının ekspresyonu ve sitoskelet oluşumuna katılan ara filament ekspresyonudur (Allen ve Barres 2009;Hubbard ve Binder 2016).

Astrositler beyindeki endotelial hücreleri ile bağlantı kurarak kan beyin bariyeri yapısına katılırlar. Kan dolaşımı ile beyine gelen madde bileşimlerinin seçici geçirgen olarak girişini denetleme ve düzenlemede, hasar görmüş nöronların iyileştirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Siegel ve Agranoff 1999; Huse ve Holland 2010; Hubbard ve Binder 2016). MSS ve PSS’de bulunan glia hücrelerinin morfolojik özelliklerine, işlevlerine ve sinir sisteminde bulundukları konuma göre sınıflandırılması şekil 2.1’de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Sinir sistemi hücrelerinin sınıflandırılması (Hubbard ve Binder 2016).

2.1.1.1. GLİOMA

Glia hücrelerinin kanserleşmesiyle oluşan Glioma hücreleri MSS’de en sık görülen malign tümörlerdir ve toplam beyin tümörlerinin yaklaşık olarak 4/5’lik kısmını oluşturmaktadır. WHO malign derecesine göre gliomalar 4 sınıfa

ayırmaktadır (Holland 2000; Stupp ve ark. 2005; Kerkhof, Melissa ve ark. 2013; Galluzzi ve Vitale 2017).

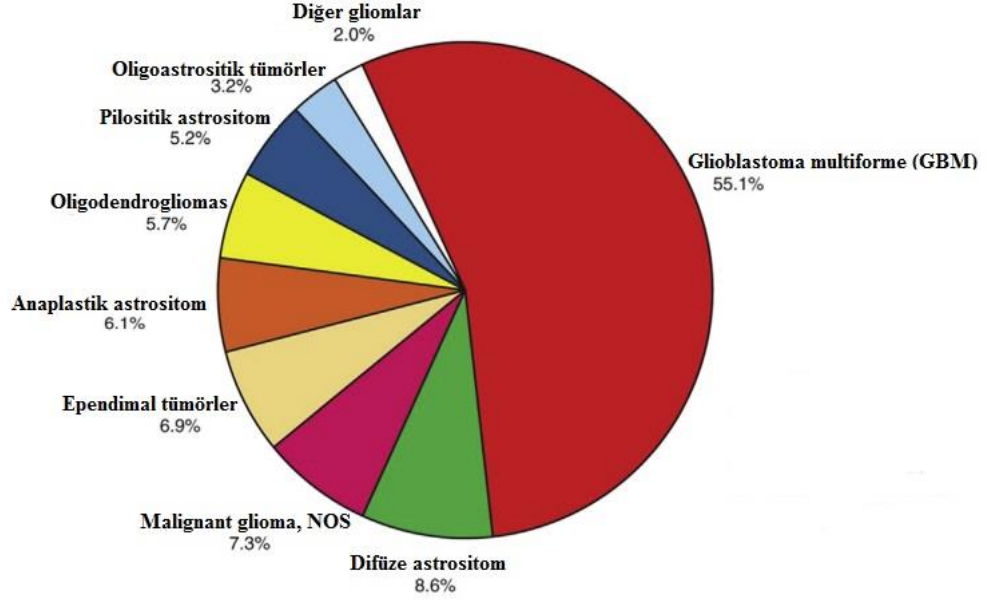
Dünya sağlık örgütünün yaptığı sınıflandırmaya göre;

I. Evre: Pilositikastroitom: Bening tümör olarak bilinmektedir. Genç yaştaki bireylerde rastlanmakta olup normal dokulara invazyon görülmez. Sınırlı görüntüleme yöntemleri ile oval ve yuvarlak şekilli olarak görülmektedir. Tanı konulduktan sonra sağkalım yaklaşık 20 yıldır. Cerrahi, kemoterapi ve radyoterapi ile tedavi edilebilmektedir (Bauman ve ark. 1999; Pignatti ve ark. 2002; Collins ve ark. 2015).

II. Evre: Diffüz veya düşük dereceli astrositom: sağkalımı yaklaşık 5-10 senedir. Normal dokulara invazyon yapmaktadır. Tedavi şekli cerrahi, radyoterapi ve kemoterapidir. Bu tedavi biçimleri ayrı ayrı ya da kombine bir biçimde uygulanabilmektedir (Keleş ve ark. 2001; Quinn ve ark. 2003; Schiff 2015).

III. Evre: Anaplastikastroitom veya anaplastikoligodendroglioma: Cerrahi müdahale ile tümör yayılması önlenirken kemoterapi ile de hastanın yaşam süresi uzatılmaya çalışılmaktadır. Genellikle 3. evre 4. evre ile birlikte anılmaktadır. Ortalama yaşam süresi 2 yıldır (Alifieris ve Trafalis 2015).

IV. Evre: GBM: Malignprimer beyin tümörüdür. Hücresel ve moleküler düzeyde geniş bir heterojenite gösterdiği için bu ismi almıştır. Yetişkin bireylerde çok sık rastlanılmaktadır. Ortalama yaşam süresi 12-15 ay aralığındadır (Young ve ark. 2009; Kanu ve ark. 2009). GBM'nin diğer gliomlara göre dağılımı şekil 2.3'de gösterilmiştir.

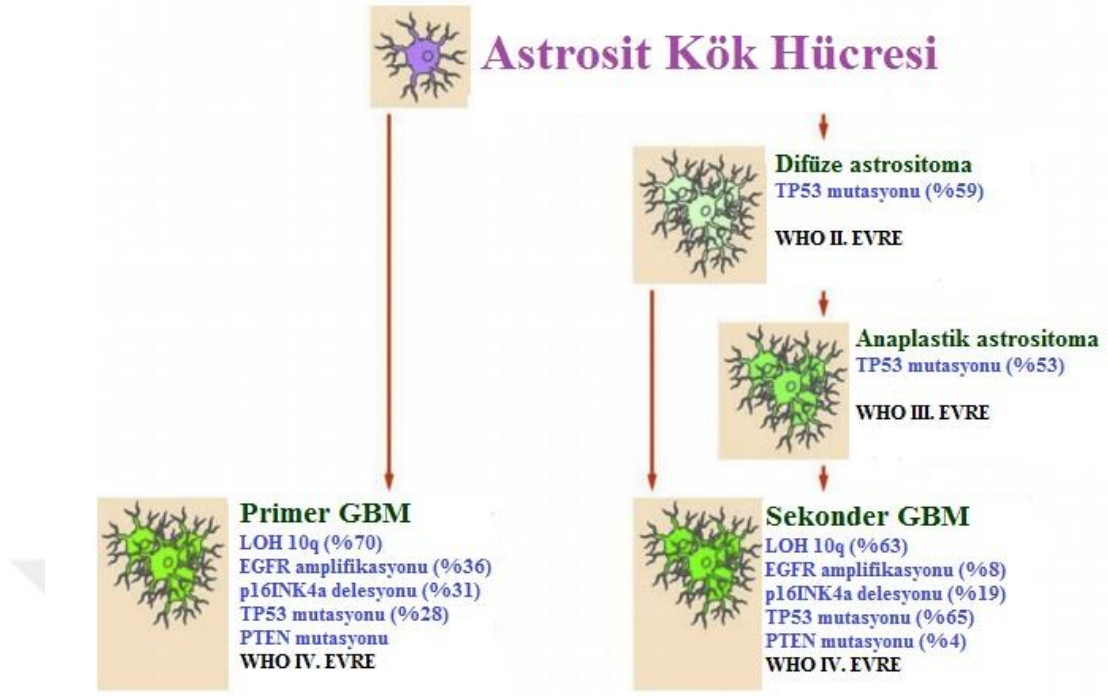


Şekil 2.3.Primer beyin ve/veya merkezi sinir sistemi gliomlarının dağılımı (Steven ve Abdullah 2016).

2.1.1.1.1. GLİOBLASTOMA MULTİFORME(GBM)

Moleküler alanda yapılan çalışmalar sonucunda, GBM'nin oluşumunda hücre içi sinyal yolaklarını ya da hücresel işlevleri etkileyen ortak moleküler değişikliklerin meydana geldiği gözlemlenmiştir. Bu gözlemler sonucunda tümör baskılayıcı genlerin ifadesinin azaldığı ya da tamamen kaybedildiği ve bununla beraber onkogenlerin aşırı ifadesi ya da amplifikasyonu sonucunda GBM oluştuğu belirlenmiştir (Montano ve ark. 2011).

GBM, birincil ve ikincil form olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Primer (birincil) GBM, herhangi bir evreden gelişmeden doğrudan meydana gelmektedir ve çoğu GBM primer olarak gelişmektedir (Şekil 2.4). Genellikle 50 yaş ve üzeri hastalarda görülür. Tümör oluşumundan sonraki 6 ay içerisinde görülecek düzeye ulaşır. Sekonder GBM ise genç hastalarda görülür. II. ve III. evre astrositomun mutasyonları sonucunda oluşmaktadır (Steven ve Abdullah 2016).



Şekil 2.4.Primer ve sekonder glioblastoma oluşumuna yol açan moleküler ve genetik değişiklikler (Steven ve Abdullah 2016).

2.2. BOR

Bor (B) doğada boratlar, yani B'un oksijenli bileşikleri halinde kömürlerde, tortul kayaçlarda, okyanuslarda ve toprakta bulunan bir elementtir. B kayaların ve toprakların doğal olarak aşınması sonucu hava, toprak ve suda döngüye girmektedir. B'a maruz kalma durumunun başlıca sebebi olarak gıda ve su gösterilmektedir. Dünya sağlık örgütü verilerine göre günlük kabul edilebilir B miktarı ortalama 3 mg olarak belirlenmiştir (WHO, 1998). Aşırı maruz kalma durumunda toksik etkileri olduğu ve insan vücudunu olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. İnorganik olan borat bileşikleri ise endüstriyel alanlarda ve tıbbi uygulamalarda kullanılmaktadır (Ince ve ark. 2017).

Bir B bileşiği olan BPH, sodyum, B, oksijen ve hidrojen elementlerinden oluşmuş bir bileşiktir. Sodyum tetraboratpentahidrat olarak içeriğini temsilen farklı olarak da isimlendirilebilmektedir (Şekil 2.5).

**$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – Boraks
Pentahidrat**

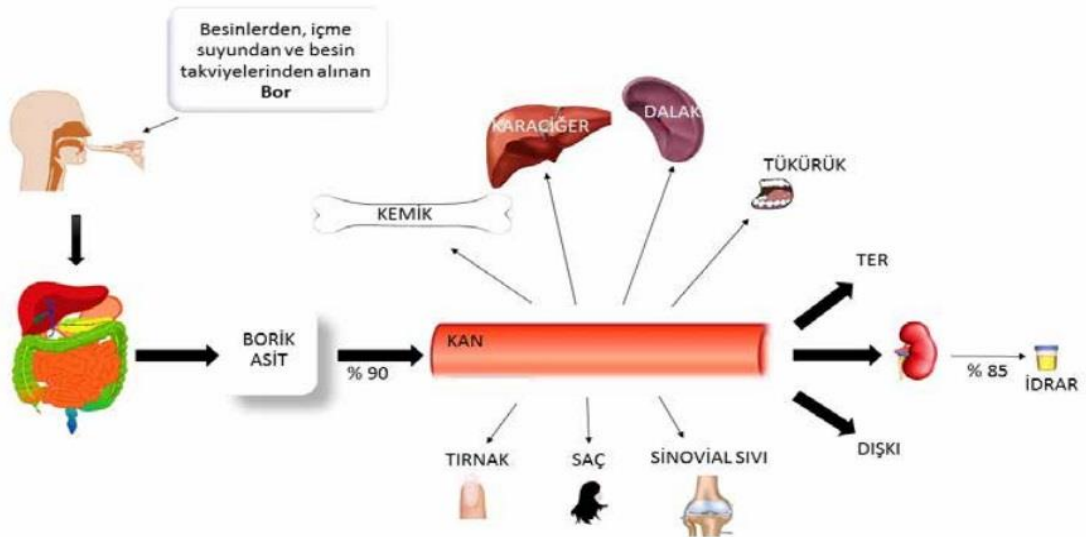


Şekil 2.5.BPH'nin kimyasal yapısı ve fiziksel görünüşü (Etimaden, 20/5/2014).

Son zamanlarda B'un sağlık alanında kullanılmaya başlanması ve farklı B bileşiklerini kullanarak sağlık alanında yapılan çalışmaların artışı dikkat çekmektedir (Demirtaş 2010). Yapılan çalışmalar sonucunda B'un insan vücudunda; mineral ve steroid hormon metabolizmasını düzenlediği (Naghii ve ark. 2011; Hakki ve ark. 2015), kemik gelişimini desteklediği (Hakki ve ark. 2010), yara iyileşmesini hızlandırdığı ve yara üzerinde ajanların neden olduğu DNA çift iplikli kırılmaların oluşumunu azalttığını (Nzietchueng ve ark. 2002; Tepedelen BE ve ark. 2016), enerji metabolizmasını düzenlediği (Hunt ve Herbel 1991), kansere yakalanma riskini azalttığı (Cui ve ark. 2004), zihinsel performansı arttırdığı (Penland 1994), erkeklerde semen kalitesini arttırdığı (Korkmaz ve ark. 2011) ve kilo alımını azalttığı belirlenmiştir (Aysan ve ark. 2011).

B bileşiklerinin oral yol ile vücuda alınmasının ardından borik aside dönüştüğü ve emilerek kana karışarak dokulara yayılım gösterdiği Şekil 2.6'da belirtilmiştir. İlk

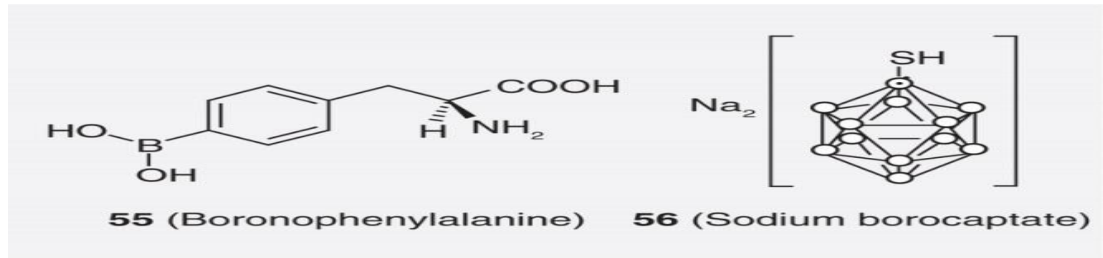
olarak bu olayın pasif difüzyon ile gerçekleştiği düşünülmüş fakat daha sonra hem taşıyıcı NaBC1 (Sodyum bağımlı borat taşıyıcı 1) ile hem de pasif diffüzyon ile alınabileceği düşünülmüştür. Vücuda alınan B miktarının yaklaşık olarak %85'i idrar yolu ile atılmaktadır. Belirtilen günlük alım miktarından az diyet uygulanan bireylerde idrarla magnezyum atımının arttığı ve beslenemeyen kemiklerin gelişiminin olumsuz yönde etkilendiği gözlenmiştir (Murray 1998; Park ve ark. 2005; Karadağ ve Türközü 2014). Plazmada fazla biriken B miktarının renal atılım ile dengede tutulduğu belirlenmiştir (Sutherland ve ark. 1999). Deneysel bir çalışmada 7 gün boyunca belirli sayıda ki bireylere B diyeti uygulanmış ve dokular incelenmiştir. Doku incelemesinde en yüksek B miktarı kemik dokuda ölçülmüş ve en düşük B miktarının da adipoz dokuda olduğu saptanmıştır (Ku ve ark. 1991). Vücuttaki B miktarı ile ilgili başka bir deneysel çalışmada ise kazada ölen kişilerin doku örnekleri ve vücut sıvısı örnekleri incelenmiştir. Sonuç olarak kemik dokularında ve sinoviyal sıvı örneklerinde daha yüksek B konsantrasyonu olduğu gözlemlenmiştir (Sutherland ve ark. 1999).



Şekil 2.6. B elementinin insan vücudunda ki metabolizması (Ruya K. Ve Ayşen Y. 2017).

B bileşiklerinin en son keşfedilen faydalarından biri kansere olan etkisidir. Bu keşif B diyeti ve prostat kanseri arasında ters bir ilişki olduğunu belirleyen epidemiyolojik çalışma ile başlamıştır (Nielsen 2014). Korkmaz ve ark. F-aktin mekanizmasını bozarak apoptotik bir etki ile prostat kanseri hücre hattında etki gösterdiği tespit edilmiştir (Korkmaz 2014). B içeren bileşiklerin en çok etkilediği kanser türleri; prostat, göğüs, servikal ve akciğer kanseri olarak belirlenmiştir. Bu kanser hücreleri üzerinde B aktivitesini içeren mekanizmalar serin proteazlar, NAD-dehidrogenazlar, mRNA ekleme ve hücre bölünmesi gibi çeşitli enzim aktivitesinin, apoptozun ve hücre bölünmesinin baskılandığı belirlenmiştir (Scorei ve Popa 2010).

B'un sağlık alanında bir başka kullanım alanı "B nötron yakalama terapisi (BNCT)" yöntemidir. BNCT'de farklı B bileşikleri denenmiş ve seçici bir şekilde kan dolaşımında bulunan kanserli hücreleri öldürdüğü keşfedilmiştir. Bu daha çok iki farklı B bileşiği kullanılarak açığa çıkan enerjinin öldürücü etkisi olarak kaynaklarda belirtilmektedir (Nakamura 2009). BNCT'nin insan GBM hücre hatları üzerine yapılan bir çalışmada U-118 MG hücre hattı kullanılmış ve apoptotik olarak bulunan kaspaz 3 ve kaspaz 7 üzerinde etki göstererek; hücreleri apoptoza sürüklediği saptanmıştır (Uram ve ark. 2017). BNCT'ye klinik olarak büyük bir ilgi gösterilmiş; yüksek dereceli gliomlar, baş ve boyun bölgesinde tekrarlayan tümörler, melanom ve hepatik metastaz tedavisi üzerine yoğunlaşmıştır. Yöntemde klinik olarak iki B maddesi; fenilaleninin (Phe) bir dihidroksiboril türevi olan, borofenilalanin 55 ve sodyum borokaptat 56 (şekil 2.7) kullanılmaktadır (Das ve ark. 2013).



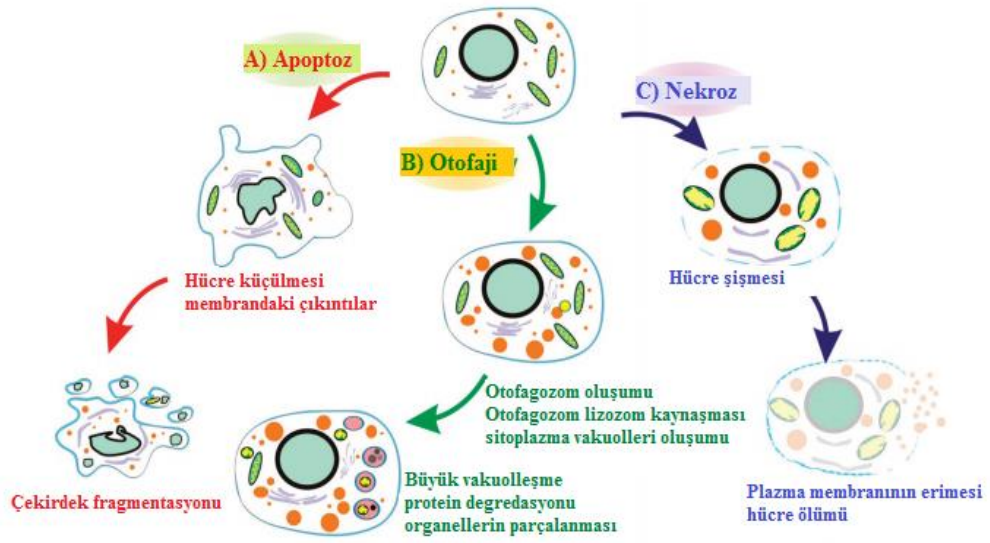
Şekil 2.7. Klinikte kullanılan B maddelerinin kimyasal yapısı (Das ve ark. 2013).

B ile ilgili yapılan farklı klinik çalışmalarda B bileşiklerinin etki değerleri araştırılmıştır. Araştırmalar sonucunda B bileşiklerinin osteoporozu önleyebileceği (Nielsen 1987, Boyacıoğlu ve ark. 2018), D3 vitamin seviyelerini ve kemikteki kalsiyum tutulumunu arttırdığı, vücuttaki kalsiyum tutulumunu azalttığı (Nielsen 1990; Naghii ve Samman 1997), inflamatuvar yanıtın düzenlenmesine yardımcı olduğu (Ameen ve ark. 2015) ve iyi huylu prostat büyümesini (Benignprostat hiperplazisi) baskıladığı ve MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında anti-kanserojenik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Tepedelen ve ark. 2015; Tepedelen EB ve ark. 2017). Bununla birlikte, B içeren “bortezomib” adlı ilaç günümüzde multiplmiyeloma tedavisinde kullanılmaktadır. Amerkian FDA (food and drug administration) onaylı bu ilaç klinik öncesi araştırmalarda; hücre döngüsünün bozulması, apoptozun baskılanması, kemik iliği mikro ortamının değişmesi ve NFκB (Nükleer faktör kappa B)’nin inhibisyonu dahil olmak üzere farklı bir takım anti-miyeloma etkisi göstermiştir (Field-Smith ve ark. 2006). Ayrıca B’un hücrelerde indirgenmiş glutatyon miktarını arttırdığı ve buna bağlı oluşan oksidatif hasarı baskıladığı kaynaklarda bildirilmiştir (Balabanlı ve Balaban 2015).

2.3. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI

Hücre ölümü, fizyolojinin birçok alanında (metabolizma, DNA hasar tepkisi ve lenfosit gelişimi gibi) merkezi bir öneme sahiptir. Hücrenin sağkalımı ile ölümü arasındaki karşılıklı etkileşimin bozulması, kanserin de içinde bulunduğu birçok hastalığın başlamasından sorumlu tutulur. Bundan dolayı yapılan toksikolojik araştırmalarda moleküler mekanizmanın tam olarak açığa çıkartılması önemlidir. (Peixoto ve ark. 2017).

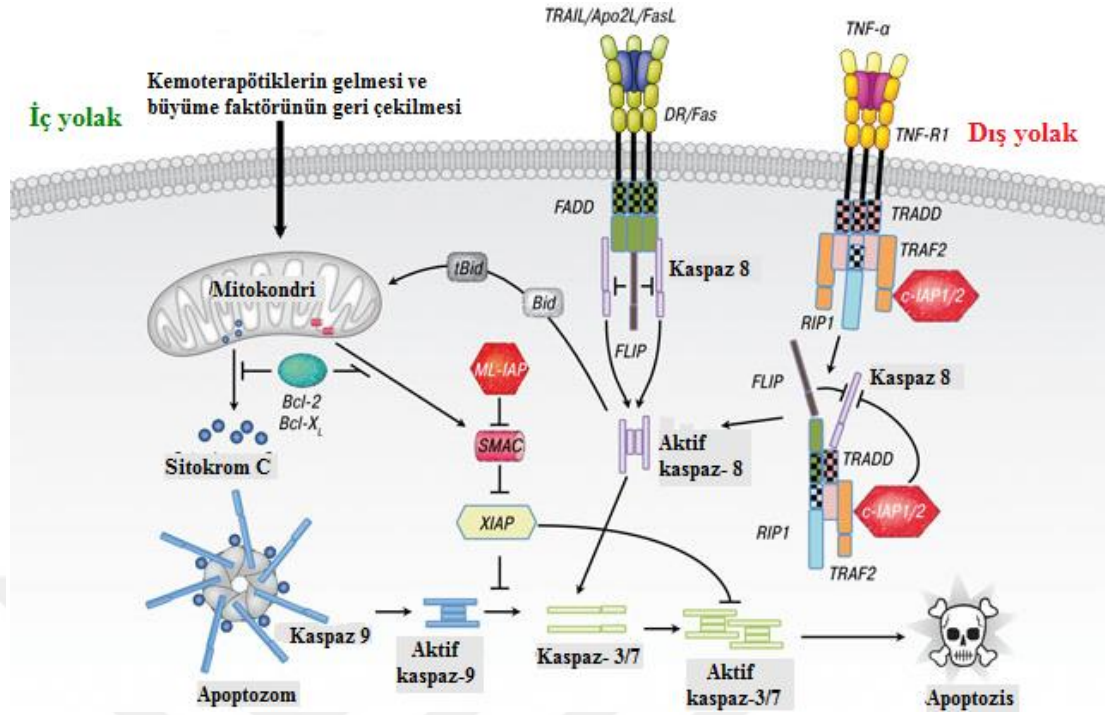
Hücre ölüm mekanizmaları Şekil 2.8’de belirtildiği üzere 3 temel gruba ayrılır.



Şekil 2.8. Hücre ölüm mekanizmaları (Tan ve ark. 2014). (A) Apoptoz; iç yolak ve dış yolak olmak üzere iki farklı şekilde başlatılabilen bir hücre ölüm çeşididir. Her iki yol da efektör olan kaspaz 3'ün aktivasyonuna yol açar. Kaspaz 3 hücre ölümünün esas basamağıdır. B)Otofaji, otofagozom adı verilen kendi kendini sindirebilen çift zarlı vezikülleri içeren bir yoldur. mTOR tarafından tetiklenir. C) Nekroz, Apoptoza alternatif olarak DNA hasarı veya enfeksiyon gibi hasarlara karşı hücre nekrotoza sürüklenir (Peixoto ve ark. 2017).

2.3.1. Apoptoz

Apoptoz, programlanmış bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Biyokimyasal olayların karakteristik hücresel değişikliklere yol açan organize bir olay olarak tanımlanabilir. Erken apoptozda gözlenen morfolojik değişiklikler arasında hücre büzülmesi, membran-lipid asimetrisinin kaybı ve kromatin yoğunlaşması vardır. Daha sonraki aşamada apoptotik body oluşumu ve hücre parçalanması meydana gelmektedir. Apoptoz esnasında gerçekleşen bu morfolojik değişiklikler, yolakların aktivasyonu ile düzenlenmektedir. Apoptozu başlatan iki alternatif yol vardır; bunlardan biri hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri (Dış yolak) ile diğeri mitokondri aracılığı (İç yolak) ile gerçekleşir. (Peixoto ve ark. 2017), (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Apoptozu başlatan iki alternatif yol; İç ve dış yolakta Apoptoz (De Almagro ve Vucic 2012).

Dış yolak ile apoptozun baskılanması, CD95, TNF (tümör nekroz faktör) 'ye bağlı ligand reseptörleri ve TRAIL-R (DR4 ve DR5) gibi reseptörlerin aktivasyonu ile tetiklenir. Ölüm domainleri, hücre dışı adaptör proteini FADD'yi çeker ve ardından pasif haldeki kaspazproteaz ailesini aktifleştirir. Aktifleşen proteinler (kaspaz-8, kaspaz-2 ve FADD), FLICE inhibitör protein (FLIP) ile birlikte ölüm indükleyici sinyal kompleksini (DISC) oluşturur. Daha sonra başlatıcı kaspaz-8 her iki yolakta yaygın olan yürütücü kaspazların (kaspaz-3,-6,-7) aktivasyonu ile apoptotikkaskadı daha da güçlendiren DISC bölünmesi ile aktif hale getirilir. Genellikle aktif makrofajlar tarafından üretilen TNF dış yolağa ek olarak; apoptozda TNF reseptörlerine bağlanan ve daha sonra apoptozundownstreamefektörlerini aktive edici rola sahip bir sitokindir (Peixoto ve ark. 2017;Gordeziani 2017).

İç yolak farklı uyaranlar ve mekanizmalar tarafından tetiklenebilir; Bununla birlikte hepsi mitokondrideki sitokrom c ve diğer proapoptotik proteinlerin salınmasına sebep olur. Mitokondriyal yolakta sitokrom c'nin salınması,

mitokondriyal geçirgenlik geçiş gözeneklerinin açılması ve mitokondriyal zar potansiyelinin kaybı ile bağlantılıdır. İç yolak Bcl-2 protein ailesi tarafından düzenlenir. Bad, Bid, Bim, NOXA ve PUMA sadece BH3 proteinleri olarak adlandırılan ve apoptozu teşvik eden Bcl-1 ailesi proteinleridir. Anti apoptotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-xL, dış mitokondri membranpermeabilizasyonunun indüklenmesi ve sitokrom-c salınması için önemli olan Bax ve Bak'ıninhibe eder. Sitozoldesitokrom c, APAF1 (apoptotikpreteaz aktive edici faktör), ATP, inaktif başlatıcı kaspaz-9 ile bir kompleks (apoptozom) oluşturur. Apoptozomun aktivasyonu, kaspazlar bir kaskad oluşturur. İç yolda p53, apoptotik aktivasyonun düzenlenmesinde büyük bir rol oynamaktadır. Hücresel stres sonucu DNA hasarı olduğunda, p53 aktive olur ve hücre döngüsünü duraklatır. Bununla birlikte DNA tamir enzimleri devreye girer ve tamirin mümkün olmadığı durumlarda apoptotik iç yolak aktif hale gelir (Peixoto ve ark. 2017;Gordeziani 2017).

Strese yanıt olarak bir hücrenin ölümü veya hayatta kalması konusundaki karar, pro-apoptotik ikincil habercilerin apoptozu etkinleştirmek için yeterli olup olmamasına bağlıdır. Farklı stresler bu habercilerin miktarını arttırsada, genlerin ve diğer süreçlerin stresi azaltmak ve ikincil habercilerin seviyelerini düşürmek için harekete geçirilmesi hücrenin ölme ihtimalini azaltır. Bu sağkalım öncesi mekanizmalar arasındaki Bcl-2, aktif Bax'ın etkilerini önlemek için etkindir ve reaktif oksijen türleri (ROS) temizleme proteinleri, ROS'un etkilerini azaltabilir. Şaperonların veya heatshock proteinlerinin aşırı ekspresyonunda, birçok pro-apoptotik sinyalin aktivasyonunu önler. Bu nedenle stres durumlarında hücreler, pro ve anti-apoptotik sinyalleri dengeleyerek gereksiz ölümlerden kaçınırlar (Peixoto ve ark. 2017;Gordeziani 2017).

2.3.2. Otofaji

Otofaji, Yunancadan İngilizceye çevirildiğinde 'Self- eating' anlamına gelmektedir. Türkçe karşılık olarak 'kendi kendinin yeme' durumu olarak tanımlanabilmektedir. Otofaji, veziküller (otofagozom) içine alınan organel ve proteinlerin, lizozom ile birleşmesiyle oluşan bir geri dönüşüm mekanizması olarak

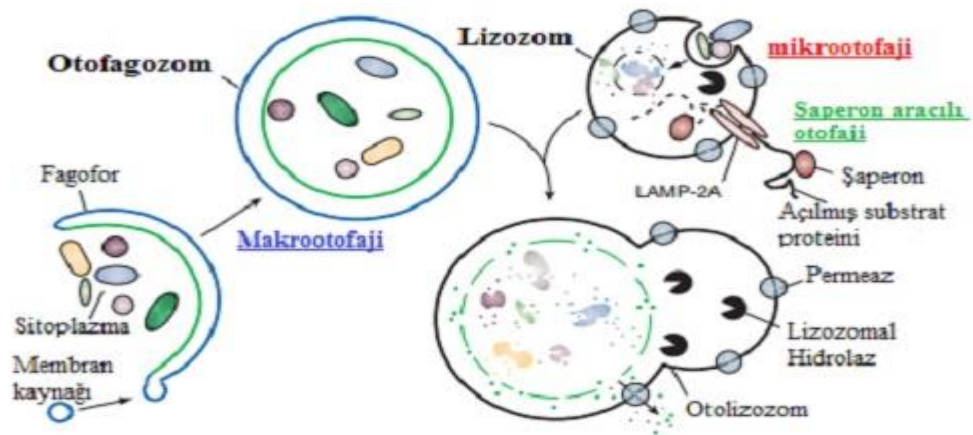
değerlendirilebilir. Bu mekanizmanın hücreye yarar sağlayan bir etkinliği de besin yokluğu koşullarında hücrenin yaşamını sürdürmesine yardımcı olmaktır. Bu yardım, hücredeki protein veya makromoleküllerin yıkımlarında artışa neden olarak bunları temel fonksiyonlar için tekrar enerji kaynağı dönüştürmekle mümkündür. Hücrenin besin açısından zengin olduğu zamanlar otofaji mekanizması mTOR kompleksi tarafından baskılanmaktadır (Cooper ve Hausman 2016). Burdan yola çıkılarak otofajinin, apoptoz ve nekroptoz gibi hücre canlılığı, beslenme ve stres gibi birçok biyolojik süreçle bağlantılı olduğu sonucuna varılmaktadır (Kolb ve ark. 2017; Reggiori ve Klionsky 2013).

Otofaji, hücreye gelen sinyal tipi ve hücre içi yapıların lizozoma taşınmasındaki farklı yollardan dolayı üç şekilde gerçekleşebilir (Şekil 2.10). Buna göre;

1) Mikrootofaji: Hücresel kaynaklı küçük parçacıkların membran da oluşan girintiyle lizozom içine alınarak yıkılmasıdır.

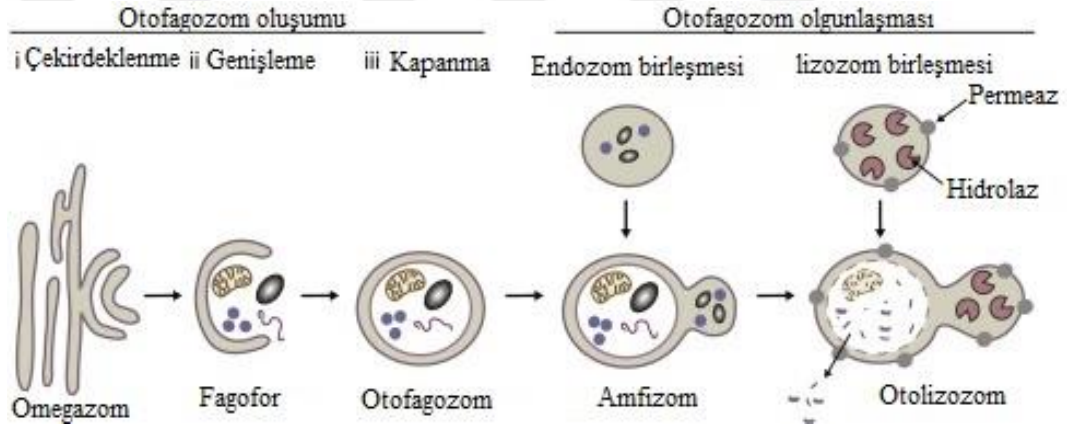
2) Makrotofaji: Otofajik hücre ölümünün ana mekanizmasıdır. Otofagozom içine alınan daha büyük hücresel kaynaklı parçacıkların ve organelerin lizozomla birleşerek yıkılmasıdır.

3) Şaperon aracılı otofaji: Peptit sekansı belirlenmiş sitozolik proteinlerin moleküler şaperonlar ile kompleks olan Hsp73 tarafından tanınması ve ardından lizozomlara taşınmasıdır. Bu tip protein yıkımının yapıldığı yolda veziküllerin destek sağladığı bir trafiğe gerek olmadığı bilinmektedir.



Şekil 2.10. Otofaji mekanizmaları (Mizushima ve ark. 2008).

Otofajininindükasyonu, omegazom olarak adlandırılan uzamış fincan benzeri Endoplamikretikuluma bağlı yapılardan fagofor zarının çekirdeklenmesine yol açar. Fagofor zarı, sitoplazmik bileşenleri kapatıp otofagozom haline getiren çift membran yapısına sarmalanacak şekilde genişletir ve uzatır. Otofagozomun olgunlaşması, bir amfizom oluşturmak için endozomlar ile birleşmesini içerir; otolizozom oluşturabilmek için lizozomlarlaotofagozom birleşir. Otofagozomlar direk olarak lizozomlarla birleşme yapabilir. Zar ile tutulan bu birleşme otolizozomun asidik ortamında lizozomalhidrolazlar tarafından bozunur ve bozunma ürünleri, hücrenin enerji kaynağı veya yeni moleküllerin sentezi için yapıtaşları olarak yeniden kullanılabilmesi için otolizozomal zar içindeki permeazlar yolu ile sitoplazmaya geri gönderilir (Kristiane ve ark. 2017), (Şekil 2.11).



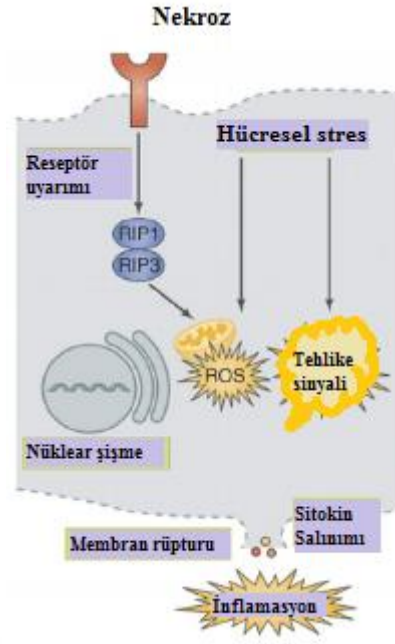
Şekil 2.11. Makrotofajiye genel bakış (Kristiane ve ark. 2017).

Otofajinin başlangıcında mTORC1 (rapamisin memeli hedef kompleksi 1) ve class III PI3K kompleksi (Sınıf 3 fosfatidilinositol-3-kinaz kompleksi) etkilidir. mTORC1 kompleksi, mTOR, RAPTOR (mTOR'un düzenleyici ilişkili protein), DEPTOR (DEP alanı içeren mTOR etkileşen protein) ve GβL (memeli G proteini β-altbirim benzeri protein) proteinlerinden oluşur. Hücrede açlık, stres ve hipoksi koşulları altında mTORC1 kompleksi, ULK 1 /2, Atg13 (otofajiye bağlı 13. gen), FIP-200 (200 kda'lıkfokal adezyon kinaz ailesi ile etkileşen protein) ve Atg 101'den oluşan ULK kompleksi ile etkileşime girer. Aktif hale gelen ULK kompleksi otofagozom oluşumunu başlatır (Ding ve ark. 2015). Bu kompleks Rapamisin ile baskılanır (Dowling ve ark. 2010).

Class III PI3K kompleksi, Vps34 (Vakuoler protein sıralama 34), P150, Beclin 1 ve Atg14 'den proteinlerinden meydana gelmektedir. Bu kompleks Psp3P lipid molekülünü uyararak otofagosomun uzamasını uyarır. Otofagozom yapısının uzatılmasında iki übikütin benzeri konjugasyon sistemi bulunur. Birincisinde; Atg proteinleri (1,7 ve 10) Atg 5'e bağlanır. Atg 16 çift kıvrımlı bölgeden Atg 12 ve 5'e bağlanarak 800 kDa'luk büyük bir kompleks oluşturarak otofagozomun dış zarını olgunlaştığında ayrılmak üzere bağlanır. İkinci konjugasyon sisteminde, Atg 4 LC3-I 'i oluşturur. LC3-I fosfatidiletanolamin (PE) ile birleşerek LC3-II formuna dönüşür. LC3-II ve PE otofagozomun iç zarına bağlanır. Bu kompleks yapılar otofagozomunlizozom ile birleşmesini sağlar ve otolizozom yapısını oluştururlar (Höhn ve Tilman 2013). Otolizozom içine bağlı bileşenler bozunur ve daha sonra geri dönüşüm için sitoplazmaya bırakılır (Green ve Levine 2014).

2.3.3. Nekroz

Nekroz keşfedildikten sonra uzun zaman kontrolsüz hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. Bu ölüm mekanizmasının nekroptoz olarak adlandırılan şekli ile programlı olarak da gerçekleşebileceği yapılan yeni çalışmalarla gösterilmiştir. DNA hasarı veya enfeksiyon gibi durumlara karşı hücre apoptoza alternatif olarak nekroptozla sürüklenir. TNF reseptörünün uyarılması apoptozun dışında nekroz ölüm tipine de yol açabilir. RIPK3 (reseptör etkileşimli protein kinaz-3) uyarımı yapılır ve MLKL proteini fosforillenir ve daha sonra plazma zarını bozan oligomerler oluşturarak enflamasyon ve doku hasarına bağlı çeşitli hastalıkların oluşumunda rol oynar (Cooper ve Housman 2016; Kolb ve ark. 2017), (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Nekroz oluşumu (Ashida ve ark. 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.HÜCRE HATTININ TEMİN EDİLMESİ

İnsan GBM hücre hattı olan U-87 MG T.C Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D. hücre kültürü laboratuvarının hücre stoğundan temin edilmiştir.

3.2. HÜCRE HATTININ ÇOĞALTILMASI VE PASAJLANMASI

U-87 MG hücre hattına %10 FBS, %1 Penisilin/streptomisin (Pen/Strep) ve %1 L-Glutamin (L-Glu) içeren MEM (Minimum EssentialMediumEagle, Capricorn) besiyeri ile 37°C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde (Esco) 10 cm’lik doku kültürü kaplarında çoğaltıldı.

Hücrelerin devamlılığını sağlamak amacıyla 48 saat ara ile kültür kaplarında çoğalan hücrelerin besiyerleri, vakum pompası (VacuumPump) ve steril pastör pipet (FL Medica) ile uzaklaştırıldı ve 24 saat için 5 ml besiyeri eklenerek inkübatöre kaldırıldı.

Hücreler 10 cm’lik kültür kaplarında %80 hücre yoğunluk oranına ulaştıklarında tripsinizasyon yöntemi kullanılarak hücre kültürü pasajlama işlemi uygulandı. Tripsinizasyon yöntemi ile hücre kültürü pasajlama işleminde;

❖ İlk olarak kültür kabında bulunan besiyeri vakum pompası yardımı ile uzaklaştırıldı.

❖ Kültür kaplarına 4 ml PBS (Fosfat tuz tamponu, invitrogen) ilave edilerek kültür kabının yüzeyi yıkandı ve ardından PBS vakum pompası ile kültür kabından

uzaklaştırıldı.

❖ Kültür kaplarına 1,5 ml Tripsin-EDTA (% 0,025’li, Capricorn) ilave edildikten sonra 2-5 dakika arasında inkübasyona bırakıldı.

❖ İnkübatörden alınan kültür kaplarına Tripsin EDTA kimyasalının etkisini nötralize etmek amacıyla 4 ml besiyeri eklendi.

❖ Daha sonra pipetaj yapılarak toplanan hücreler 15 ml’lik falkon tüplere aktarılarak 2850 rpm de 5 dakika süreyle santrifüj (NÜVE) edildi.

❖ Santrifüjün ardından süpernatantpellete dikkat edilerek vakum pompası ile uzaklaştırıldı. Pellet 1 ml besiyeri ile süspanse edildi.

❖ 24 saat inkübasyon için 5 ml besiyeri eklenen yeni kültür kaplarına falkon tüpte çözünen hücre süspansiyonundan 250 µl eklenerek inkübatöre kaldırıldı.

3.3. HÜCRE HATTININ DONDURULMASI VE SAKLANMASI

Çalışmanın devam eden aşamalarında kullanılmak üzere hücre hatları dondurularak stokları saklandı. Dondurma ve saklama işlemi;

❖ Kültür kabında bulunan besiyeri vakum pompası ile ortamdan uzaklaştırıldı.

❖ Kültür kaplarına 4 ml PBS eklenerek yüzeyleri yıkandı ve PBS vakum pompası ile ortamdan uzaklaştırıldı.

❖ Daha sonra kültür kaplarına 1,5 ml Tripsin-EDTA eklenerek 2-5 dakika arasında inkübatördeinkübasyona bırakıldı.

❖ İnkübatörden alınan kültür kaplarına Tripsin-EDTA kimyasalının enzimatik etkisini nötralize etmek için 4 ml besiyeri eklendi.

❖ Pipetaj uygulanarak alınan hücre-besiyeri ortamı 15 ml’lik falkon tüplere aktarılarak 2850 rpm’de 5 dakika santrifüj yapıldı.

❖ Santrifüj sonunda falkon tüplerdeki süpernatantpellete dikkat edilerek ortamdan uzaklaştırıldı.

❖ Tüpte kalan pellet 1 ml dondurma solüsyonu (%90 FBS (fötal sığır serumu, sigma), %10 DMSO (Dimetilsülfoksit, sigma)) süspanse hale getirildi.

❖ Süspanse haldeki hücre ortam karışımı dondurma tüplerine (kriyotüp) konularak -80 °C'deki dondurucuya (New Brunswick, Ultra-lowTemperatureFreezer) kaldırıldı.

3.4. HÜCRELERİN SAYIMI

Belirli sayıdaki hücreler ile yapılan deneylerde., hücreler Tripan Mavisi ile boyandı ve Thoma lamı kullanılarak sayıldı.

Hücre sayım işlemi;

❖ Kültür kabındaki hücreler, tripsinizasyon işlemi uygulanarak kaldırılıp falkon tüplere aktarıldı.

❖ 2850 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüjün ardından tüpteki süpernatantpellete dikkat edilerek vakum pompası ile ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra pellet 1 ml besiyerinde çözüldü.

❖ Süspansiyondan 50 µl pipet yardımı ile alınıp 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine eklendi ve üzerine 50 µl tripan mavisi ilave edildi.

❖ Pipetaj uygulanarak süspanse hale getirildikten sonra 50 µl çekilip Thoma lamı ve lamel arasına pipetlendi ve inverted ışık mikroskopunda (Leica DMIL) hücreler sayıldı.

Prensip olarak hücre membran bütünlüğünün bozulduğu hücreler mavi renkli olarak görülür ve ölü olarak kabul edilir. Boyanmayan ve beyaz renkte görülen hücreler canlı olarak kabul edilir. Thoma laminın üzerindeki beş bölgede toplanmış hücreler sayılarak belirtilmiş formüle göre 1 ml'de bulunan hücrelerin sayısı hesaplanır.

$$\text{Hücre/ml} = \frac{5 \text{ karede sayılan toplam hücre sayısı} \times \text{dilasyon faktörü} \times 10^4}{5}$$

15 ml'lik falkon tüp içerisindeki süspanse halde bulunan hücreler, kurulacak deney planı için hesaplanmış hücre sayısı doğrultusunda dilue (seyreltme) edilerek deney aşamalarında geçildi.

3.5. HÜCRE KİNETİĞİNİN BELİRLENMESİ

Deneylerde kullanılması gereken hücre sayısını belirlemek amacı ile U-87 MG hücre hattı için hücre kinetiği oluşturuldu. Hücreler 96 kuyucukluk mikrolakalara 5×10^2 - 8×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Ardından her bir kuyucuğa 200 µl ortam ilave edildi ve MTT yöntemi ile 48.-72. ve 96. saatlerinde absorbans değerleri ölçüldü.

3.6. HÜCRE HATLARININ İKİLENME ZAMANININ BELİRLENMESİ

U-87 MG hücre hattının ikilenme zamanının hesaplanabilmesi için hücreler altı kuyucukluk mikrolakalara 5 ml besiyeri içerisinde $2,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi ve 24.,48.,72. ve 96. saatlerinde hücre sayıları hesaplandı.

3.7. BPH'IN HAZIRLANMASI

Toz haldeki BPH (Etimaden'den temin edilmiştir.) son konsantrasyonu 0,1 M olması için hassas terazide 30 mg tartıldı ve 1 ml saf suda de çözüldü. Yapılacak her deney için aynı çözelti yeniden hazırlandı ve uygulandı.

3.8. BPH'IN SİTOTOKSİK ETKİSİNİN BELİRLENMESİ VE IC₅₀ DEĞERİNİN HESAPLANMASI

BPH'ın hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla hücreler, 96 kuyucukluk mikrolakalara 104 hücre/200 µl olacak şekilde ekildi. Hücrelerin mikrolaka tabanına tutunabilmeleri için, kültür kapları 24 saat süre inkübatörde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin ardından besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve kuyucuklara son hacim 200 µl olacak şekilde BPH'ın artan konsantrasyonları (1µM- 10µM -100µM -1000µM -2500µM- 5000µM- 7500µM- 10000µM) eklendi. 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyonlardan sonra hücre canlılığı MTT testi (3- [4,5- dimethylthiazol- 2- yl]- 2,5- diphenyl-tetrazoliumbromide, Sigma) ile ölçüldü. Toz halinde bulunan MTT'nin stok

solüsyonu (5 mg/ml) PBS içersindehazırlandı. Stok MTT solüsyonu kuyucuklara son hacmi 1:10 oranında seyreltilerek 200µl eklendi.

MTT solüsyonu ışığa duyarlı olması sebebiyle mikropalakalar alüminyum folyo ile ışık almayacak şekilde kaplandı. 4 saat süresince inkübasyona bırakıldı. Daha sonra MTT ortamdan uzaklaştırıldı. Karanlık ortamda kuyucuklara 200µl saf DMSO (Dimetilsülfoksit) ilave edildi ve mor renkli formazan kristallerinin çözünmesi için mikropalakalar 15 dakika süre ile çalkalayıcıda bekletildi. Oluşan mor renkteki formazan miktarı 570-690 nm dalga boyu aralığında mikropalaka okuyucu (Biotek ELx800) ile ölçüldü. Hücrelerin % canlılığı, (BPH konsantrasyonları uygulanan kuyucuklarınabsorbans ortalaması/Kontrol okuyucularının absorbans ortalaması)x100 olarak hesaplandı. Sonuçların istatistiksel ve grafiksel değerlendirilmeleri Microsoft Excel (XP) ve Graphpadprism programları kullanılarak yapıldı. BPH 'ın hücrelerin %50'sini öldüren konsantrasyon değeri (50 % InhibitionConcentration, IC50) hesaplandı.

3.9. HÜCRELERİN ÖLÜM TİPLERİNİN BELİRLENMESİ

Kullandığımız BPH'ın belirlenen sitotoksik etkisinin hangi ölüm mekanizması üzerinden etki gösterdiğini tespit edebilmek floresan temelli teknik ile çalışan “Muse® Cell Analyzer” hücre kitleri kullanıldı.

3.9.1.Apoptotik Değerinin Belirlenmesi

BPH' insitotoksik etkisinin apoptoz mekanizması üzerinden etki gösterip göstermediğini tespit edebilmek için “Muse® Annexin V ve ölü hücre kiti” kullanıldı. Kullanılan kitin temel çalışma mekanizması fosfatidilserinin (PS), plazma membranının iç yüzeyinden dış yüzeyine taşınması neticesinde membran bütünlüğünün bozulması ve hücrenin apoptoza sürüklenmesidir. Bu yöntemde, PS' ye bağlanabilen Annexin V kalsiyum bağımlı proteini ve bu bağlanma safhasının görüntülenmesini sağlayan 7- Aminoaktinomisin D (7- AAD) boyası beraber kullanılmaktadır.

Yöntemde kullanılan 7-AAD boyası çift zincirli DNA'ya bağlanır. Apoptozun erken safhasında membran bütünlüğünde bozulma meydana gelmediğinden boya

gözlenmez. Ancak geç apoptoz safhasında hücre membran bütünlüğü bozulduğu için boya DNA'ya bağlanarak görünür hale gelir (Kerr ve ark. 1972; Rudin ve Thompson 1997; Tait ve ark. 1989; Van den Eijnde 1997; Shoja M.H. ve ark. 2015). Bu kit sayesinde apoptozun erken ve geç evreleri aşağıdaki prensibe bağlı olarak birbirinden ayrı şekilde ölçülebilmektedir;

- ❖ Canlı durumdaki hücreler için: Annexin V ve 7-AAD boyası negatiftir.
- ❖ Erken apoptoz evresinde: Annexin V pozitif ve 7-AAD negatiftir.
- ❖ Geç apoptoz evresinde: Annexin V ve 7-AAD pozitifdir.
- ❖ Nekrotik nükleer debriste: boya pozitif ve annexin V negatiftir.

Kontrol ve BPH 'ın IC₅₀ konsantrasyon değeri uygulanan hücrelerin apoptotik hücre oranlarını belirlemek amacıyla;

- ❖ Hücre kültüründe son hücre konsantrasyonu 1×10^5 hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu plakalara her kuyucuk için 200 µl besiyerinde 24 saat 37°C, %5 CO₂'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda 96 kuyucuklu plakadaki besiyeri vakum pompası ile uzaklaştırıldı.

- ❖ Kontrol ve BPH (IC₅₀ Konsantrasyon değerleri) eklenecek kuyucuklara 100 µl besiyeri eklendi ve BPH 'ın IC₅₀ konsantrasyon değerleri hesaplanarak, kontrol grupları hariç olmak üzere her kuyucuğa 100 µl eklendi ve 72 saat inkübe edildi.

- ❖ Tripsinizasyon işlemi ile mikrosantrifüj tüplerindeki kültür hücreleri 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip süpernatantları döküldü.

- ❖ Pellet PBS ile çözdürüldü ve tekrar 2000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant döküldü.

- ❖ Tüpler içinde kalan pellet üzerinde %1 FBS içeren 100 µl besiyeri eklendi ve pipetaj ile hücre süspansiyonu oluşturuldu.

- ❖ Daha önce oda sıcaklığına getirilmiş olan Muse® Annexin V ve ölü hücre kit solüsyonundan her tüpe 150 µl ekleme yapılarak yavaşça pipetaj uygulandı. Karanlıkta, oda sıcaklığında hazırlanan tüpler 20 dakika inkübasyona bırakıldı.

- ❖ Son işlem olarak Muse hücre analiz cihazında, kullanılan kitin protokolüne uygun olarak ölçümü yapıldı.

3.9.2. Otofaji Değerinin Belirlenmesi

Otofaji, Muse® Autophagy LC3-antibody based kit ile belirlenmiştir.

Kullandığımız bu kit, LC3 seviyesindeki floresans değişimini temel alan bir yöntemdir. Spesifik olarak otofaji reaktifleri, antikor ve sitozolik LC3 ile lipid formdaki LC3 'ü ayırt ederek otofaji ölçümünü yapar. Sitozolde bulunan LC3 ile otofagozoma tutunan LC3'ü birbirlerinden ayırabilmek ve koruyabilmek için farklı olarak iki otofaji reaktifi kullanılır. Otofaji reaktifi A LC3'ün lizozomal parçalanmasını önlemek amacı ile kullanılırken, reaktif B ise hücre membranının seçici geçirgenliğini bozarak otofagosomal LC3-II ile sitozolik LC3-I ayrımının yapılabilmesi için kullanılır. LC3 'ün yer değişimlerini izlemek ve LC3 'lerin arasındaki ayrımı yapabilmek için flowsitometri yöntemi kullanılır. Kit içerisinde otofagosomal LC3 miktarını belirlemek için anti-LC3 fare monoklonal antikor (Anti-LC3 Alexa Fluor®555) kullanılmaktadır (Fleming ve ark. 2011; Mizushima N. ve Tamotsu Y. 2007; Kabeya Y. Ve ark. 2000).

Kontrol ve BPH'nın IC₅₀ konsantrasyon değeri uygulanan hücrelerdeki otofaji düzeyinin belirlenmesi için;

- ❖ Hücre kültüründe son hücre konsantrasyonu 4×10^4 hücre sayısı olacak şekilde 96 kuyucukluk mikrotiplere 200 µl besiyerinde 24 saat 37 °C, %5 CO₂ 'de inkübasyona bırakıldı.
- ❖ İnkübasyondan sonra 96 kuyucukluk plakada bulunan hazır besiyeri ortamdan vakum pompası vasıtası ile uzaklaştırıldı.
- ❖ Tüm kuyucuklara (Kontrol ve BPH uygulanacak kuyucuklar(IC₅₀ konsantrasyonları)) eklenecek kuyucuklara 100µl besiyeri eklendi ve 1 saat inkübe edildi.
- ❖ BPH'nın IC₅₀ konsantrasyonu eklenen kuyucuklara kontrol grupları hariç tutularak her kuyucuğa 100µl eklendi ve 72 saat inkübasyona bırakıldı.
- ❖ Tripsinizasyon işlemi uygulandı ve hücreler mikrosantrifüj tüplerine toplandı. Hücreler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi
- ❖ Pellet PBS çözeltisinde çözülerek tekrar 2000 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edildi.
- ❖ BPH ile muamele edilen hücreler açlık koşulları altında otofajinin uyarılması için 200 µl PBS çözeltisi + 0,2

μ l Autophagy reagent A (1:1000 dilüsyon) 37°C de 2-6 saat arasında inkübasyona bırakıldı. Kontrol hücrelerine ise sadece FBS içeren besiyeri eklendi.

❖ Daha sonra 2000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı.

❖ Tüplerde kalan pelletlerin üzerine 5 μ l Anti-LC3 Alexa Flour®555 ve 95 μ l 1X Autophagy Reagent B eklenip yavaşça pipetaj yapıldı. Karanlıkta 30 dakika buz üzerinde bekletildi.

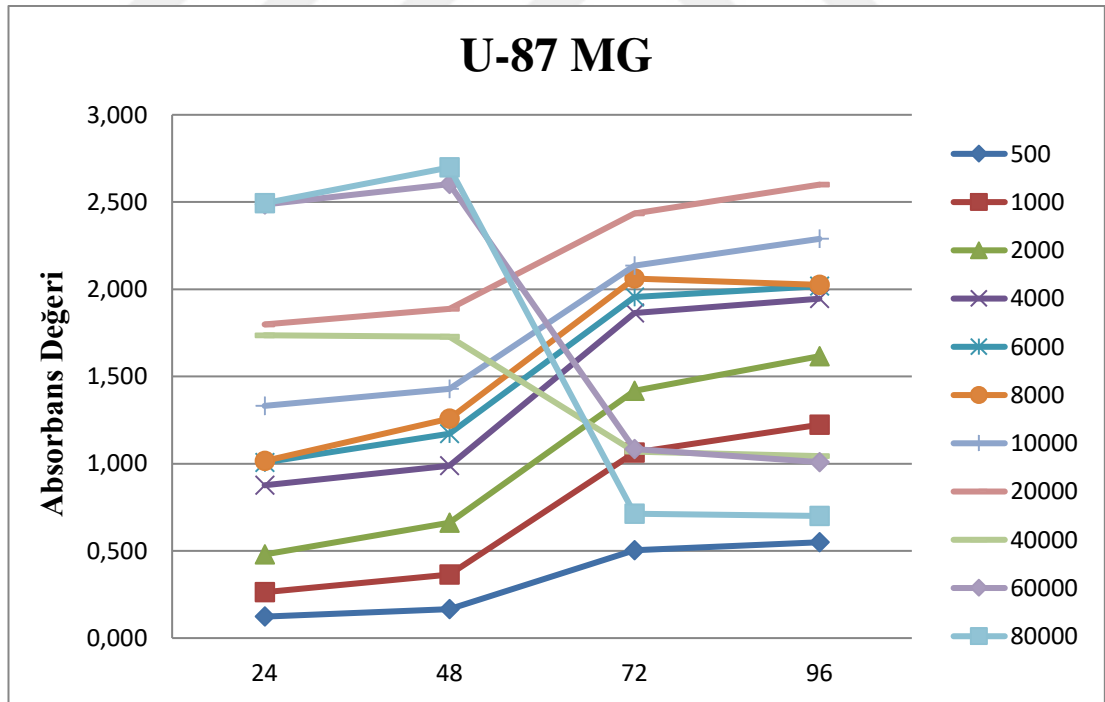
❖ 2500 rpm’de 4°C’de 5 dakika süre ile santrifüj yapıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı.

❖ Her tüpe 200 μ l 1X Assay Buffer eklendi ve Muse Cell analyzer cihazında uygun program seçilerek analizi gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. U-87 MG HÜCRE HATTININ İKİLENME SÜRESİNİN BELİRLENMESİ VE KİNETİĞİNİN OLUŞTURULMASI

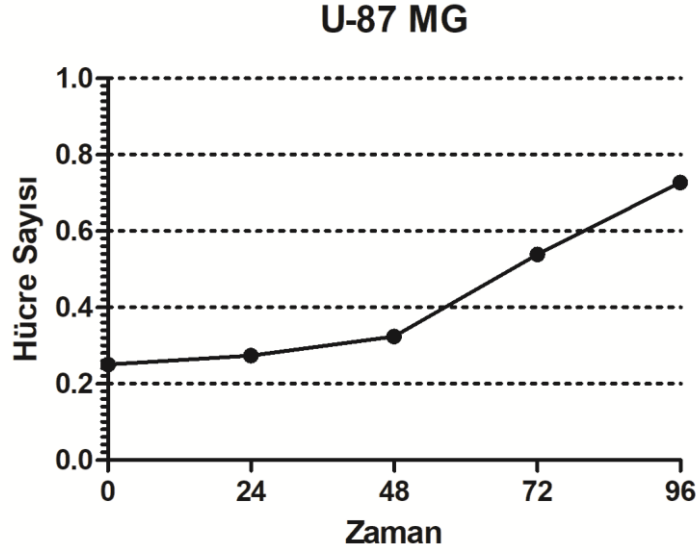
Sitotoksite çalışmalarında kullanılacak hücre sayısını belirlemek amacıyla şekil 4.1’de gösterilen hücre sayıları dikkate alınarak absorbans değerleri karşılaştırıldı. U-87 MG hücre hattı için yapılacak olan sitotoksite çalışmalarında kuyucuk başına ekilecek hücre sayısının 10^4 hücre/kuyucuk olarak belirlendi.



Şekil 4.1. Absorbans değerinin zamana bağlı değişiminde hücre sayısı grafiği.

24., 48., 72. ve 96. saatlerde hücre sayımı yapılan U-87 MG hücre hattının

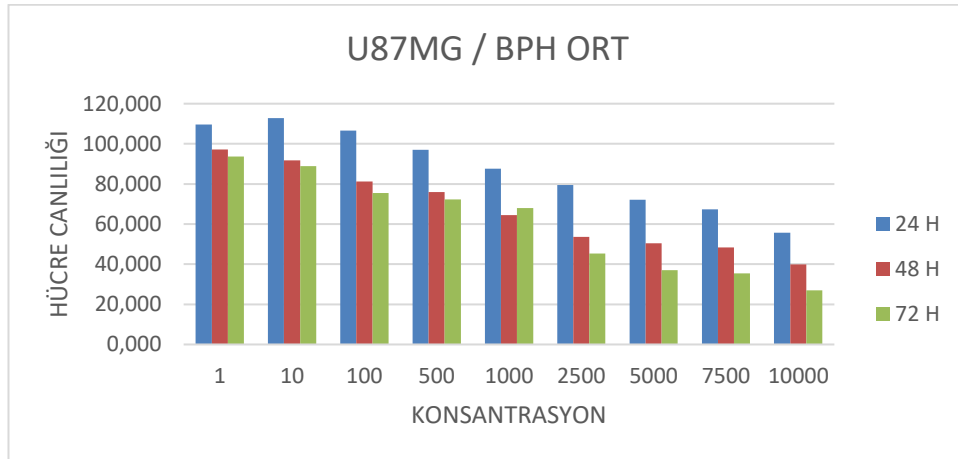
ikilenme süresi 72 saat olarak belirlendi(Şekil 4.2).



Şekil 4.2. U-87 MG hücre hattının zamana bağlı hücre sayısı eğrisi.

4.2. U-87 MG HÜCRE HATTINDA BPH'IN HÜCRE CANLILIĞINA ETKİSİ (MTT ANALİZİ)

BPH'ın U-87 MG hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkisi zamana konsantrasyonlarda (1 μ M- 10.000 μ M) hem de zamana (24, 48, 72 saat) bağlı olarak BPH'ın artan konsantrasyonlarında (1 μ M- 10.000 μ M) analiz edildi ve IC₅₀ değeri 72. saatte 2454 μ M olarak hesaplandı(Şekil 4.3, Tablo 4.1).



Şekil 4.3. U-87 MG hücre hattının BPH'ın artan konsantrasyonlarında 24, 48, 72. Saatlerindeki hücre canlılıklarının MTT yöntemi ile belirlenmesi (*p<0.01,**p<0.001).

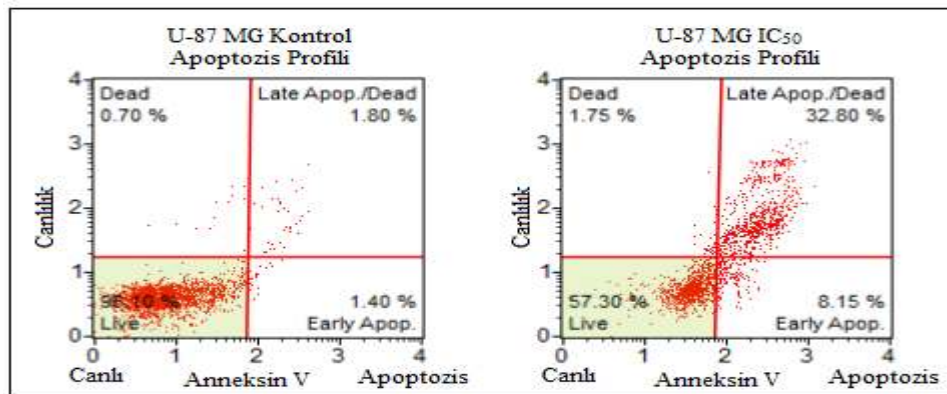
Tablo 4.1. U-87 MG hücre hattında 24.,48.,72. saatte BPH'ın farklı konsantrasyonlarındaki % canlılık ölçüm değerleri.

Konsantrasyon	Kontrol	1µM	10µM	100µM	500µM	1mM	2.5mM	5mM	7.5mM	10mM	
	100	91,3	85,4	74,21	71,93	65,94	44,49	35,98	33,83	26,65	72.saat
U-87 MG	100	96,29	90,44	82,96	73,37	65,94	53,81	50,56	49,55	41,48	48.saat
	100	100	100	100	96,39	87,08	78,59	72,68	66,74	54,1	24.saat

4.3. BPH'IN U-87 MG HÜCRE HATTINDA TETİKLEDİĞİ ÖLÜM MEKANİZMASININ SAPTANMASI

4.3.1. APOPTOZ YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRME

BPH ile 72 saat muamele sonrası U-87 MG hücre hattındaapoptoz profilleri Muse® Annexin V &Dead Cell Kiti aracılığıyla analiz edilmiş ve bulgular Şekil 4.5'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda hücre canlılığı %90 üzerinde ölçüldü ve IC₅₀ değerinin uygulandığı kısımda %57 canlılık tespit edildi. Buna karşın BPH'ın %42,7 oranında apoptozu indüklediği Tablo 4.2'de görülebilmektedir. Sonuç olarak kontrol grubuna oranla apoptoz aracılığı ile gerçekleşen ölüm oranında yaklaşık 13 kat artış saptanmıştır.



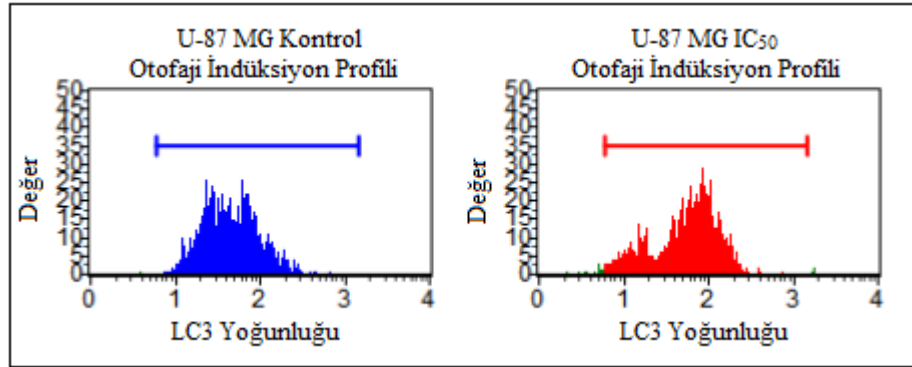
Şekil 4.4. GBM hücre kültüründe BPH'ın IC₅₀ konsantrasyonu ile (IC₅₀:2454 µM) 72 saat muamele edilen U-87 MG hücrelerinin canlı ve apoptotik evreleri.

Tablo 4.2. U-87 MG hücre hattının BPH'ın IC₅₀ konsantrasyonu ile muamelesi sonrası canlı ve apoptotik yönden değerlendirilmesi.

MuseAnnexin V & Dead Cell kitiyle ölçülen parametreler					
U-87 MG	% Canlılık	% Erken Apoptoz	% Geç Apoptoz	% Ölü	% Apoptoz değeri
Kontrol	96,10	1,40	1,80	0,70	3,20
IC ₅₀	57,30	8,15	32,80	1,75	40,95

4.3.2. OTOFAJİ YÖNÜNDEN DEĞERLENDİRME

BPH ile 72 saat muamele sonrası GBM hücrelerinin otofaji profilleri Muse® Autophagy LC3 Kiti aracılığıyla belirlenmiş ve bulgular Şekil 4.6'da gösterilmiştir. Otofaji indüksiyon oranı kontrol grubunda 1,0 olarak ölçüldü. IC₅₀ konsantrasyonu uygulanan grupta 1,2 olarak ölçüldü (Tablo 4.3).



Şekil 4.5.GBM'nin hücre kültüründe BPH'ın IC₅₀ konsantrasyonu ile (2454 µM) muamele edilen U-87 MG hücrelerinin otofaji indüksiyon oranı ve ortalama otofaji yoğunluğu.

Tablo 4.3.BPH'ın IC₅₀ konsantrasyonu ile muamele edilmiş kültürü yapılan U-87 MG hücre hattının otofaji indüksiyon oranının ve ortalama otofaji yoğunluğunun karşılaştırılması.

Muse® Autophagy LC3-Antibody Based kitiyle ölçülen parametreler			
U-87 MG	Total hücre sayısı	Ortalama Otofaji yoğunluğu	Otofaji İndüksiyon Oranı
Kontrol	999	60,1	1,0
IC ₅₀	987	73,8	1,2

5. TARTIŞMA

Geçmişten günümüze yapılan araştırmalarda kanser gelişiminde apoptoz hücre ölüm mekanizmasının, sağ-kalımı engelleyerek ve tümör büyümesini kanser gelişimi evrelerinde kontrol ederek kansere sebep olan ajanlara karşı doğuştan gelen bir doku savunması olduğu bilinmektedir (Bursch ve ark. 1992). Otofaji hücre ölüm mekanizmasında yapılan araştırmalar üzerinde bazı kanser türleri üzerine koruyucu etkisi olduğu keşfedilmiş ve kanser tedavisi üzerine bir umut olabileceği düşünülmektedir (Hannahan ve ark. 2011; Russo ve Russo 2018). Yaptığımız çalışmada yeni bir bor bileşiği olan BPH 'ın U-87 MG hücre hattı üzerinde bu ölüm yolları üzerinden tedavi potansiyeline bakılmış ve proliferasyonu baskıladığı gözlemlenmiştir. Hesaplanan IC_{50} değeri üzerinden uygulanan tedavi hücrelerin apoptoz yolağını tetikleyerek proliferasyonu baskıladığını ortaya koymaktadır.

Yapılan sitotoksik değerlendirme sonucunda belirlenen doz aralığında ($1\mu M$ - $10\mu M$ - $100\mu M$ - $500\mu M$ - $1000\mu M$ - $2500\mu M$ - $5000\mu M$ - $7500\mu M$ - $10000\mu M$) U-87 MG hücre hattına uygulanan BPH bileşiğinin sitotoksik etkisinin 72. saatte IC_{50} değeri $2454\mu M$ olarak hesaplanmıştır. Murmu ve arkadaşlarının 2002'de farklı bor bileşikleri ile yaptığı bir çalışmada 3 farklı bor bileşiği dihidroksi (oksibiguanido) boron (iii) hidroklorürmonohidrat (HB), guanidinbikorik asit katkısı (GB) ve hidrososalisilhidroksomboron (iii) (SHB) ile Akut lenfatik lösemi (ALL) hastalarından ve kronik miyeloid lösemi hastalarından (KML) ve miyeloid lösemi hücre hatlarından (HL 60 ve U-937) izole edilen lösemik hücrelerle muamele edildiklerinde apoptoz ile gerçekleşen bir sitotoksik etkinin gerçekleştiği tespit edilmiştir (Murmu ve ark. 2002). Barranco ve Eckhert tarafından prostat kanseri üzerine yaptıkları çalışmada borik aside maruz kalan tüm kanserli prostat hücre hatlarında doza bağımlı olarak bir anti-proliferatif etki gösterdiğini ve hormondan bağımsız DU145 hücre hattının borik aside karşı en yüksek duyarlılığı gösterdiğini

saptamışlardır. Belirlenen dozlarda (100µM-1000µM) muamele edilen hücreler 8. Günde DU145 belirlenen dozların sırasıyla %32-62-87-98 oranında; LNCaP belirlenen dozların sırasıyla %40-51-59-77 oranında proliferasyonu baskıladığı gözlemlenmiştir. PC-3 hücre hattında 500-1000 µM konsantrasyonlarında sırasıyla %29-52 oranında proliferasyonu baskıladığı gözlemlenmiştir. Yine aynı çalışmada RWPE-1 hücre hattında 8 Günlük 500-1000 µM borik asit maruziyetinden sonra sırasıyla %26-76 oranında proliferasyonunda anlamlı düşüşler gözlemlenmiştir (Barranco ve Eckhert 2004). Kahraman ve arkadaşlarının bazı bor bileşiklerinin sitotoksik ve genotoksik etki değerlendirmesinde BPH'ın CCL-62 hücreleri üzerinde 1000µM dozda 5. gün %60 seviyesinde bir sitotoksikite saptanmıştır. Aynı çalışmada yapılan Borik asit (BA) ve Disodyumpentaboratdekahidrat (DPD) bileşikleri ile gerçekleştirilmiştir. BA'in herhangi bir sitotoksik bir etki göstermediği ancak DPD'in 500 µM ve 1000 µM uygulanarak 3 ve 5. Günde %30 değerinde bir sitotoksik etki gösterdiği saptanmış ve bu bor bileşiklerinin genotoksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir (Kahraman ve ark. 2013). Korkmaz ve arkadaşlarının DPD bileşiğinin DU145 hücre hattı üzerinde belirlenen doz aralığında (0.25mM-0.5mM-0.75mM-1mM-2.5mM-5mM-7mM-10mM) uygulanmış IC₅₀ değeri 3.5mM olarak hesaplanmış ve telomeraz aktivitesini azaltarak sitotoksik bir etkiye sahip olduğu saptanmış ve ayrıca 7mM DPD tedavisinin DU145 hücre hattında 24-48-72 saatlik ölçümlerinde sırasıyla %8-14-41 seviyelerinde apoptotik bir etkinliğinin olduğu tespit edilmiştir (Korkmaz ve ark. 2013). Cantürk ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada lösemi hücre hatları üzerinde BA ve Sodyum Tetraborat kullanılmış ve 500 uM BA ve sodyum tetraborat konsantrasyonunda ölü hücreler olduğunu belirlemişlerdir (sırasıyla% 50 ve% 40). Normal lenfositlerde ve HL-60 (akut lösemi hücreleri) hücrelerinde 1000 uM konsantrasyonda (sırasıyla% 2,5 ve% 8,8) apoptotik bir etki bulunmuştur (Cantürk ve ark. 2016). Tepedelen EB ve arkadaşlarının Kalsiyum Fruktoborat (CaFB)'ın MDA-MB-231 meme kanseri hücre hattında özellikle 50 uM ile yapılan tedavide önemli ölçüde antiproliferatif bir etki gösterdiği gözlemlenmişlerdir. Ayrıca 10 uM'lıkCaFB tedavisinde kaspaz 9 seviyesini artırarak apoptoza sürüklediğini keşfetmişlerdir (Tepedelen ve ark. 2017). Özetle; yapılan hücresel çalışmaların bor bileşiklerinin kanser hücreleri üzerinde bir sitotoksik etkisinin olduğunu ve bu etkinin apoptoz mekanizması üzerinden gerçekleştiğini

görmekteyiz. Bizim çalışmamızdaki yeni bor bileşiği BPH'ın aynı şekilde potansiyel tedavi edici özelliğinin bu etki mekanizması üzerinden olduğu için yapılan çalışmaları destekler niteliktedir.

Belirlenen IC_{50} değeri aynı şekilde otofaji mekanizmasının araştırmasında Muse® Cell Analyzercihazı kitleriyle uygulanmış. Herhangi bir otofajik veriye rastlanmamıştır. Al-Ali ve Gonzalez-Sarmiento'nun yaptığı bir çalışmada 5mM BA maruziyeti sonrası H1299 ve COR-L23p ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücre hatları (NSCLC) üzerinde herhangi bir otofajik etkiye rastlanılmamıştır (Al-Ali ve Gonzalez-Sarmiento 2017).

Sonuç olarak bu bilgiler ışığında U-87 MG hücre hattında BPH'ın sitotoksik etkisinin apoptoz hücre ölüm mekanizması ile gerçekleştiğini belirledik. Otofaji yönünden anlamlı bir sonuç elde edemedik.

6.KAYNAKLAR

Alifieris C ve Trafalis DT. Glioblastomamultiforme: Pathogenesisandtreatment. PharmacolTher. 2015;152 s: 63-82.

Alimandi M, Wang LM, Bottaro D, Lee CC, Kuo A, Frankel M, Fedi P, Tang C, Lippman M ve Pierce JH. Epidermalgrowthfactorandbetacellulinmediatesignaltransductionthroughco-expressed ErbB2 and ErbB3 receptors. The EMBO Journal 16.18 1997, s: 5608-5617.

Al-Ali R ve Gonzalez-Sarmiento R. High concentrations of boricacidinduceautophagy in cancercelllines. 2017, bioRxiv, 193441.

Allen NJ ve Barres BA. Neuroscience: Glia - morethanjustbrainglue. Nature. 2009;457(7230) s: 675-7.

Ameen HNM, Hussain SA, Ahmed ZA ve Aziz TA. Anti-inflammatoryeffects of boronaloneor as adjuvantwithdexamethasone in animalmodels of chronicandgranulomatousinflammation. International Journal of Basic &ClinicalPharmacology, 2015, 4;4.

Ashida H, Mimuro H, Ogawa M, Kobayashi T, Sanada T, Kim M ve Sasakawa C. Cell deathandinfection: a double-edgedswordforhostandpathogensurvival. Journal of Cell Biology 2011.

Aysan E, Idiz UO, Elmas L, Sağlam EK, Akgün Z ve Yücel SB. Effects of

Boron-Based Gel on Radiation-Induced Dermatitis in Breast Cancer: A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Journal of Investigative Surgery*, 30(3), 2017 s: 187-192.

Aysan E, Sahin F, Telci D, Yalvac ME, Emre SH, Karaca C ve ark. (2011) Body weight reducing effect of oral boric acid intake. *Int J Med Sci* 8:653–8

Balabanlı B ve Balaban T. Investigation into the Effects of Boron on Liver Tissue Protein Carbonyl, MDA, and Glutathione Levels in Endotoxemia. *Biol Trace Elem Res*. 2015, 167(2):259-63.

Barranco WT ve Eckhert CD. Boric acid inhibits human prostate cancer cell proliferation. *Cancer Letters*, 2004, 216(1), 21-29.

Barranco WT, Hudak PF ve Eckhert CD. Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States). *Cancer Causes Control*. 2007; 18: 71–7.

Bauman G, Lote K, Larson D, Stalpers L, Leighton C, Fisher B, Wara W, MacDonald D, Stitt L ve Cairncross JG. Pretreatment factors predict overall survival for patients with low-grade glioma: a recursive partitioning analysis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys* 1999, s:923–929

Bilgiç M ve Dayık M. Borun Özellikleri ve Tekstil Endüstrisinde Kullanımıyla Sağladığı Avantajlar. *Electronic Journal of Vehicle Technologies/Tasıt Teknolojileri Elektronik Dergisi* 7.2, 2013.

Boyacıoğlu O, Orenay-Boyacıoğlu S, Yildirim H. ve Korkmaz M. Boron intake, osteocalcin polymorphism and serum level in postmenopausal osteoporosis. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2018, 48, 52-56.

Bursch W, Oberhammer F ve Schulte-Hermann R. Cell

death by apoptosis and its protective role against disease. Trends in pharmacological sciences 1992 13(6): 245-51.

Cantürk Z, Tunalı Y, Korkmaz S ve Gülbaş Z. Cytotoxic and apoptotic effects of boron compounds on leukemia cell line. Cytotechnology, 2016, 68(1), s: 87-93.

Collins VP, Jones DT ve Giannini C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. Acta Neuropathol. 2015;129(6) s:775-88.

Cooper GM ve Hausman RE. The Cell a Molecular approach Çeviren: ATABEY N, KALAY E, SAKIZLI M. HÜCRE Moleküler Yaklaşım 7. Baskı. İzmir Tıp Kitabevi Kır. Büro Malz. San. Ve Tic. Ltd. Şti., İzmir; 2016, s:723-724;s:691-703.

Cui Y, Winton MI, Zhang ZF, Rainey C, Marshall J, De Kernion JB ve arkadaşları. Dietary boron intake and prostate cancer risk. Oncol Rep, 2004; 11: 887–92.

Das BC, Thapa P, Karki R, Schinke C, Das S, Kambhampati S, Banerjee SK, Veldhuizen PV, Verma A, Weiss LM ve Evans T. Boron chemicals in diagnosis and therapeutics. Future 5.6, 2013, s: 653-676.

De Almagro MC ve Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. Experimental Oncology 34.3 2012; 200-11.

Demirci S, Doğan A, Karakuş E, Halıcı Z, Topçu A, Demirci E ve Sahin F. Boron and poloxamer (F68 and F127) containing hydrogel formulation for burn wound healing. Biological trace element research, 168(1), 2015, s: 169-180.

Demirtaş A. “Bor’un İnsan Beslenmesi ve Sağlığı Açısından Önemi” Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 41 (1), 75-80, 2010.

Ding Q, Bao J, Zhao W, Hu Y, Lu J ve Chen X. Natural autophagyregulators in cancertherapy: a review. *PhytochemistryReviews*. 2015, 14: 1, s: 137–154.

Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD ve Sonenberg N. Dissectingthe role of mTOR: lessonsfrom MTOR inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010; 1804(3), 433-9.

Fail PA, Chapin RE, Price CJ ve Heindel JJ. General, reproductive, developmental, andendocrinotoxicity of boronatedcompounds. *Reproductivetoxicology* 12.1 1998 s: 1-18.

Field-Smith A, Morgan GJ ve Davies FE. Bortezomib (Velcade™) in thetreatment of multiplemyeloma. *Therapeuticsandclinical risk management* 2.3 2006, s: 271.

Fleming A, Noda T, Yoshimori T ve Rubinsztei DC. "Chemicalmodulators of autophagy as biologicalprobesandpotentialtherapeutics." *Nature chemicalbiology* 7.1 2011, s: 9-17.

Galluzzi L ve Vitale I. *International Review of Cell andMolecularBiology*, 2017, Vol: 334, s: 2-343.

Gordeziani M, Adamia G, Khatisashvili G ve Gigolashvili G. Programmedcell self-liquidation (apoptosis). *Annals of AgrarianScience* 15.1 2017, s: 148-154.

Grosso R, Fader CM ve Colombo MI. Autophagy: A necessaryeventduringerythropoiesis. *Blood Reviews* 2017.

Green DR ve Beth L. To be or not to be? How selectiveautophagyandcelldeathgoverncellfate. *Cell* 157.1 2014, s: 65-75.

Guo F, Ma J ve Pleasure DE. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology Encyclopedia of the Neurological Sciences (Second Edition), Astrocytes, 2014, s: 287-289.

Hakki SS, Bozkurt BS, Hakki EE. Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1). J Trace Elem Med Biol 2010; 24: 243-50.

Hakki SS, Malkoc S, Dunder N, Kayis SA, Hakki EE, Hamurcu M, v ark. Dietary boron does not affect tooth strength, micro-hardness and density, but affects tooth mineral composition and alveolar bone mineral density in rabbits fed a high-energy diet. J Trace Elem Med Biol 2015; 29: 208-15.

Hanahan, Douglas, ve Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 144. 5 2011, s: 646-674.

Holland EC. Glioblastoma multiforme: the terminator. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2000;97(12) s:6242-6244.

Höhn A ve Grune T. Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. Redox biology 1.1 2013, s: 140-144.

Hubbard JA ve Binder DK. Astrocytes and Epilepsy Chapter, 2 – Astrocytes in the Mammalian Brain, 2016, s: 39-51.

Hunt CD ve Herbel JL. Boron Affects Energy Metabolism in the Streptozotocin-Injected, Vitamin D-3-Deprived Rat. Magnesium and trace elements, 1991, 10, 374-374.

Huse, Jason T ve Eric C. Holland. "Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma." Nature reviews.

Cancer 10.5, 2010 s: 319.

Ince S, Filazi A, Yurdakok-Dikmen B. ReproductiveandDevelopmentalToxicology (Second Edition), 2017, s: 521–535.

Ince S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fatih Fidan A ve Eryavuz A. Theeffects of dietaryboricacidandboraxsupplementation on lipidperoxidation, antioxidantactivity, and DNA damage in rats. J Trace Elem MedBiol 2010; 24 s: 161-4.

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y ve Yoshimori T. LC3, a mammalianhomologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomemembranesafterprocessing. The EMBO journal 19.21 2000, s: 5720-5728.

Kahraman E, Gürhan İD ve Korkmaz M. Investigation of possiblelegenotoxicandcytotoxiceffects of differentialboroncompounds in ccl 62 (hela contaminant) humanamnioticepithelialcellline. MedicineScience, 2013, 2.1.

Kanu OO, Hughes B, Di C, Lin N, Fu J, Bigner DD, Yan H ve Adamson C. GlioblastomaMultiformeOncogenomicsandSignalingPathways. ClinMedOncol. 2009;8;3, s:39-52.

Karadağ M ve Türközü D. Diyetle bor alımının sağlık ile etkileşimi. GUSBD, 2014, 3: 770-85.

Keles GE, Lamborn KR ve Berger MS. Low-gradehemisphericgliomas in adults: a criticalreview of extent of resection as a factorinfluencingoutcome. J. Neurosurg. 2001;95:735–745.

Kerkhof M, Dielemans JC, vanBreemen MS, Zwinkels H, Walchenbach R, Taphoorn MJ ve Vecht CJ. Effect of valproicacid on seizurecontroland on survival in patientswithglioblastomamultiforme. Neuro-oncology 15.7 (2013) s: 961-967.

Kerr JF, Wyllie AH ve Currie AR. Apoptosis: A basicbiologicalphenomenonwithwide-rangingimplications in tissuekinetics. Br J Cancer. 1972; 26 s: 239-257.

Kolb JP, Oguin TH, Oberst A ve Martinez J. Programmed Cell DeathandInflammation: Winter Is Coming. Trends in immunology 38.10 2017, s: 705-718.

Korkmaz M, Avcı CB, Gündüz C, Aygüneş D ve Erbaykent-Tepedelen B. Disodiumpentaboratedecahydrate (DPD) inducedapoptosisbydecreasinghTERTenzymeactivityanddisrupting F-actinorganization of prostatecancercells. TumorBiology, 35(2), 2014 s:1531-1538.

Korkmaz M, Uzgören E, Bakırdere S, Aydın F ve Ataman OY. Effects of dietaryboron on cervicalcytopathologyand on micronucleusfrequency in exfoliatedbuccalcells. EnvironToxicol. 2007; 22 s: 17–25.

Korkmaz M, Yenigün M, Bakırdere S, Ataman OY, Keskin S, Müezzinoğlu T, ve Lekili M. Effects of chronicboronexposure on semen profile. Biologicaltrace element research, 2011, 143(2), 738-750.

Kristiane S, Thomas PN ve Anne S. MembraneTrafficking in Autophagy. International Review of Cell andMolecularBiology; yayında olduğu süre: 21 Eylül 2017.

Ku WW, Chapin RE, Moseman RF, Brink RE, Pierce KD ve Adams KY. Tissuedisposition of boron in maleFischerrats. ToxicolApplPharmacol 1991, 111: 145-51.

Kuru R ve Yarat A. Bor ve Sağlığımıza Olan Etkilerine Güncel Bir Bakış. ClinExpHealthSci 2017; 7: S: 107-114.

Louis DN, Perry A, Reifenger G, vonDeimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P ve Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016; 131(6): 803-20.

Macdonald F, Ford CHJ ve Casson AG. *Molecular Biology of Cancer*. 2. baskı, Garland Science/BIOS Scientific Publishers, New York, ABD, 2004, s: 1-6.

Mihailoff GA ve Haines DE. *Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications* (5. baskı) 2018, s: 15–33.

Mizushima N ve Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 3.6 2007, s: 542-545.

Montano N "Expression of EGFRvIII in glioblastoma: prognostic significance revisited." *Neoplasia* 13.12 (2011): 1113-1121.

Murmu N, Ghosh P, Gomes A, Mitra S, Das M, Besra SE, Majumdar J, Bhattacharya S, Sur P ve Vedasiromoni JR. Antineoplastic effect of new boron compounds against leukemic cell lines and cells from leukemic patients. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 2002, CR, 20(4), s: 511-515.

Murray FJ. A comparative review of the pharmacokinetics of boric acid in rodents and humans. *Biol Trace Elem Res* 1998, 66, s: 331-41.

Naghii MR, Mofid M, Asgari AR, Hedayati M, ve Daneshpour MS. Comparative effects of daily and weekly boron supplementation on plasma steroid hormones and proinflammatory cytokines. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 2011 25(1), 54-58.

Naghii MR ve Samman S. The effect of boron supplementation on

its urinary excretion and selected cardiovascular risk factors in healthy male subjects. *Biol Trace Elem Res* 1997; 56 s: 273-86.

Nakamura H. Liposomal boron delivery for neutron capture therapy. *Methods in enzymology* 465, 2009, s: 179-208.

Nielsen FH, Hunt CD, Mullen LM ve Hunt JR. Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women. *FASEB J* 1987; 1 s: 394-7.

Nielsen FH, Mullen LM ve Gallagher SK. Effect of boron depletion and repletion on blood indicators of calcium status in humans fed a magnesium-low diet. *J Trace Elem Exp Med* 1990; 3 s: 45-54.

Nielsen FH. Update on human health effects of boron. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 28.4, 2014, s: 383-387.

Nzietchueng RM, Dousset B, Franck P, Benderdour M, Nabet P ve Hess K. Mechanisms implicated in the effects of boron on wound healing. *Journal of trace elements in medicine and biology*, 2002, 16(4), 239-244.

Park M, Li Q, Shcheynikov N, Muallem S ve Zeng W. Borate transport and cell growth and proliferation. Not only in plants. *Cell Cycle* 2005, 4: 24-6.

Peixoto MS, de Oliveira Galvão MF ve Batistuzzo de Medeiros SR. Cell death pathways of particulate matter toxicity. *Chemosphere* 188C, 2017, s: 32-48.

Pignatti F, van den Bent M, Curran D, Debruyne C, Sylvester R ve arkadaşları. Prognostic factors for survival in adult patients with cerebello-papillary glioma. *J. Clin. Oncol* 2002, s: 2076-2084.

Penland JG. Dietary boron, brain function, and cognitive performance.

EnvironHealthPerspect. 1994, 7:65-72.

Pizzorno L. Nothing boring about boron. Integr Med 2015; 14 s: 35-48.

Reggiori F ve Klionsky DJ. Autophagic processes in yeast: mechanism, machinery and regulation. Genetics, 194(2) 2013, s: 341-361.

Rudin CM ve Thompson CB. Apoptosis and disease: Regulation and clinical relevance of programmed cell death. Ann Rev Med. 1997; 48 s: 267-281.

Rüya K. ve Ayşen Y. Bor ve Sağlığımıza Olan Etkilerine Güncel Bir Bakış. ClinExpHealthSci, 2017, s: 107-114.

Russo M ve Russo GL. Autophagy Inducers in Cancer. Biochemical pharmacology. 2018.

Schiff D. Low-grade gliomas. Continuum (Minneapolis). 2015. 21(2 Neuro-oncology):345-54.

Scorei RI ve Popa R. 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, 2010 s: 346-351.

Shoja MH, Reddy ND, Nayak PG, Srinivasan KK ve Rao CM. "Glycosmis pentaphylla (Retz.) DC arrests cell cycle and induces apoptosis via caspase-3/7 activation in breast cancer cells." Journal of ethnopharmacology 168, 2015, s: 50-60.

Steven B. ve Abdullah KG. Glioblastoma E-Book. Elsevier Health Sciences, 2016, Chapter 1 – The Story of Glioblastoma: History and Modern Correlates; s: 1-9.

Stupp R., Mason WP, van den Bent MJ, ve arkadaşları. Radiotherapyplusconcomitantandadjuvanttemozolomideforglioblastoma. N. Engl. J. Med, 2005, 352, s: 987–996.

Sutherland B, Woodhouse LR, Strong P ve King JC. Boronbalance in humans. J Trace Elem ExpMed 1999, 12, s: 271–84.

Tait JF, Gibson D, Fujikawa K. Phospholipidbindingproperties of humanplacentalanticoagulant protein-I, a member of thelipocortinfamily. J BiolChem. 1989; 264 s: 7944-7949.

Tan CP, Lu YY, Ji LN ve Mao ZW. Metallomicsinsightsintotheprogrammedcelldeathinducedby metal-basedanticancercompounds. Metallomics, 2014. 6:5, s: 978-995.

Tepedelen EB, Korkmaz M, Tatlisumak E, Uluer ET, Ölmez E, Değerli İ, Soya E, ve İnan S. A Study on theAnticarcinogenicEffects of CalciumFructoborate. Biologicaltrace element research, 2017 178(2), 210-217.

Tepedelen EB, Soya E ve Korkmaz M. Boricacidreducestheformation of DNA doublestrandbreaksandaccelerateswoundhealingprocess. Biologicaltrace element research, 2016, 174(2), 309-318.

Tepedelen E.B., Yılmaz E.E., Degerli İ., Türkmen H., Korkmaz M., Antiproliferativeand anti-inflamitoryeffect of boronderivatives on BenignProstateHyperplasia (BPH). XI Conference of theInternationalSocietyforTrace Element Research in Humans (ISTERH) Srebreno-Dubrovnik, Croatia 18-22 October 2015.

Thorburn A. ApoptosisandAutophagy: regulatoryconnectionsbetweentwosupposedlydifferentprocesses. Apoptosis, 13(1), 1-9.

Uçkun Z. Bor maruziyetinin insanlar üzerindeki genotoksik etkilerinin araştırılması. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2006.

Uram Ł, Nizioł J, Maj P, Sobich J, Rode W ve Ruman T. N (4)-[B-(4, 4, 5, 5-tetramethyl-1, 3, 2-dioxaborolan) methyl]-2'-deoxycytidine as a potential boron delivery agent with respect to glioblastoma.

Biomedicine & Pharmacotherapy 95, 2017 s: 749-755.

Van den Eijnde SM, Luijsterburg AJ, Boshart L, De Zeeuw CI, van Dierendonck JH, Reutelingsperger CP ve Vermeij-Keers C. In situ detection of apoptosis during embryogenesis with Annexin V: From whole mount to ultrastructure. Cytometry. 1997; 29 s: 313-320.

Verkhatsky A ve Parpura V. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology, Astrocytes, 2017, s: 251-268.

Young N, Pearl DK ve Van Brocklyn JR. Sphingosine-1-phosphate regulates glioblastoma cell invasiveness through the urokinase plasminogen activator system and CCN1/Cyr61. Mol Cancer Res. 2009 Jan;7(1) s:23-32.

Quinn JA, Reardon DA, Friedman AH, Rich JN, Sampson JH ve arkadaşları. Phase II trial of temozolomide in patients with progressive low-grade glioma. J. Clin. Oncol. 2003; 21: 646-651.

World Health Organization. Boron in drinking-water report. Geneva, 1998, s: 1-12.

7.EKLER

EK1

Evrak Tarih ve Sayısı: 25/05/2017-E.42965



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

Sayı : 28233352-302.14.01-
Konu : Burak Çelik'in Tez Konusu hk.

SBE-TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüzün 24.05.2017 tarihli Yönetim Kurulu Toplantısında, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı 161353001 numaralı öğrencisi Burak ÇELİK'in Tez Konusunun "Boraks Pentahidrat'ın Glioblastoma Multifforme Hücre Hattı Aracılığıyla Tedavi Potansiyelinin Araştırılması" olarak kabul edilmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Ayşe AKTAŞ
Enstitü Müdürü

Adres: Tıp Fakültesi Dekanlığı Zemin Kat Üncüsoyloğlu Kampüsü-Manisa
Telefon: 09 2361 2165989 Faks: 09 2361 2382158
E-Posta: sagliksekretesi@cbu.edu.tr Elektronik Ağ: saglik@cbu.edu.tr

Bilgi İçin: Ayşe Ertek

Unvanı: Memur



EK2

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu

MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ TIBBİ BİYOLOJİ Ana Bilim Dalı Başkanlığı'na

Tez Adı Boraks Pentahidrat'ın Glioblastoma Multiforme Hücre Hattı Aracılığıyla Tedavi Potansiyelinin Araştırılması

Tezime ilişkin **26/04/2019** tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 4'tür.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza
26/04/2019

Adı Soyadı : Burak ÇELİK
Öğrenci No : 161353001
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji A.D
Programı : Yüksek Lisans

DANIŞMAN ONAYI
İYGÜNDÜR,
Prof. Dr. Mehmet Korkmaz

Açıklamalar

- 1- Tez Çalışması Orijinallik Raporu (TCOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanan için kişisel hesap zima hakla bulunan bir danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneçiler tarafından alınır.
- 2- Sayfa sayısı 400'den az olan tezlere için tez savunmasından önce ve başarılı olma durumunda düdüktmelerden sonra olmak üzere 2 kez TCOR alınır./400 sayfa'dan fazla olan tezlere 400 ve kutarı sayısında bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına diğer detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanan kütüphanelerin sitesinden ulaşılabilir.)
- 3- TCOR, tevin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmın tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.
- Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.
- 4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın süreç içerisinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır. - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimeden daha az bölümleri içeren metin kısımları hariç (Unit must be at least 5 words)
- 5- **İsteğe bağlı ayarlar kısmından: "Ödevleri jüraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YÖRE polide iştirak edilmesi gerekmektedir;** aksi durumda ilgili tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 olacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun sürecek gerektirecektir.
- 6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilecek olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşerinde yücdekk sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "yüklem sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu" formunu iştirak.
- 7- **Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.**
- 8- Tez savunma vizesi sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma anavir tarihi sonrasında teede yapılmış muhtemir diğiykileri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak iştiraklenmiş ve tez danışmanı tarafından onaylanarak iştiraklenmiş ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekte yükümlüdür.
- 9- Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin/9370.tr.html>

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı	BURAK	Soyadı	ÇELİK
Doğum Yeri	ANKARA	Doğum Tarihi	22.06.1993
Uyruğu	T.C	Telefon	0554 934 58 00
E-mail	burak4293@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Celal Bayar Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2016-Devam etmekte
Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi – Fen ve Edebiyat Fakültesi – Manisa – Biyoloji	2011-2015
Ön lisans	Anadolu Üniversitesi – Açık öğretim fakültesi – Eskişehir – Laborant ve veteriner sağlık	2012-2016
Lise	Kurtuluş Anadolu Lisesi – Ankara –	2007-2011

İş Deneyimi Görevi	Kurum	Süre	Yer
Stajyer	Manisa Hafsa Sultan Hastanesi Bölüm : Parazitoloji-Laboratuvar örnek ve sonuç kayıt	27/05/2014 – 02/02/2015	YUNUSEMRE-MANİSA

Stajyer	MANİSA BÜYÜKŞEHİR BELEDİYESİ SAĞLIK İŞLERİ DAİRESİ BAŞKANLIĞI VETERİNER İŞLERİ ŞUBE MÜDÜRLÜĞÜ HAYVAN BARINAĞI' nda Laborant ve Veteriner Sağlık Stajı	26.10.2015/ 07.12.2015	YUNUSEMRE- MANİSA
Ürün satış ve tanıtım görevlisi (Promotör)	Saha satış pazarlama A.Ş.	05.06.2016/ 05.10.2016	İSTANBUL

Bilgisayar Bilgisi

Microsoft Office Programları

AdobePhotoshop

Eğitim Sınav Sonuçları

- Lisans Bitirme Puanı: 2.48 / 4.00, 2015.
- Lise: Bitirme puanı: 56 / 100, 2011.