

**ÇEŞİTLİ BOR MİNERALLERİNİN
GÖĞÜS VE AKCİĞER KANSER TÜRLERİ
ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İN VİTRO OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Tuğba TUNÇAY
Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
Ağustos-2011

Bu tez çalışması Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü (BOREN) tarafından desteklenmiştir.

Proje No:2009-Ç-0214

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Tuğba TUNÇAY'ın “Çeşitli bor minerallerinin göğüs ve akciğer kanser türleri üzerine etkilerinin *in vitro* olarak araştırılması” başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki, Yüksek Lisans Tezi 19/ 07/ 2011 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Yard.Doç.Dr. EMEL ERGENE	
Üye	: Doç. Dr. HÜLYA SİVAS	
Üye	: Yard.Doç.Dr. CİHAN DARCAN	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÇEŞİTLİ BOR MİNERALLERİNİN GÖĞÜS VE AKCİĞER KANSER TÜRLERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN *İN VİTRO* OLARAK ARAŞTIRILMASI

Tuğba TUNÇAY

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE

2011, 89 sayfa

Son yıllarda bor giderek artan bir öneme sahiptir. Çalışmamızda, borik asit, sodyum perborat ve diamonyum tetraboratın akciğer ve meme kanserlerine olan sitotoksik ve apoptotik etkileri *in vitro* yöntemlerle araştırılmıştır.

Bor bileşenlerinin sitotoksik etkilerini saptamak amacı ile MTT ve Nötral kırmızısı alımı testi uygulanmıştır. Mitokondriye bağlı apoptoz mitokondri zar geçirgenliği testiyle, bor türevlerinin DNA kırılması üzerindeki etkileri DNA fragmentasyon belirleme yöntemiyle tespit edilmiştir. Kaspaz 3 ve 8 enzim aktivasyonlarının ölçülmesiyle kaspaz yolları analiz edilmiştir.

Sonuç olarak, akciğer kanseri üzerinde en yüksek apoptotik etkiye borik asitin yol açtığı gözlenmiştir. Sodyum perborat ve borik asit'in meme kanseri hücrelerini de etkili bir şekilde apoptoza sevkettiği saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Bor, akciğer kanseri, meme kanseri, apoptoz

ABSTRACT

Master of Science Thesis

INVESTIGATION THE EFFECT OF SOME BORON COMPOUNDS ON LUNG AND BREAST CANCER IN *IN VITRO*

Tuğba TUNÇAY

Anadolu University

Graduate School of Sciences,

Department of Biology

Supervisor: Yrd. Doç.Dr. Emel ERGENE

2011, 89 pages

In recent years, boron has a growing importance. In our study, we investigated the cytotoxic and apoptotic effects of boric acid, sodium perborate and diammonium tetraborate on lung and breast cancer cell lines using *in vitro* methods.

To determined cytotoxic effects of boron compounds, the MTT and Neutral Red Uptake assays was performed. Apoptosis depend on mitochondria was determined by mitochondrial membrane permeability assay. Caspase pathway was analysed by measuring Caspase 3 and caspase 8 enzymes activations. Effect of the boron derivatives on DNA breakage was determined by DNA fragmentation assay.

Our experiment suggest that highest apoptotic effect on lung cancer caused by the boric acid and sodium perborate and boric acid induced apoptosis on breast cancer cells, effectively.

Keywords: Boron, Lung cancer, Breast cancer, Apoptosis.

TEŞEKKÜR

Deneysel çalışmalarım ve lisansüstü eğitimim süresince, her türlü desteği sağlayan, zor anlarımda anlayış ve teşvik edici tutumlarıyla beni motive eden çok değerli hocam, danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Emel ERGENE' ye en içten teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bilgi ve tavsiyelerinden yararlandığım değerli hocam Hülya SİVAS'a, laboratuarda ve deneylerimin yapılması aşamalarında göstermiş olduğu yardımlardan dolayı Murat KAYA ve Beklem BOSTANCIOĞLU'na, teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımın devamlılığı için gerekli olanaklardan faydalanmamı sağlayan tüm Biyoloji bölümüne ve Hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Lisansüstü eğitimim sırasında her zaman yanımda olan tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler.

Çalışmalarım esnasında annem, babam ve kardeşimden görmüş olduğum destekten dolayı kendilerine ayrıca teşekkür ederim.

Tuğba TUNÇAY
AĞUSTOS, 2011

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1 Genel Bilgiler	2
1.1.1. Bor'un tarihçesi.....	2
1.1.2. Bor elementi.....	3
1.1.3. Borun endüstriyel kullanım alanları.....	4
1.1.4.Sağlık alanında bor kullanımı	6
1.2. Deneylerde Kullanılacak Olan Bor Çeşitleri.....	10
1.2.1. Borik asit.....	10
1.2.2. Sodyum perborat	10
1.2.3. Diamonyum tetraborat	11

1.3. Kanser	11
1.3.1. Tanımı ve moleküler biyolojisi	11
1.3.2. Meme kanseri	14
1.3.3. Akciğer kanseri	15
1.4. Apoptoz	16
1.4.1. Apoptoz yolakları	18
1.4.1.1. İç yolak	19
1.4.1.2. Dış yolak	20
1.4.2. Apoptoz'un düzenlenmesinde görev alan moleküler düzenleyiciler	21
1.4.2.1. Kaspazlar	21
1.4.2.2. Fas ve FasL	22
1.4.2.3. TRAIL ve TRAIL reseptörleri	23
1.4.2.4. TNF- α	23
1.4.2.5. Bcl-2 ailesi	23
1.4.2.6. p53	24
1.5. Apoptoz Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	25
1.5.1. Mitokondriyal aktiveye dayalı MTT ölçümü	25
1.5.2. Lizozomal aktiviteye dayalı nötral kırmızısı alımı testi	26
1.5.3. Mitokondri membran geçirgenliği testi ile apoptoz tayini	27
1.5.4. Kaspaz 3 / 8 aktivasyonu ile apoptoz tayini	27

1.5.5. Agaroj jel elektroforezi ile apoptoz tayini.....	28
1.5.6. Mikroskop ile apoptoz tayini	28
1.5.7. Anneksin V yöntemi	28
1.5.8. TUNEL yöntemi	29
2.MATERYAL YÖNTEM	30
2.1. Materyal	30
2.1.1. Çalışmalarda kullanılan bor bileşenleri	30
2.1.2. <i>In vitro</i> çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler	30
2.1.3. Kullanılan aletler ve cihazlar	30
2.1.4. Hücre kültüründe kullanılan hücreler	31
2.1.5. Deneylerde kullanılan test maddelerinin hazırlanışı.....	31
2.1.6. Deneyde kullanılan ortamların içerikleri ve hazırlanışları.....	32
2.2. Yöntem.....	34
2.2.1.Hücrelerin testler için hazırlanması	34
2.2.2. MTT testi	35
2.2.3. Nötral kırmızısı alımı testi	35
2.2.4. Mitokondri membran geçirgenliği testi	36
2.2.5. Kaspaz 3 / 8 apoptoz belirleme yöntemi.....	37
2.2.6.DNA fragmentasyonu ve agaroj jel elektroforezi	37

3.BULGULAR	39
3.1. MTT Yöntemi	39
3.1.1. A549 akciğer adenokarsinom hücresi.....	39
3.1.2 MCF7 meme kanseri epitel hücresi.....	44
3.2. Nötral Kırmızısı alımı testi sonuçları	50
3.2.1. A549 adenokarsinom hücresi	50
3.2.2. MCF7 meme kanseri epitel hücresi	52
3.3. Mitokondri Zar Bütünlüğü Testi	54
3.3.1. A549 adenokarsinoma hücresi	
mitokondri zar bütünlüğü testi	55
3.3.2. MCF7meme epitel hücresi mitokondri zar bütünlüğü testi	58
3.4. Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 apoptoz belirteç deneyi	61
3.4.1. A549 adenokarsinoma hücresi	
kaspaz 3 / 8 apoptoz belirteç deneyi.....	61
3.4.2. MCF7 meme epitel karsinoma hücresi	
kaspaz 3 / 8 apoptoz belirteç deneyi.....	62
3.5. DNA Jel Elektroforezi İle Fragmentasyon Tayini	63
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	65
5. KAYNAKLAR	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Borun kullanım alanları	5
1.2. A549 hücrelerine 5 mM sodyum perborat'ın apoptotik etkisinin mitocapture yöntemiyle araştırılması.....	18
1.3. Apoptoz Yolaklarının anlatımı	21
1.4. p53 geni görevleri.....	25
3.1. A549 hücrelerinde borik asit'in mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$)	39
3.2. A549 hücrelerinde a. kontrol, b. 5 mM borik asit'in 48 saat'lik mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi (X200).....	40
3.3. A549 hücrelerinde sodyum perborat'ın mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$)	41
3.4. A549 hücrelerinde a. kontrol, b. 5 mM sodyum perborat'ın 48 saat'lik mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi (X 200).....	42
3.5. A549 hücrelerinde diamonyum tetraborat'ın mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi($P \leq 0.001$)	43
3.6. A549 hücrelerinde a. kontrol,b. 10 mM diamonyum tetraborat'ın 48 saat'lik mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi (X 200).....	44
3.7. MCF7 hücrelerinde borik asit'in mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$)	45

3.8. MCF7 hücrelerinde a. kontrol, b. 50 mM borik asit'in 48 saat'lik mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi (X 200).....	46
3.9. MCF7 hücrelerinde a. kontrol, b. 50 mM borik asit'in 48 saat'lik mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).....	47
3.10. MCF7 hücrelerinde a. kontrol, b. 75 mM sodyum perborat'ın 48 saat'lik mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi (X 200).....	48
3.11. MCF7 hücrelerinde a. kontrol, b. 75 mM sodyum perborat'ın 48 saat'lik mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).....	49
3.12. MCF7 hücrelerinde a. kontrol, b. 45 mM diamonyum tetraborat'ın 48 saat'lik mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi (X 200).....	50
3.13. A549 hücrelerinde a. kontrol, b. 50 mM borik asit'in lizozoma dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).....	51
3.14. A549 hücrelerinde a. kontrol, b. 50 mM sodyum perborat'ın lizozoma dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).....	51
3.15. A549 hücrelerinde a. kontrol, b. 75 mM diamonyum tetraborat'ın lizozoma dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).....	52
3.16. MCF7 hücrelerinde a. kontrol, b. 50 mM borik asit'in lizozoma dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).....	53
3.17. MCF7 hücrelerinde a. kontrol, b. 50 mM sodyum perborat'ın lizozoma dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).....	53

3.18. MCF7 hücresinde diamonyum tetraborat'ın	
lizozoma dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).....	54
3.19. A549 hücresi; a. 5 mM borik asit, b. 5 mM sodyum perborat,	
c. 10 mM diamonyum tetraborat, d. kontrol, p: apoptotik hücre,	
s: sağlıklı hücre (X 400).....	56
3.20. A549 hücrelerinde deney maddelerinin etkisiyle oluşan apoptoza	
uğramış hücrelerin % oranları.....	58
3.21. MCF7 hücresi; a. 50mM borik asit, b.75 mM sodyum perborat,	
c. 45 mM diamonyum tetraborat d. kontrol, p: apoptotik hücre,	
s: sağlıklı hücre, (X400).....	59
3.22. MCF7 hücrelerinde deney maddelerinin oranları etkisiyle oluşan	
apoptoza uğramış hücrelerin % oranları	61
3.23. A549 hücrelerinde deney maddelerinin kaspaz aktivasyonuna dayalı	
apoptotik etkisi.....	62
3.24. MCF7 hücrelerinde deney maddelerinin kaspaz aktivasyonuna dayalı	
apoptotik etkisi.....	62
3.25.A549 hücrelerinde deney maddelerinin etkisiyle oluşan apoptoz A. Marker,	
B. Kontrol, C.Cisplatin, D.5 mM borik asit, E.5 mM sodyum perborat,	
F.10 mM diamonyum tetraborat	63

3.26. MCF7 hücrelerinde deney maddelerinin etkisiyle oluşan apoptoz A. Marker,	
B. Kontrol, C. Cisplatin, D. 50 mM borik asit,E. 75 mM sodyum perborat,	
F. 45 mM diamonyum tetraborat	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

3.1. A549 hücrelerinde deney maddelerinin etkisiyle oluşan apoptoza uğramış ve sağlıklı hücrelerin toplam sayıları ve % oranları	58
3.2.MCF7 hücrelerinde deney maddelerinin etkisiyle oluşan apoptoza uğramış ve sağlıklı hücrelerin toplam sayıları ve % oranları	61

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yaşam döngüsü içerisinde, insan ve diğer canlılar için doğal kaynakların önemi göz ardı edilemez. İlk çağlardan bu yana, insanlar yaşamlarını daha fonksiyonel hale getirmek için doğal kaynak olan madenlerden faydalanmışlardır. Öyle ki; insanoğlunun yaşadığı devirler kullandıkları madenlere göre isimlendirilmiştir. Doğal madenlerimizden biri olan bor ise; cam sanayisinden temizlik sanayisine kadar çok geniş bir yelpazede kullanım alanına sahiptir.

Maden kaynakları ülkelere hem politik hem de ekonomik bazı avantajlar sağlamaktadır. Türkiye bor kaynağı bakımından dünyanın en büyük rezervine sahiptir ve dünya toplam rezervinin % 72'i Türkiye'de bulunmaktadır (Buluttekin 2008, Parks ve Edwards 2005). Türkiye sahip olduğu bu oran sayesinde bor konusunda dünya'da stratejik bir öneme sahiptir. Sonuç olarak; Türkiye dünya bor ürünlerinin en büyük üreticisidir (Woods 1994).

Günümüzde kanser tedavisinde; cerrahi müdahale, kimyasal tedavi (kemoterapi), immünoterapi, gen terapisi, ışın tedavisi (radyoterapi) ve bunların yanında, destek amaçlı alternatif tıp adı altında çeşitli tedaviler kullanılmaktadır. Kemoterapinin asıl amacı; hastalıklı olan hücreleri yok etmek olsa da, kullanılan ilaçların etkileri sadece hastalıklı hücrelerde olmayıp, aynı zamanda sağlıklı hücreleri de olumsuz yönde etkilemektedir. Bu durum, tedavi sırasında hastanın yaşam kalitesine olumsuz etkilemektedir. Diğer bir zorlayıcı faktör ise; kanserli hücrelerde sürekli oluşan mutasyonlar sonucu, ilaca karşı direnç geliştirmesidir. Sonuç olarak; ilaç hammaddelerinin moleküler seviyede araştırılması, bu olumsuz etkilerin üstesinden gelinmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Araştırmamızda, çeşitli bor maddelerinin, insan akciğer adenokarsinoma (A549) ve meme kanseri (MCF7) hücreleri üzerine etkilerinin sitotoksik ve apoptotik olarak belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla; borik asit, sodyum perborat ve diamonyum tetraborat'ın çeşitli konsantrasyonları ile her iki hücre hattında sitotoksik testleri uygulanmış ve hücrelerin yaklaşık yarısının hayatta kaldığı konsantrasyon (IC_{50} ; Inhibited Concantration)'lar belirlenmiştir. Ardından; belirlenen IC_{50} konsantrasyonlarındaki bor bileşenleri besiyerine ilave edilmiş ve 48 saat boyunca

apoptotik etkileri gözlemlenmiştir. Bor bileşenlerinin hücrelerdeki apoptoz yollarına etkisinin aydınlatılabilinmesi amacıyla, mitokondri zar geçirgenliği testi uygulanmış, kaspaz 3 ve 9'un aktivasyonu ölçülmüş ve apoptoz sırasında oluşan DNA kırıkları agaroz jel elektroforeziyle değerlendirilmiştir.

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Bor'un tarihçesi

Babil uygarlığının 4000 yıl önce Uzak Doğu'dan boraks ithal ettiği ve altın işletmeciliğinde kullandığı bilinmektedir. Mısır ve Mezopotamya uygarlıklarının tıpta ve özellikle mumyalamada, Çinlilerin porselen cilalanmasında boraks kullandıkları, eski Yunanlıların ise temizlik maddesi olarak kullandıkları belirtilmiştir (Fail ve ark. 1989). Boraks'ın ilk kaynağının Tibet gölleri olduğu düşünülmektedir (Woods 1994). Sekizinci yüzyılda, Orta Asya'da bulunan göllerden çeşitli bor içeren tuzlar, Mekke ve Medineli Arap tüccarlar tarafından Avrupa'ya getirilmiştir. Avrupalı kuyumcular tarafından boraks'ın kullanımının 12. yüzyıl'a kadar dayandığı bilinmektedir (Garret 1998).

Çok eski zamanlardan beri kullanılmasına karşın bor, saf olarak ilk kez 1808 yılında, Fransız kimyager Joseph Gay-Lussac ve Baron Louis Thenard tarafından elde edilmiştir. İtalya'nın Toscana kentindeki sıcak sulara bulunan bor oksit, potasyum ile ısıtılarak laboratuvar şartlarında saflaştırılmıştır (Zeki 1985). Bor'un Türkiye'deki geçmişi Romalılara kadar uzanmaktadır. İlk borat yatağı, Bandırma'nın güneyindeki Sultançayır Pandemit yataklarıdır ve tahminlere göre 13. ya da 14. yüzyıldan beri işletilmektedir (Garrets 1998).

Bor madenciliği, 1865 yılında "Compaigne Industrialle des Mazures" şirketi tarafından Susurluk ilçesinin 9 km güneyinde, Aziziye köyündeki yatakta başlatılmış daha sonra bu bor madeni devlete devredilmiştir. 1969 yılında, ETİBANK maden işletmesinin yaptığı sondaj çalışmasıyla ortaya çıkan maden rezervinin 480 milyon tonun üzerinde bir değere sahip olduğu anlaşılmıştır. Böylece, Bandırma ve Kırka'da, temel bor bileşikleri üreten ilk tesisler kurulmuş ve dünyanın sayılı bor yataklarının başına geçmiştir (Doğan ve ark. 2005).

1.1.2.Bor elementi

Periyodik tabloda “B” sembolüyle gösterilen bor, 3A grubunun ilk ve en hafif üyesidir (Naghı ve Mofid 2008). 150’den fazla mineralin bileşiminde yer almasına rağmen, doğada serbest halde bulunmamaktadır (Alkan 1985). Borun atom numarası 5, atom ağırlığı 10,81, özgül ağırlığı 2,84 gr/cm³ ve ergime noktası 2348 Kelvin’dir (Pahl ve ark. 2005). Elementin amorf bir toz halindeki rengi, koyu kahverengidir ve sert yapılıdır. Kristal haldeki bor ise; hafiftir, serttir ve aynı zamanda ısıya ve çizilmeye karşı dayanıklıdır. Ayrıca; oda sıcaklığında zayıf, yüksek sıcaklıkta iyi iletken, rengi ise sarımsı kahverengidir (Coolbaughve ark. 2006). Doğada en çok Borat ve Borik asit halinde, volkanik kayalarda, kaynak sularında ve toprakta değişik yoğunluklarda bulunmaktadır (Dieter 1994).

Bor elementinin lityum, berilyum gibi hafif elementler ile birlikte Bing Bang patlaması sonucunda oluştuğu kabul edilmiştir. Yer kabuğunda 51. yaygın element olarak % 0,0003’lük oranla, boratlar ve borosilikatlar halinde yer almaktadır (Bolaños ve ark. 2004). Buna karşılık, Atmosfer, Litosfer (magmatik taşlar), Hidrosfer (deniz göl, ırmak maden suları) ve Biyosferde (insan hayvan ve bitkiler) bulunmaktadırlar (Özkan ve ark. 1997, Kot 2008). Bor yataklarının neredeyse tamamı yanardağ etkinliğinin yüksek olduğu gölsel ortamlarda bulunmaktadır (Parks ve Edward 2005). Borat yatakları ise volkanik etkinliklerin fazla olduğu kurak / yarı kurak havzalarda oluşmaktadır (Coolbaugh 2006). Borun diğer bir oluşma biçimi ise; magmanın yeryüzüne doğru yükselirken kristalleşmesi sürecidir. Bu tür oluşumda bor, kayacı oluşturan minerallerin kristal yapısına girmeyerek, soğumakta olan magma kristalleşirken dışarı salınan su ile birlikte kayacı terk eder (Şaylı 2003).

Ülkemiz dünya bor rezervinin % 72’sine sahiptir ve ülkemizi sırasıyla; ABD, Arjantin, Peru, Rusya ve Çin izlemektedir. Üretim açısından ise ülkemiz işlenmiş ve ham bor üretiminde ABD’ye yaklaşmış olsa da bor cevheri kullanılarak elde edilen ürünlerin dış ticaretinde oldukça gerilerde kalmaktadır (Bakkalcı 2007). Buna karşılık, Türkiye’nin bor rezerv ömrü 412 yıl iken ABD’de bu süre 76 yıldır. Türkiye’deki bor yatakları Marmara ve İç Anadolu’nun bir kısmını kapsamaktadır. Başlıca Balıkesir ve

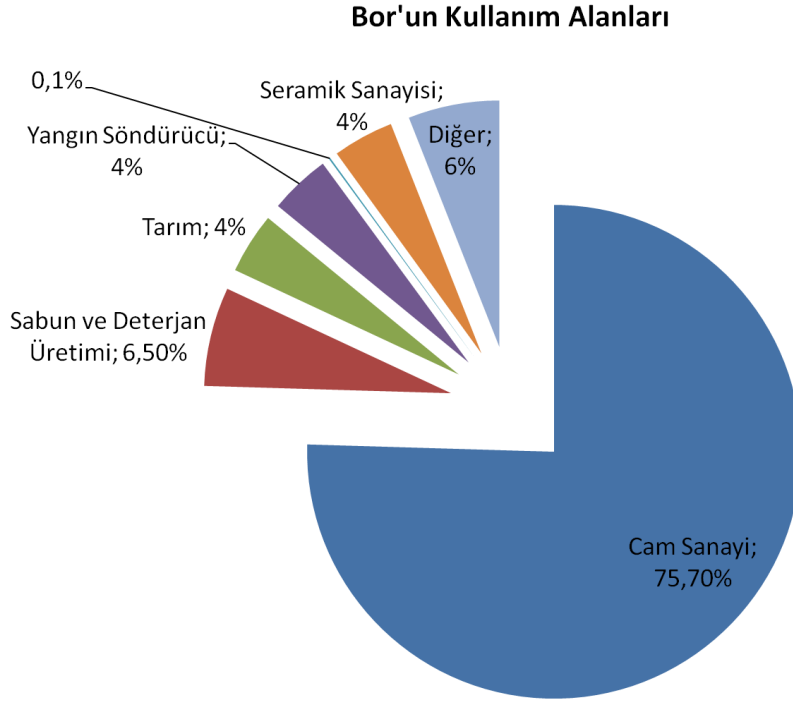
Kütahya’da olmak üzere, Bursa ve Eskişehir illerinde zengin bor yatakları mevcuttur. Ticari olarak Türkiye’deki bor yataklarında bulunan önemli bor mineralleri, boraks (tinkal), kernit, pandemit, üleksit, propertit, kolemanit ve hidroborasittir (Buluttekin 2008).

1.1.3. Bor’un endüstriyel kullanım alanları

Bor elementi, diğer elementlerle yaptığı farklı bileşiklerin sahip olduğu farklı özelliklerinden dolayı, çok çeşitli alanlarda kullanılmaya başlanmıştır. Bor; fiber optik, cam, seramik, askeri zırhlı araç ve elektrik üretiminde kullanıldığı gibi; elektronik, bilgisayar, iletişim, metalürji teknolojilerinde, inşaat, çimento, otomotiv, tekstil, enerji, nükleer sanayiler gibi yaklaşık 250 civarında endüstriyel alanda da kullanılmaktadır.

Sağlık alanında; osteoporoz, alerjik hastalıklar, psikiyatri, artirit, menopoz, beyin kanserlerinin tedavisi ve antiseptik ürün geliştirilmesi gibi geniş bir yelpazede kullanılmaktadır (Dordas ve Brown 2005). Bor’un sahip olduğu 2 farklı izotop olan ^{10}B ve ^{11}B nötron emici özelliğe sahiptir. Moleküllerin üç boyutlu yapılarını inceleyerek hastalığın aşamalarını belirlemek amacı ile Nükleer Manyetik Rezonans (Nuclear Magnetic Resonance; NMR) araştırmalarında kullanılmaktadır (Haner ve Keifer 2009).

Bor yanıcı bir madde olmasına karşın, tutuşma sıcaklığının yüksek olması sebebiyle yanmayı geciktirici madde yapımında kullanılmaktadır. Borun ergime sıcaklığı 2076°C üstünde olması ve okside olması sebebiyle, borik asit ve boratlar, selülozik maddelere ve ateşe karşı dayanıklılık sağlarlar (Lyday 2005). Yandığında, çevreyi kirletmemesi ve katı ürün açığa çıkarmasından dolayı, katı yakıt hücresi olarak kullanılabilir. Malzemelerin dayanıklılığını arttırmak için, plastik ve metallerle bor telleri kullanılır. Ayrıca bor izotopları, elektronları iyi bir şekilde absorblayabildiğinden, nötron detektörü olarak da kullanılmaktadır (Buluttekin 2008). Şekil 1.1.’de borun kullanım alanları yüzdelik dilimler halinde gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Borun kullanım alanları (Park ve Edwards 2005'ten uyarlanarak hazırlanmıştır.)

Bor minerallerinin sahip olduğu kimyasal özelliklerinden dolayı, tüketildiği alanlardan bir tanesi cam sanayisidir. Ergimiş halde olan cama katılan bor sayesinde akışkanlık yükseltilmekte, böylece ürünün dayanıklılığı ve ısıya karşı olan toleransı artırılmaktadır (Park ve Edwards 2005). Borosilikat camlar, cam yünü ve tekstil tipi cam elyafı üretiminde oldukça yaygın kullanılmaktadır. Özellikle cam elyafı sektörü dünyada bor kullanımının % 50'sini kapsamaktadır (Jensen 2008). Üleksit ve borat pentahidrat, cam yünü olarak, ısı ve ses yalıtımı için inşaat sektöründe kullanılırken kolemanit ve borik asit ise cam elyafında bozunmaya karşı dirençli olduğu için tekstil sektöründe kullanılmaktadır (Jensen 2008 ve Marshall 2007).

Bor ürünleri seramik endüstrisinde, çoğunlukla seramik sıırı ve emaye yapımında kullanılmaktadır. Yüzey kaplama alanında, bor ürünlerinin bağlayıcı özelliklerinden yararlanılmaktadır. Boratlar, camın akışkanlığını ve yüzey gerilimini düşürerek, sırların hızlı üretilmesinde, düzgün bir yüzeyin oluşmasında ve gözenek boyutu azaltılarak daha yoğun bir kıvam elde edilmesinde kullanılmaktadır (Grahil 2004).

Deterjan endüstrisinde ağartıcı olarak kullanılan sodyum perborat (NaBO_3) aktif bir oksijen kaynağıdır ve oldukça etkilidir (Parks ve Edwards 2005). Ayrıca mikrop öldürücü etkisinden dolayı, sabun ve deterjan yapımında kullanılmaktadır (Marcel 2010).

Atom reaktörlerinde borlu çelikler, bor karbürler ve titanbor alaşımları kullanılır. Yaklaşık her bir bor atomu bir nötron absorbe etmektedir. Atom reaktörlerinin kontrol sistemlerinde bor kullanılır. Aynı zamanda, nükleer atıkların depolanması için kolemanit kullanılmaktadır. Bor kısa yarı ömrü ve radyoaktif olmayan özelliğinden dolayı, nükleer uygulamalarda çok kullanılmaktadır (Grilic ve Jersan 2002).

Son çalışmalar sayesinde, bor yeni bir kullanım alanı kazanmıştır. Sodyum boronhidrat'ın suda çözünmesi ile sıvı borax ve hidrojen gazı üretilmekte ve oluşan hidrojen gazı, suyu elektriğe çevirmekte kullanılmaktadır (Parks ve Edwards 2005).

Bor, bitkiler için toprakta bulunması gerekli başlıca 16 elementten biri olup, bitkilerin bünyesinde besinlerin ve suyun taşınmasına yardımcı olur. Bitkilerin büyümesinde, gelişmesinde, ürün vermesinde önemli rol oynamaktadır. Sodyum pentaborat gibi bor mineralleri, tarımda gübre olarak mikro besleyici adı altında kullanıldığı gibi zararlı otların temizlenmesinde de yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilirler (Thellier ve ark. 2001, Gal 2003).

1.1.4. Sağlık alanında bor kullanımı

Bor elementinin insan, hayvan ve bitkiler üzerine etkisi araştırılmaktadır ve her geçen gün çok sayıda yararlı ya da zararlı etkileri ortaya konmaktadır. Bor, içme sularıyla vücuda alındığı gibi çevresel etkenlerle de bor'a maruz kalınmaktadır. Daha önceden de anlatıldığı üzere, bor çok geniş çapta kullanılmaktadır. Günlük hayatımızda deterjandan kozmetiğe, gübrelemeden pestisitlere kadar birçok alanda bor elementiyle karşı karşıya kalmaktayız.

Özellikle 1992 yılında, ABD'de Çevre koruma Ajansı (EPA), içme suyu sağlığı için borun önemli bir bileşen olduğunu duyurduktan sonra, başta Birleşik

Devletler olmak üzere bütün dünyada bor maddesine olan ilgi artmıştır. Park ve Edwards'ın 2005 yılında yayımladıkları makaleye göre, günlük içme suyu içerisinde 0,6 mg/L bor tavsiye edilen miktar olmuştur (Parks ve Edwards 2005). Buna karşılık, günlük yaşantımızda aldığımız bor miktarı literatürde belirtilen kesin miktarlardan değişiklik gösterebilmektedirler (Doğan 2005). Bunun sebebi kişilerin yaşadığı coğrafya ya da yaşam tarzları ile ilişkili olmalıdır.

2009 yılında Çin'de yapılan bir çalışmada, içme suyu kaynaklarında ve şişelenmiş sularda ki bor miktarları değerlendirilmiştir. Özellikle bor elementinin kullanıldığı sanayi alanlarında, içme suyu kaynaklarındaki çözünmüş bor elementinin diğer ülkelerle yakın derecelerde yaklaşık 1.28 mg/L olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan çalışmada, içme suyundaki bor miktarının herhangi bir sağlık sorununa sebep olmadığı belirtilmiştir (Jixu 2009).

1995 ve 2005 yılları arasında yapılan bir çalışmada, bor kullanımının akciğer kanserli bayanlar üzerinde olan etkisi araştırılmıştır. 763 kadın hasta ve 838 sağlıklı kontrol grubu üzerinde çalışılmıştır. Diyet bor alımının akciğer kanseri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Mahabir 2008). Başka bir çalışmada ise, sindirim yolunda borik asit'in vücutta emiliminin araştırılmasında verilen düşük dozdaki borik asit'in % 90'dan fazlasının 96 saat içerisinde böbreklerden atıldığı saptanmıştır (Velioğlu 2003).

Borun toksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada; günlük 15-30 g boraks veya 2-5 g borik asit doğrudan alındığında akut etki gözlemlenirken, günlük 5 g boraks veya 3 g borik asit doğrudan alındığında kronik etkinin ortaya çıktığı belirtilmiştir (Moseman 1994). İnsanlarda bor toksitesinde gözlenen belirtiler; bulantı kusma, baş ağrısı, şok, halsizlik, sindirim sistemi bozuklukları ve cilt lezyonları olarak belirtilmiştir (Velioğlu 2003 ve Doğan 2005).

Gül bitkisinin hücrelerinden elde edilmiş süspansiyon kültürde yapılan *in vitro* bir çalışmada; bor eksikliğinin bitkiler üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Hücre canlılığı, medyum pH'sı gibi çeşitli biyokimyasal parametreler ölçülmüştür. Sonuç olarak; bor eksikliğinin 24 saat gibi kısa bir sürede ölüme yol açtığı gözlemlenmiştir (Dordas ve Brown 2004).

2010 yılında yayımlanan bir çalışmada, borik asit ve boraksın fareler üzerindeki antioksidan aktivitesi, DNA hasarı ve bazı vitamin düzeyleri incelendiğinde;

borik asit'in DNA hasarını azalttığı, kandaki protein karbonilpotent (PCO)'i, karaciğerde GSH'ı ve ayrıca, böbrekte katalaz aktivitesini düşürdüğü gözlemlenmiştir. Buna karşılık plazmadaki vitamin C miktarı da artmıştır (İnce 2010).

2009 yılında yapılan bir çalışmada, borun kemik hücrelerine olan etkileri hücre canlılığı, proliferasyon, yönünden incelenmiştir. Bunun için bor'un farklı konsantrasyonları hücrelere verilmiş ve 14 gün boyunca değerlendirmeye alınmıştır. Sonuç olarak; moleküler seviyede borun kemik metabolizmasında önemli rol oynadığı belirtilmiştir (Hakkı 2010).

Düşük dozlardaki borun fareler ve köpekler üzerine uygulanması sonucu, sperm sayısında azalma gözlemlenmiştir. İnsanlar üzerinde de benzer olarak bir çalışma yapılmıştır. Bunun için bor madeninde çalışan yaklaşık 1000 erkek işçiye günde 31,3 mg bor, kontrol grubuna ise 4,25 mg bor verilmiştir. Sonuç olarak; kan, semen ve idrarları üzerine yapılan çalışmada; deney grubundaki 945 işçinin analiz sonuçlarının kontrol grubundaki 249 kişiden farklı olmadığı görülmüştür. Laboratuardaki deney hayvanlarının aksine, bor madeninde çalışan işçilerde borun herhangi bir toksik etkisi gözlemlenmemiştir (Sciali 2010).

Diğer bir çalışma da; güçlü bir akciğer ve karaciğer karsinogeni olduğu bilinen aflotoksinin, tarım ürünlerindeki kontaminasyonun oluşturduğu zararları önlemek için, aflotoksin'e maruz kalmış insan kan kültürlerine borik asit uygulanmıştır, aflotoksin'le zarar görmüş kan hücrelerinde, borik asit'in tedavi edici etkisinin olduğu gözlemlenmiştir. Böylece, hedef dokudaki aflotoksin zararlarının önlenip, iyileşme süresinin kısaldığı görülmüştür (Geyikoğlu ve Türkez 2008).

Berkeley Üniversitesinde yapılan bir çalışmada; besinlere bor ilavesinin, kemik yoğunluğu, beslenme, kan ve idrar üzerine etkileri bayan atletlerde incelenmiştir. Çalışma 17 atlet ve 11 kişilik kontrol grubuyla sürdürülmüştür. Bir yıllık bir çalışmanın sonucunda, atlet grubunun kemik yoğunluğunda artış gözlemlenmiştir. Kontrol grubunun kemik yoğunluklarında hafif bir azalma gözlemlenmiştir. Bu çalışmayla; kemik bozukluklarının önlenmesinde ve tedavi edilmesinde bor'un kullanılabileceği gösterilmiştir (Meacham ve Hunt 2001). Yapılan bir başka çalışmada; bor takviyesinin steroid hormon yapımı üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bor'un insan ve hayvanlarda, steroid hormon konsantrasyonunu artırdığı, böylece de; osteoporoz gibi kronik

hastalıkların önlenmesinde ipuçları verebileceği belirtilmiştir. Sonuç olarak; bu tip hastalıklar üzerine bor'un koruyucu bir potansiyele sahip olduğunu belirtmiştir (Naghı ve Mofid 2008).

Sağlık alanında bor'un, özellikle borik asit'in, kullanımı oldukça yaygındır. Bor, kanser tedavisinde Bor Nötron Yakalama Terapisi (Boron Neutron Capture Therapy; BNCT) adı verilen bir tedavi yönteminde kullanılmaktadır. Tedavi; normal dokulara aşırı radyasyon vermeden, tümör hücreleri hedef alınarak uygulanabilen bir tedavi çeşididir (Wang ve ark. 2010). Yöntem basit bir temele dayanmaktadır. Kararlı olan B^{10} izotopuna bir nötron kaynağı tarafından düşük enerjili nötronlar ışınlandığında, Helyum-4 ve Lityum-7 çekirdekleri meydana gelmektedir. Bu yüksek enerji yüklü parçacıklar, tümör hücresine tüm enerjilerini bırakırlar. Böylece, direkt DNA'ya zarar vererek hücrelerin yeniden çoğalmasına engel olurlar (Kamıda ve ark. 2007). Sodyum merkaptodekahidrododekaborat, sodyum merkaptaborat ($Na_2B_{12}H_{11}SH$), borokaptat (BSH) ve 4P dihidrosiborilfenilalanin (BPA) günümüzde BNCT yönteminde sıkça kullanılmaktadır (Yanagi ve ark. 2008). Son yıllarda yapılan bir çalışmada; boron fenil alanin aracılığı ile kötü huylu beyin tümörlerine BNCT uygulanmış ve başarı sağlandığı belirtilmiştir (Kankaanranta ve ark. 2011). Tıbbi fizikçiler, radyobiologlar, kimyagerler ve mühendisler tarafından çok disiplinli bir çalışmayla, tümör hücrelerine yönelik uygun bor bileşiklerinin ve nötron kaynaklarının seçilmesi araştırılmaktadır (Sauerwein ve Zurlub 2002).

İnsan oral skuamöz kanserinin BNCT'ye olan cevabının araştırıldığı bir çalışmada; BNCT'nin oral skuamöz kanseri üzerinde engelleyici etkisinin olduğu saptanmıştır. Çalışmada, kanserli hücelere gönderilen bor izotopunun hücre döngüsünü G_1 ve G_2 kontrol noktalarında durdurduğu ve böylelikle, hücreyi apoptoza götürdüğü belirtilmiştir (Kamıda ve ark. 2007).

Bor'un ^{10}B izotopu, ışınlar ile birlikte, insan melanoma hücre hattında kullanılmıştır. Yapılan bu *in vitro* çalışmada, bor iyonları ile birlikte yapılan radyoterapide çok güçlü etki gözlenmiştir (Meijer ve ark. 2005). BNCT birçok kanser tedavisinde araştırılmış ve kas (Andoh ve ark. 2011), kolon (Dagrosa ve ark. 2011) ve melanoma kanserleri (Kabalka ve ark. 2003) üzerine yapılan çalışmalarda, BNCT'nin etkili olduğu belirtilmiş ve olumlu sonuçlar gözlemlenmiştir.

1.2. Deneylerde Kullanılan Bor Bileşikleri

1.2.1. Borik asit

H_3BO_3 şeklinde gösterilen borik asit'in özgül ağırlığı 1.435 g/mol olup, molekül ağırlığı 61,84 ve erime noktası 170.9 °C dir (Zeki 1985). Borik asit suda zayıf bir çözünürlüğe sahiptir (5,5 g / 100 ml 25 °C). Sıcaklık artışı ile sudaki çözünbilme yeteneğinin arttığı belirtilmiştir (Parks ve Edwards 2005).

Borik asit'in birçok endüstri dalında sık kullanılan bir bileşik olduğu daha önceden de vurgulanmıştır (Zeki 1985). Serbest halde yeraltı su buharı kaynaklarında çözünmüş halde bulunabilir. Saf haldeki borik asit'in rengi beyaz, saydam, parlak ve altıgen şeklindedir (Parks ve Edwards 2005). Orta, meta ve tetra olmak üzere 3 tip borik asit olmasına karşın, ticari öneme sahip olan türü sadece orta borik asittir (Türkez 2007). Cam sanayi, Emaye ve sır yapımında, diş macunları, göz temizleyiciler gibi çeşitli alanlarda direkt olarak kullanılmaktadır (Jensen 2009).

Vücuda alındığında, oldukça hızlı bir şekilde emilmekte ve pasif difüzyon yolu ile vücutta yayılmakta ve idrar yolu ile atılmaktadır (Qureshi ve ark. 2001). Borik asit, kanser araştırmalarında kullanılmış ve prostat kanseri hücrelerinin proliferasyonunu durdurduğu belirtilmiştir (Barranco ve Eckhert 2004).

1.2.2. Sodyum perborat

Sodyum perborat, ilk kez 1898 yılında Tanatar tarafından bulunmuştur. Boraks ve NaOH içeren çözeltinin elektrolizi sonucu elde edilmiştir (Tanatar ve Ceperley 1898). Türkiye'de sodyum perborat, ETİBANK'ın sodyum perborat tesislerinde, ham madde olarak tinkal konsantresi, hidrojen peroksit ve sodyum hidroksit'ten üretilmektedir. $NaBO_3$ ile gösterilen sodyum perborat, beyaz renkli kolay kristanellenebilen bir tuzdur. Molekül ağırlığı 153,88 g/mol'dur. Sodyum perborat monohidratın kesin bir erime sıcaklığı bulunmamaktadır (Kocakuşak ve ark. 1998).

Aktif oksijen içeriği sebebi ile hızla çözünebilmekte ve deterjan başta olmak üzere, cam elyafı, tekstil ve kozmetik sektörlerinde kullanılmaktadır (Parks ve Edwards 2005).

2002 yılında yayınlanan araştırmada; sodyum perborat'ın aktif oksijen yeteneği sayesinde, deterjanlarda kullanıldığı fakat hiçbir mutajenite testinin yapılmadığı belirtilmiştir. Bunun üzerine, Salmonella suşları ve Chinese Hamster kobay hayvanları üzerinde ve *in vitro* ortamda yapılan çalışmalarda; sodyum perborat'ın, özellikle nokta mutasyonu olmak üzere mutajenite gösterdiği tespit edilmiştir (Seiler 1989).

1.2.3. Diamonyum tetraborat

Diamonyum tetraborat, $(\text{NH}_4)_2\text{B}_4\text{O}_7$ formülü ile gösterilmekte olup, molekül ağırlığı 263.37 g/mol, özgül ağırlığı 1.58 g/mol olarak belirlenmiştir. Kolayca suda çözünmektedir. Çözeltinin pH'sı 8,8'dir ve konsantrasyondan bağımsızdır. Bu bileşik oldukça kararsızdır (Janda 1981). Ağaç malzemelerin yanmaya karşı direncinin artırılması amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadır (Çolak 2005).

1.3.Kanser

1.3.1. Tanımı ve moleküler biyolojisi

Hücreler, bir birey gibi doğar büyür, işlevlerini yapar ve ekosistemin dengede kalmasını sağlamak için ölürler. Bütün bunları yapabilmek için, hücreler topluluk içinde yaşamaya ve kurallara uygun hareket etmeye göre kodlanmışlardır. Etraflarını çevreleyen sinyal yolları ile işlevlerini ve hayat döngülerini düzenlemektedirler. Çok hücreli canlı gruplarında; hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve canlılığının devamı gibi sistemler sürekli bir denge içerisinde gerçekleşir, fakat kanserli hücrelerde bu denge kaybolur (Ullah ve Aatif 2008).

Kanserin bu çağa ait bir hastalık olduğunu düşünmek yanlıştır. Kanser hakkındaki ilk bilgiler, Mısırda milattan önce 1600 yıllarında yazıldığı düşünülen, “Edwin Smith papirüsünde”, travma cerrahisinin anlatıldığı eski bir mısır ders kitabında

yeralmaktadır. İnsan mumyaları ve eski el yazmalarının incelenmesi sonucu, fosilleşmiş kemik tümörlerinin bulunduğu ortaya çıkmıştır. Mumyalardaki kemik kalıntıları, bunların kemik kanseri yani; osteosarcoma olduğunu düşündürmüştür (Boyle ve Levin 2008).

Hipokrat, vücut yüzeyinde büyüyen şişlikleri “*karkinos*” veya “*karkinoma*” olarak tanımlamış, Galen ise; o tarihlerde kadavra diseksiyonu yapamadıklarından, sadece yüzeysel olarak gözlemleyebildiği hastalığın görünümünü bir yengece ve ağrısında yengeç ısırığına benzettiği için, hastalığa “kanser” adını vermiştir. Türk tıp tarihinde ise; 1298 yılında Osman Hayri Efendi “*Kenzülsıhhatül Ebdaniye*” adlı eserinde kanserden “*seraten*” olarak bahsetmiştir (Atıcı 2007).

Kanser; dünya çapında AIDS, tüberkuloz ve sıtma hastalıklarından daha fazla ölüme sebebiyet vermektedir (Pappas 2009). Bilim ve Teknolojinin her geçen gün biraz daha ilerlemesi ile birlikte, kanser tedavi yöntemleri de devamlı bir şekilde gelişmektedir. Dünyada, tanısı konulan yaklaşık 12 milyon kanser hastasının % 45’i, ekonomik olarak gelişmiş ülkelerde bulunurken; % 55’i gelişmekte olan ülkelere (Irimie ve ark. 2010). Kansere çare aramak, tedavi olanaklarını daha etkin hale getirmek birçok araştırmanın başlıca hedeflerinden biri olmaktadır. Son zamanlarda, bazı batılı ülkelerde kanser ölüm oranlarının; sigara kullanımındaki azalma, erken tanı ve tedavi yöntemlerindeki gelişme sebebiyle azaldığı belirtilmiştir (Hooker ve ark. 2009).

Sağlıklı hücreleri kansere sevk eden bazı faktörler mevcuttur; kalıtsal mutasyonlar, hormonlar, bağışıklık sistemi hasarları iç faktörler olarak sıralanabilir. Dış faktörler ise; tütün, alkol kullanımı, kimyasal maddeler, radyasyon ve bulaşıcı hastalıklar örnek verilebilir (Irimie ve ark. 2010). Oluşan mutant hücreler, normalde sağlıklı hücrelerin büyümesi için gereken büyüme hormonlarına gerek duymadan ya da kendileri bu hormonları salgılayarak, sınırsız bir şekilde çoğalmaktadır (Gabriel ve ark. 2008). Kanser; temel mekanizmalarda ki kusurlar sonucu oluştuğundan, moleküler ve hücresel düzeyde araştırılması gereken bir hastalık türüdür (Korkmaz 2010). Kısaca kanser; onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyon sonucu oluşan devamında kanserli hücrelerin proliferasyonunu sağlayacak sinyal yolları geliştiren bir hastalıktır (Liu ve ark. 2010).

Kanserlerin vücudun diğer kısımlarına kontrolsüz bir şekilde yayılabilmek özelliklerinden dolayı, araştırılan tedavi yöntemlerinde kanserin tipi ve yayılma hızının belirlenmesi ve en uygun tedavinin uygulanması, tedavinin duyarlılığını artıracaktır. Bu yüzden kanser tedavilerinde kanserin hangi aşamada olduğunu bilmek oldukça önemlidir (Hooker ve ark. 2009).

Kanserli hücrelerin, içinde bulundukları hücre topluluğunun uyması gereken kuralların birçoğuna uymadığı bilinmektedir. Bu kural dışı durumlar incelenirken, aynı zamanda sağlıklı hücrelerin yaşam döngüleri hakkında da bilgi sahibi olunmuştur. Böylece, kanser araştırmaları; sadece hastalığın tanı ve tedavisi yönünde değil, hücre biyolojisi kapsamında da diğer birçok çalışmaya ışık tutmuştur (Alberts ve ark. 2002). Kanser, vücuttaki her çeşit hücre tipinden meydana gelebilir, bunun sonucu olarak, çok çeşitli karakter ve süreç izleyen kanser çeşitleri oluşmaktadır (Cutler ve ark. 2008).

Tümör; beraber yaşadığı hücrelerden daha hızlı çoğalıp normal sınırlara karşı gelerek, başka hücrelerin alanlarına girebilen doku kütesidir. Eğer bu kütle, komşu hücrelerden daha hızlı çoğalmayıp kendi içinde büyüyor ise; iyi huylu tümör olarak nitelendirilmektedir. İyi huylu tümörler, köken aldıkları yerden başka yere yayılmayan ve bu yüzden çevre dokulara zarar vermeyen tümör tipidir (Cutler ve ark. 2008). Eğer tümör yayılma özelliği kazanırsa ve komşu hücrelerinden daha hızlı büyürse; o zaman kötü huylu tümör olarak isimlendirilir. Kötü huylu tümör, hem çevre dokuya hem de dolaşım sistemi ile beraber vücudun diğer bölgelerine yayılıp orada hastalığa devam edebilirler ki kanserin bu aşamasına “metastaz” adı verilmektedir (Ullah ve Aatif 2008). Tümörler, kompleks bir mikroçevre içerisinde gelişmektedir. Bu mikroçevrede; fibroblastlar, endotel hücreleri, kan damarları, lenf damarları, bağışıklık hücreleri, sitokinler, kemokinler bulunmaktadır. Bu bileşenler, tümörün büyüme hızını, kapasitesini ve metastaza geçme durumunu etkilemektedir (Bindea ve ark. 2010).

İnsan kanser türlerinin birkaç temel çeşidi vardır. Bunların yaklaşık % 90’ını “karsinomalar”, yani, epitel hücrelerin malin hali oluşturur. Sarkomalar, bağ doku (kas, kemik ve kıkırdak gibi), yağ ve fibröz dokulardaki solid tümörlerdir. Lösemiler kan hücrelerinin, miyelomalar plazma hücrelerinin ve lenfomalar ise immün sistem hücrelerinin kötü huylu tümörleridir (Tüzel ve 2006).

Kanserin çok basamaklı bir mekanizmayla ilerlemesinin yanı sıra, genel olarak 3 aşama altında toplanmıştır. Bunlar; başlama, gelişme ve ilerleme aşamalarıdır. İlk aşamada; yani başlama evresinde, sağlıklı olan hücreler mutajenlerin etkileri sonucu, DNA mutasyonları oluşur. İkinci evrede; başlangıçtaki mutasyonlu hücreler büyüme faktörlerinin etkisiyle, tümör hücrelerine dönüşürler. En son aşamada; tümör hücreleri malin hale geçerler ise metastaz yapma kapasitesine sahip olurlar (Arı ve Kosova 2011, Olivera 2008).

1.3.2. Meme kanseri

Her yıl dünyada bir milyondan fazla kadına teşhis konulan meme kanserinin, % 90'dan fazlasının metastaz yaptığı bildirilmiştir (Jiang ve ark. 2005). Türkiye'de ise meme kanseri görülme oranı; son yıllarda üç kat artmıştır (Özmen 2010).

Meme kanseri, meme epitel hücrelerinde oluşan kötü tümörlere verilen genel bir isimdir (Sharma ve Srikant 1998). Kanserin genetik temeli DNA tamirindeki ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlardır. Meme kanserinde; apoptoz yollarındaki bozulmalar, *p53* mutasyonları, *Bcl-2* ailesi üyelerinin fonksiyon kayıpları gibi sebepler, kanserli hücreleri apoptoz'dan uzaklaştırmaktadır. Özellikle meme kanseri üzerine yapılan çalışmalar, çevresel ve genetik nedenlerden dolayı, kanser oluştuğunu göstermiştir. Meme kanseri; yaşlılık, aile geçmişi, östrojen tedavisi, geç yaşta anne olmak gibi birçok faktörün birlikte çalışması sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır (Geyer ve ark. 2009).

Yapılan çalışmalar sonucunda, *BRCA1* (Breast Cancer Susceptibility Gene 1) ve *BRCA2* (Breast Cancer Susceptibility Gene 2) genlerinin meme kanseri ile olan ilişkisi ortaya konmuş ve tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı bildirilmiştir (Moller ve ark. 2001). İlk kez 1990 yılında bulunan bu genler, 1994 yılında klonlanmıştır. Yapılan bir çalışmada *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinde mutasyon olan bireylerin hepsinde kanser oluştuğu gözlemlenmiştir (Zimmerman 2004). Bu genler, hücre döngüsü sırasında DNA tamir mekanizmaları ve apoptozda rol oynamaktadır. Bu genlerdeki olası mutasyonlar, meme ve yumurtalık kanserleri oluşumuna sebebiyet vermektedir.

1.3.3. Akciğer kanseri

Akciğer kanseri, yirminci yüzyılın başına kadar az rastlanan bir hastalık olmasına rağmen, günümüzde hızlı bir şekilde artmakta ve dünya çapında kanser kaynaklı ölümlerin en önemli nedenini oluşturmaktadır. Akciğer kanseri, her yıl erkeklerde % 88, kadınlarda ise % 84 oranında ölümle sonuçlanmaktadır (Bertero ve ark. 2008). Kemoterapi, ışın tedavisi, cerrahi tedavi gibi günümüzdeki son teknoloji tedavilerine rağmen, akciğer kanserli hastaların sağ kalım oranının en fazla 5 yıl olduğu belirtilmiştir. Bunun en büyük nedeni, hastalığın ancak ileri evredeyken farkedilmesi ve eksik tedavi sonrasında hastalığın tekrar etme sıklığıdır (Cutler ve ark. 2008).

Akciğer kanseri, çok yüksek oranla çevresel ve davranışsal etkilerin sonucu oluşmaktadır. Bunların başında, tütün kullanımı ve havadaki asbest parçacıklarının alımı gelmektedir. Sigara kullananların akciğer kanserine yakalanma riski, kullanmayanlara oranla on kat fazladır (Raleigh 2010).

Akciğer kanseri, kendi içinde 2 tipe ayrılmaktadır. Bunlar; tüm akciğer kanserlerinin % 20'sini kapsayan, küçük hücreli akciğer kanseri (KHAK) ve tüm akciğer kanserlerinin % 80'ini kapsayan, küçük hücreli olmayan akciğer kanseridir (KHOAK) (Yıldırımcan 2006). Küçük hücreli akciğer kanseri, hastalığın hızlı yayılma potansiyeli sayesinde, hastaların beş yıl yaşama oranı % 1'den azdır. Küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde ise; kendi arasında % 25 oran ile yassı epitel karsinoma, % 30 ile adenokarsinoma ve % 15 ile büyük hücreli karsinoma olmak üzere 3 gruba ayrılır. Ülkemizde en sık rastlanan tip, yassı epitel karsinomadır ve metastaz olasılığı diğer iki grup arasında en az olandır (Yurdakul ve ark.2002).

Yapılan incelemeler sonucu, *p53* gen fonksiyonundaki bozukluk küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde % 50, küçük hücreli akciğer kanserinde ise % 90 oranında gözlenmiştir. Akciğer kanseri hakkında özellikle son zamanlarda yapılan araştırmalarda, sigara bileşenlerinden olan benzo[a]pyrenediopoxide (BPDE) maddesinin, direk olarak *p53* geninde nokta mutasyonuna sebep olduğu rapor edilmiştir (Baylin ve ark.1999).

1.4. Apoptoz

Apoptoz terimi; ilk defa Kerr, Wylie ve Currie tarafından 1972 yılında, hücre ölümünün morfolojik olarak tanımlanmasında kullanılmıştır (Elmore 2007). Eski Yunanca'da "sonbahardaki yaprak dökümü" anlamına gelmektedir (Cohen 1993). Bunun yanında; çok daha uzun zaman öncesinden beri apoptoz kavramı bilinmekteydi. Örnek olarak; radyobiologlar, apoptozun radyasyona karşı hücresel bir cevap olduğunu belirtmişler, fakat bunu farklı bir terminolojide kullanmışlardır. Onlar bu duruma "*interfaz ölüm*" adını vermişlerdir (Meyn ve ark. 2008).

Hücresinin büyümesi ve ölümü arasındaki düzeni sağlayan en önemli süreç, programlı hücre ölümüdür (programmed cell death; PCD). PCD'nin iki formu bulunmaktadır, bunlar; apoptoz ve otofajdır. Apoptotik hücre ölümü (tip 1 PCD), hücrenin büzülmesi, hücre zarının tomurcuklanması, apoptotik veziküllere ayrılması ve sonuç olarak etraftaki hücreler veya fagositler tarafından parçalanması ile oluşur. Otofaj (tip 2 PCD) ise; hücre içinde zarar görmüş organel ve önemli proteinlerin lizozomlarda parçalanması temeline dayanır. Apoptoz ve otofaj farklı morfolojik özellikler ve fizyolojik süreçler barındırmalarına rağmen aralarında karmaşık bir işbirliği olduğu belirtilmiştir (Liu ve ark. 2010, Bonafé ve ark. 2009).

Yaşam döngüsüne bakıldığında, hep bir denge karşımıza çıkmaktadır. Temel unsurlar olan doğma, büyüme, üreme, yaşlanma ve ölüm, daima organizmanın yapısının belirlediği sınırlar içerisinde, bir dengede korunmaya çalışılır (Liu ve ark. 2010). Apoptoz; yaşlanma ve homeostaz mekanizmasının devamlılığı boyunca hücre popülasyonunu korumak için oluşmaktadır (Elmore 2007). Yüksek yapıli canlıların hücreleri çok iyi örgütlenmiş bir topluluğun üyeleri gibidirler ve bu topluluktaki hücre sayıları sıkıca düzenlenmektedir. Hücre çoğalması mitoz ile belirlenmekte, belli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptoz ile sınırlanmaktadır. Böylece, apoptoz ve mitoz sağlıklı dokuda sürekli denge halinde bulunmaktadır (Elegbede 2003).

Apoptoz; normal dokuların yeniden üretimini ve uygun bir şekilde geliştirilebilmesini sağlayan, anormal hücrelere karşı immün yanıtı üreten ve onların tahrip edilmesini sağlayan önemli bir hücresel süreçtir. Bunun yanı sıra; sağlıklı hücrelerde apoptoz, bazı fizyolojik koşullar altında da uyarılabilir. Örneğin; fetüsde,

doku ve organ gelişimi sırasında, menstrual siklus boyunca uterus duvarındaki endotel hücrelerinin atılmasında, ya da emzirme dönemi sonrasında meme kanallarının geri çekilmesinde, hücreler apoptoza yönelmektedir. Viral enfeksiyonlar, DNA hasarları ve diğer genomik değişiklikler de hücrenin apoptozu ile sonuçlanmaktadır (Yang 2005).

Apoptoz; hücrenin yaşam veya ölüm seçeneğini belirleme yeteneğinden dolayı, hastalıkların tedavisi için çok iyi bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu nedenle, araştırmalar hücre döngüsü ve sinyal yolları üzerine odaklanmaktadır (Mignotte ve Vayssiere 1998). Son yıllarda, apoptozla ilgili çalışmaların artmasıyla, apoptoz sinyal yolağında görev alan birçok hücresel faktör tanımlanmıştır. İnsan kanserleri üzerinde yapılan birçok çalışmada, kanserli hücre ve dokuların apoptoz sinyal yollarında düzensizlikler görülmüştür (Karna ve ark. 2006).

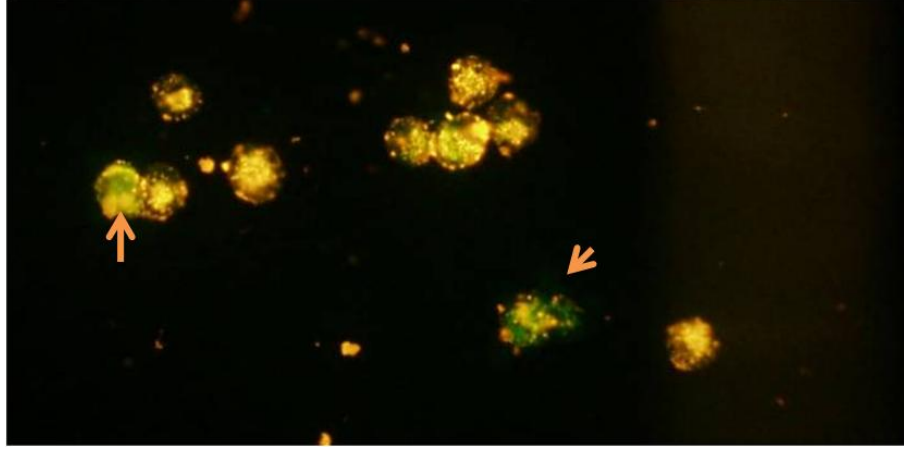
Gelişmiş organizmalarda, apoptoz ve nekroz iki önemli hücre ölüm mekanizmasıdır. Nekroz, hücrenin düzeltilemeyecek kadar büyük bir hasar alması sonucunda, apoptozdan farklı olarak kontrolsüz bir biçimde ölmesi demektir (Zivny 2010). Apoptozun gerçekleşebilmesi için yüksek ATP seviyelerine ihtiyaç vardır. Hücre içindeki ATP seviyesi, hücrenin apoptoza ya da nekroza yönelmesini belirler. Bu nedenle, apoptozun erken fazında mitokondri çok önemlidir. Hücre ciddi biçimde zarar gördüğünde, apoptoz için gerekli olan enerjiyi sağlayamayacak durumda ise nekroza yönelecektir. Apoptozun nekrozdan farkı, nekrozun enerji gerektirmeyen bir süreç olmasıdır (Bennets ve Pierce 2010).

Hücrede apoptoza özgü olarak bazı morfolojik değişiklikler görülmektedir.

Bunlar:

- Kromatin yoğunlaşması ve çekirdek zarına tutunması
- DNA'nın merdivenleşmesi. Bu durum, agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü "ladder patern" olarak ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (Walker ve ark. 1999).
- Hücre iskeletinin yıkılması ile birlikte sitoplazmanın büzülmesi
- Plazma ve çekirdek zarının tomurcuklanması
- Hücre içeriklerinde herhangi bir sızıntı olmadan, fagositoz ile komşu hücrelerini yutabilmesi için, zarla çevrili paketçikler haline gelmesi. Bu sayede, ölen hücrenin içeriği serbest kalmaz ve organik bileşenleri komşu hücreler tarafından

yeniden kullanılabilir (Liu ve ark. 2006). Şekil 1.2’de apoptozlu hücreler gösterilmiştir.



Şekil 1.2. A549 hücrelerine 5 mM sodyum perborat’ın apoptotik etkisinin mitocapture yöntemiyle araştırılması (Floresan mikroskop, rodamin filtresiyle fotoğraflanmıştır. Ok’lar apoptotik hücreleri göstermektedir, X 400).

Apoptozun moleküler mekanizması, kısaca 4 farklı fazdan oluşan biyokimyasal olaylar dizisidir. Bunlar; sinyal, kontrol- düzenleme, yürütme ve son olarak ölen hücrenin ortadan kaldırılmasıdır (Bennets ve Pierce 2010). Sinyal fazında, apoptotik süreci, uyaran bileşenler; glikokortikoid, toksin, nitrit oksit vb. olabileceği gibi, besin yokluğu, viral enfeksiyon, iyonize radyasyon gibi durumlar da başlatabilir (Chen ve ark.2009). İkinci aşama olan kontrol ve düzenleme fazında; hücre apoptoza devam etmek ya da süreci durdurmak arasında karar verir. Burada *p53* ve *Bcl-2* genleri görev yapmaktadır. Apoptoza karar verildiği zaman, hücre yürütme aşamasına devam eder. Proteolitik kaspazlar tarafından hücrenin matriks ve organelleri düzenli bir şekilde tahrip edilir. Yürütme aşamasının ardından, son aşama olan hücre veziküllerinin kaldırılması başlamaktadır. Burada hücre artık küçük veziküllerine ayrılmış haldedir ve etrafa kendisini yemesi için sinyaller göndermektedir (Bennets ve Pierce 2010).

1.4.1. Apoptoz Yolakları

Hücrenin apoptoza girebilmesi için bir uyarıcı sinyalin hücreyi uyarması gerekmektedir. Memeli hücrelerinde apoptoz 2 farklı yolak ile oluşmaktadır (Liu ve ark.

2010). Hücrenin içinden gelen uyarıları belirtmek amacıyla; iç yolak (mitokondri bağımlı yolak) ve uyarının hücrenin dışından geldiğini belirtmek amacıyla; dış yolak (reseptör bağımlı yolak) adı verilen iki ana yol bulunmaktadır (Raychaudhuri 2010). İki yolak da kaspaz aktivasyonu ile tamamlanmaktadır ve birçok hücre tipinde tamamen birbirinden bağımsız olarak ilerlemektedir (Chen ve ark. 2009).

Hücreyi apoptoza götüren çeşitli uyarılar mevcuttur. Dışarıdan gelen uyarılar; tümör nekroz faktörü (Tumor Necrosis Factor; TNF), hücre ölüm proteinleri, insülin benzeri büyüme faktörleri, glukokortikoidler, ilaçlar, radyasyon, çeşitli antijen ve virüslerdir. Hücre içinden gelen uyarılar ise; hücre içindeki Ca^{+2} miktarındaki artış, DNA’da oluşan düzeltilemeyecek bir hasar sonucu P53 geninin aktive olması, viral ve bakteriyel enfeksiyonlar ile onkojenlerdir (Fulda 2011). Bu iki yolak birçok hücre tipinde birbirinden bağımsız olarak devam etmesine karşın, aralarında etkileşimler söz konusudur (Burz ve ark. 2009).

1.4.1.1. İç yolak

Mitokondri ölüm sinyalinin oluşması için merkezi bir rol oynar (Bonafı ve ark. 2009). Mitokondri dış ve iç zarları arasında kalan boşluğa “intermembran alanı” denir. Bu boşlukta hücre ölümünü başlatan birçok protein yer alır. Bunlardan; sitokrom C, apoptoz tetikleme faktörüdür (apoptosis inducing factor; AIF). Mitokondri zar potansiyeli, iç ve dış zarındaki protonların asimetric dağılımıyla oluşur ve böylece, mitokondriyal fonksiyonların sağlanması için gerekli olan elektriksel ve kimyasal bir gradient oluşur (Watters 2005).

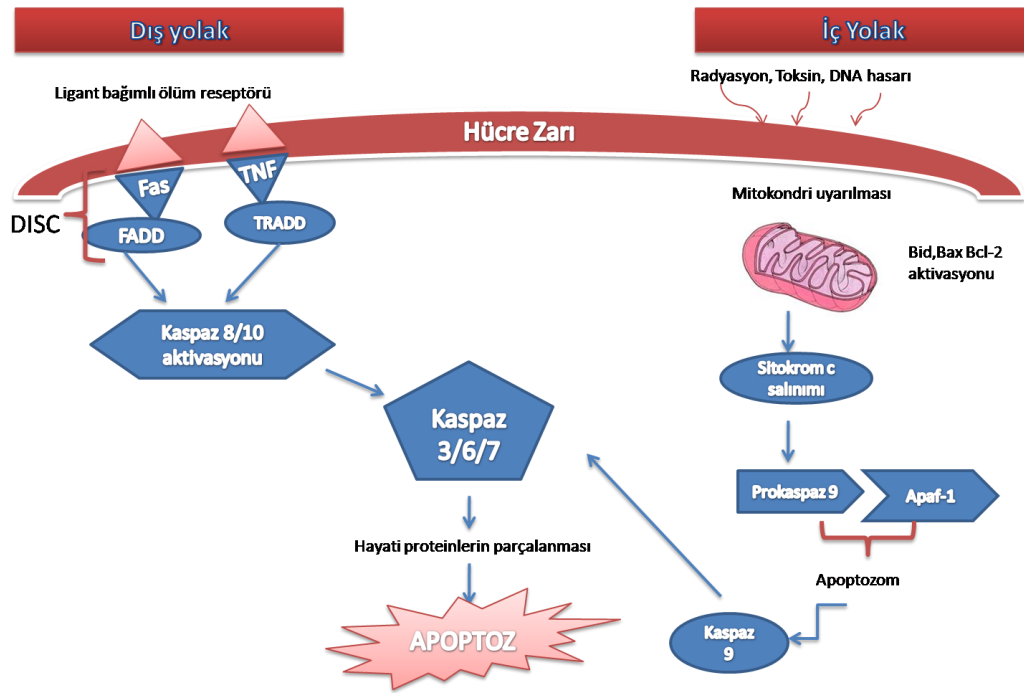
Ölüm sinyalleri, mitokondrinin zar bütünlüğü üzerinde etki göstermektedir (Hockenbery ve ark. 1990). Sinyaller *Bcl-2* ailesinin üyeleri olan; bid, bam, bax, puma ve noxa tarafından mitokondriye taşınmaktadır (Chen ve ark. 2010). Bu ailelerin üyelerinin nasıl bir yol izlediği tam olarak açıklanamamakla birlikte, iki teori ortaya atılmıştır. Bunlardan biri; bim, bax’a bağlanır ve ikisi birlikte bak’ı aktive eder. Diğer teori ise, antiapoptotik olan *Bcl-2* üyeleri dolaylı olarak bim ve bak’ı aktive eder (Fulda 2011). Sonuç olarak; mitokondri zarının geçirgenliği, oluşan porlar sayesinde artar (Yang 2005), mitokondriden sitokrom C salınmaya başlar (Bennets 2010).

Mitokondrinin aktivasyonu, (sitokrom C'nin mitokondriden sitoplâzmaya salıverilmesi) apoptotik süreçte geri dönüşümsüz noktaya gelindiğini gösterir. Oluşan sitokrom C; apaf-1 (apoptosis proteas activating factor) ve pro-kaspaz 9'a bağlanarak "apoptozom" adı verilen kompleksin oluşumunu sağlamaktadır (Alosi ve ark. 2010). Apoptozom; apaf-1, Sitokrom c, ATP ve pro kaspaz 9'dan oluşmaktadır (Hockenbery ve ark. 1990). Bu kompleks, inaktif haldeki kaspaz 9'u aktif hale getirmiş olur. Aktifleşen kaspaz 9 ise kaspaz 3 ve 7'yi aktivite eder. Kaspaz 3'ün aktivasyonu, DNA oligonükleozomal parçalarına ayrılır ve aktin, plektin gibi hücre şeklinde görev alan proteinlerin sindirilmesini sağlar. Bu değişiklikler çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve hücrenin küçülmesine, ayrıca hücre zarının tomurcuklanmasına yol açar. Oluşan apoptotik veziküller, etraftaki hücelere kendilerini yutmaları için sinyal gönderirler. Sinyali alan hücreler apoptotik vezikülleri yutarlar (Burz ve ark. 2009).

1.4.1.2. Dış yolak

Dış yolak; hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerine ilgili ligandların bağlanması ve etkileşimi sonucu, ölüm sinyalinin hücre içerisine iletilmesi ve apoptozun başlaması prensibine dayanır (Yang 2005). Ekstrasellüler hormonlar, TNF, Fasligand (FasL) ve tümör nekroz faktör ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TNF-related apoptosis-inducing ligand; TRAIL); apoptozu başlatan sinyallere örnek olarak verilebilir. Bu ölüm sinyalleri hücre yüzeyinde bulunan tümör nekroz faktör reseptör 1 (TNF receptor 1; TNFR1) ve Fas gibi reseptörler tarafından tanınarak aktive edilmekte (Liu 2006) ve algılanan "ölüm sinyali" hücre zarı boyunca iletilmektedir. Hücre yüzey reseptörüne ligandlarının bağlanmasıyla apoptoz başlamaktadır (Bennets ve ark. 2010). Alınan ölüm uyarısı ile bir dizi protein-protein etkileşimi gerçekleşmeye başlamaktadır (Gewies2003). Öncelikle Fas reseptörü, sitoplâzmanın iç tarafında bulunan ölüm reseptör bölgesi (Fas-associated death domain; FADD) ile TNFR1 ise kendi ölüm bölgesi olan TRADD ile etkileşime girmekte ve böylelikle sinyal kompleksi oluşmaktadır. Bu oluşan komplekse "ölüm tetikleyen sinyal kompleksi" (death-inducing signaling complex; DISC) adı verilmektedir (Bonafe ve ark. 2009). Oluşan kompleks prokaspaz 8 i uyarmaktadır. Aynı iç yolaktaki gibi, aktif hale gelen kaspaz 8, kaspaz

3'ü uyarmakta ve kaspaz şelalesi başlamaktadır (Lavrik 2011). Kaspazlar hücrede önceden tanımlanmış moleküllerin parçalanmasıyla saldırarak biyolojik ve morfolojik apoptoz değişikliklerine yol açmaktadırlar. Sonuçta; sitoplâzma yapısal proteinlerin sindirimi ve kromozomal DNA'nın parçalanmasıyla hücre fagosit edilmektedir(Srinivasan ve ark. 1998).



Şekil 1.3. Apoptoz Yolakları anlatımı (Rudin 1998 ve Srinivasan 1997'den uyarlanılarak yapılmıştır.)

1.4.2. Apoptoz'un düzenlenmesinde görev alan moleküler düzenleyiciler

Apoptoz sırasında, iç ve dış yollarda birçok farklı protein görev almaktadır. Bunlar; dış yolda görev alan Fas ve Fas ligand, TRAIL ve TNF- α , kaspazlar, bcl-2 protein ailesi, p53 ve NF κ B örnek olarak verilebilir (Cecconive ark. 2004).

1.4.2.1. Kaspazlar

Apoptozda görev alan önemli mekanizmalardan birisi de büyük bir proteaz ailesi olan kaspazlardır. Kaspaz denmesinin sebebi, aktif merkezlerinde sistein

aminoasiti bulundurmaları; hedeflerindeki proteinlerin aspartik asit kısımlarından parçalamalarıdır (C-asp-ase) (Mignotte, 1998). Kaspazlar, hedef proteinlerdeki aspartik asit'in karboksil gruplarının peptit kısımlarını kesebilen nükleofilik bir bölgeye sahiptirler (Hawkins ve ark. 2005). Normal şartlarda; kaspazlar hücre içinde zimojen halde bulunmakta ve prokaspaz adını almaktadır. Tam bir fonksiyon gösterebilmeleri için, aldıkları sinyal sayesinde aktifleşmeleri gerekmekte ve kendinden sonraki prokaspazları kesime uğratarak, bir proteolizis silsilesinin oluşmasını sağlamaktadırlar (Faust ve ark. 2009).

Günümüzde tanımlanmış 14 adet kaspaz çeşidi vardır Bilinen 7 tanesi apoptozda görev almakta 3 tanesi de sitokinlerin aktifleşip savunma sisteminde görev almasını sağlamaktadır (Salve ve ark. 2009).

Kaspazlar; yapılarına, fonksiyonlarına ve substrat yüzeylerine göre farklı sınıflandırılırlar (Hawkins ve ark. 2005). Memelilerde, fonksiyonlarına göre sınıflandırılan kaspazlar; başlatıcı; (-2, -8, -9, -10, -12) ve efektör; (-3, -6, -7, -14) olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadırlar (Salve ve ark. 2009). Başlatıcı kaspazlar; apoptozda ilk sinyali alıp efektör kaspazlara ulaştırırlar. Efektör kaspazları, proteoliz yoluyla direk ya da ikincil habercileri kullanarak dolaylı olarak da aktifleştirebilirler (Hung ve Chow 2004). Başlatıcı kaspazların üç özelliği çok önemlidir; gelen uyarıların sonlandırıcı faza taşınması, yeterli miktarda sonlandırıcı kaspazın aktifleşmesini sağlanmasıyla apoptotik sinyalin çoğalması ve apoptozun en son basamağında bir kontrol noktasının bulunmasıdır (Tang ve ark.2000).

Bütün kaspaz enzimlerinin kendilerine göre en iyi kestikleri bir bölge vardır. Bu bölge, aspartik kesim noktasının N-terminalinde bulunur ve kaspazın hedefinin seçilmesini sağlayan dört aminoasitlik bir kısımdır (Schulze-Osthoff1998).

1.4.2.2. *Fas* ve *FasL*

TNF ailesinin fazla miktarda ifade edilen ve transmembran protein olan bir üyesidir. *Fas* ve *FasL*'nin ifadesi arttırılarak apoptotik yolun uyarılmasıyla, bu mekanizma kansere karşı tedavide kullanılabilmektedir. *Fas* ve *FasL* birleştiğinde, apoptozu başlatmasına rağmen, yapılan çalışmalarda sadece birkaç tümör çeşidinde *Fas*

yoluyla apoptoza rastlanmıştır. Sebep olarak insan kanser türlerinin *Fas* bağımlı apoptozise bir direnç geliştirdiği belirtilmiştir (Liu ve ark. 2010). Yapılan bir çalışmada meme kanserinin erken safhasında olan hastalarda, *Fas* ifadesinin sağlıklı kişilere oranla oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir (Jaberipour ve ark. 2010).

1.4.2.3. *TRAIL* ve *TRAIL* reseptörleri

TNF ailesinin diğer bir üyesi olan *TRAIL*; kanser tedavisinde önemli bir yere sahiptir, çünkü tümör hücrelerinin *TRAIL*'e sağlıklı hücrelerden daha duyarlı olduğu bilinmektedir (Burz ve ark. 2009). *TRAIL*'in *DR4* ve *DR5* olmak üzere iki adet reseptörü bulunmaktadır. Dış yolağı kullanarak apoptozu başlatmaktadırlar (Bennets ve ark. 2010).

1.4.2.4. *TNF- α*

Akciğer ve karaciğer yetmezliği, hipotansiyon ateş gibi durumlarda, *TNF- α* lar; makrofaj ve monositler sayesinde sitokin üretmektedir. *TNF- α* , hücre yüzeyinde *TNFR-1* ve *TNFR-2* ile bağlıdır. Aktif hale gelen bu reseptörler, daha sonra adaptör protein olarak TRADD'ı düzenleyerek ölüm proteini DISC'e dönüştürmekte ve prokaspaz 8'i parçalayarak aktif kaspaz 8'e dönüştürmektedir (Camaş 2006).

1.4.2.5. *Bcl-2* Ailesi:

Bcl-2 ailesinin proteinleri mitokondri zar potansiyelini korumaktadır (Wilson 2009). Herhangi bir ölüm sinyali olmadığı zaman, hücre içinde sessiz halde bulunan *Bcl-2* proteinleri, hücre stres halindeyken aktive olup mitokondri yüzeyine bağlanmaktadır. Mitokondrinin zar geçirgenliğini azaltarak sitokrom C'nin mitokondrinin dışarı salınımını sağlamaktadırlar. (Fulda 2011).

Bcl-2 ailesi üyeleri, pro apoptotik ve anti apoptotik olarak iki gruba ayrılırlar. *Bcl-2* ailesinde yaklaşık 20 adet protein tespit edilmiştir. Pro apoptotik olanlardan bazıları; Bcl-w, MCL-1, Bad, Bax, Bid, Bim, Bak, Bcl-xl iken anti apoptotik olanlar

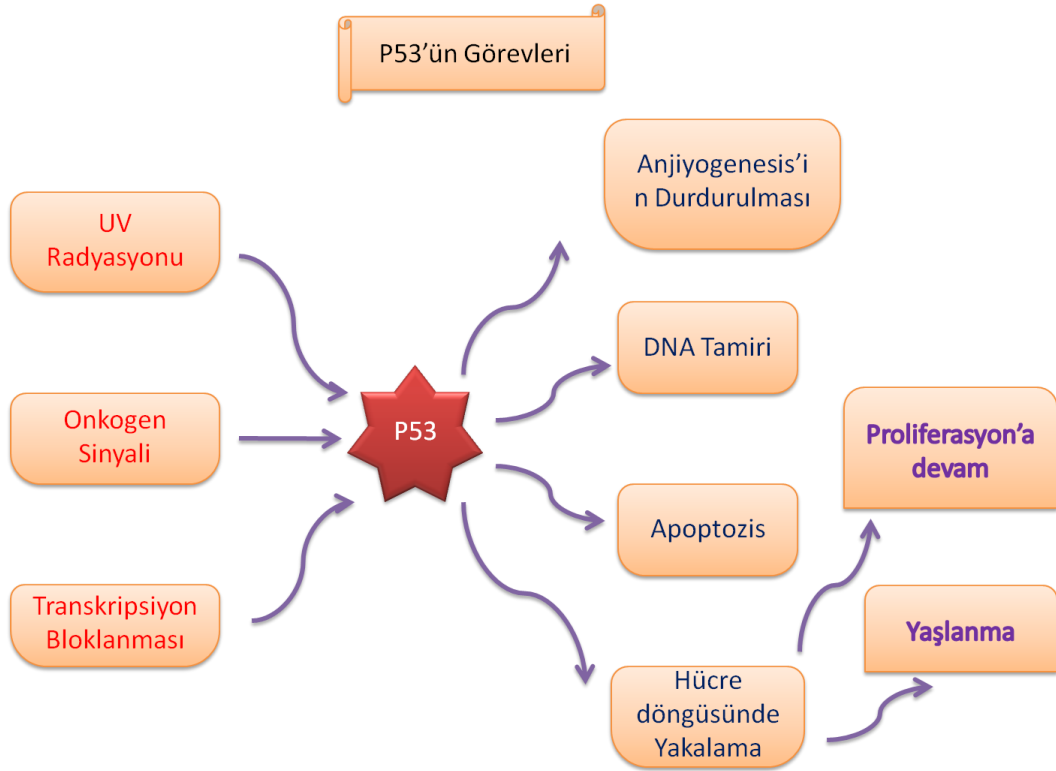
yani apoptoz inhibe edenlerin bazıları ise; *Bcl-2* ve *Bcl-x1*'dir (Cecconi 2010, Karna 2006).

Pro apoptotik üyeler, anti apoptotiklere bağlanarak apoptozu aktive etmektedirler. Bu bilgilerin ışığında, *Bcl-2* üyeleri arasındaki dengenin, hücrenin ölümünde büyük önem taşıdığı söylenmektedir. Anti apoptotik üyelerin aşırı ifadesinde apoptoz yavaşlarken, pro apoptotik üyelerin fazla olduğu zamanlarda hücreler ölüme sürüklenmektedirler (Karna ve ark. 2009). Anti apoptotik *Bcl-2* üyelerinin aşırı ifadesi sayesinde; kemoterapotik ilaçlar, radyasyon ya da *FasL* ve *TNF- α* etkisiyle uyarılan apoptoz inhibe edilmektedir (Cecconi ve ark. 2010).

1.4.2.6. p53

p53 proteinin bilinen görevleri arasında; genetik onarım, rekombinasyon, metabolik süreçlerin düzenlenmesi bulunmaktadır (Lane ve Levine 2010). *p53*, birçok farklı yolla tümör büyümesini engelleyebilir. Şekil 1.4.'te gösterildiği üzere, hücrede radyasyon, kemoterapi vb. şekilde herhangi bir DNA hasarı oluştuğunda, hasar onarılabilecek düzeyde ise; *p53*, hücre döngüsünü G_1 fazında durdurur ve hücreye DNA'sını tamir edebilmesi için zaman kazandırır. Eğer DNA hasarı tamir edilemeyecek kadar büyükse, bu durumda *p53*, apoptozu uyarır (Elmore 2007). *p53* proteini, kansere karşı korunmada büyük önem taşımaktadır. İnsan tümörlerinde *p53* geni mutasyonuna sık rastlanır. *p53* geninde herhangi bir mutasyon ve fonksiyon kaybı, oluşacak proteininde mutasyonlu olmasına yol açmaktadır. Burda tümör gelişimine veya apoptoza direnç ile sonuçlanmaktadır (Meulmeester ve Jochemsen 2008). Örnek olarak; tümör hücrelerinde ölüm reseptörü *Fas*'ın uyarılmasıyla, DNA da hasar oluşabilir veya kemoterapotik ilaçlar, *p53* gen ifadesini artırabilir (Yang 2005).

p53 proteini aynı zamanda G_2 kontrol noktasında da görev almaktadır. DNA'nın yanlış sentezlendiği durumlarda, *p53* geni G_2 kontrol noktasında ilgili yere bağlanır ve pro-onkogenin transkripsiyonunu önler (Meulmeester ve Jochemsen 2008).



Şekil 1.4. *p53* geni görevleri

1.5. Apoptoz Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

1.5.1. Mitokondriyal aktiveye dayalı MTT ölçümü

Kültürdeki hücrelerin canlılık oranlarını belirlemek için, 1983 yılında Mosmann tarafından bulunan, sonra Alley ve ark. tarafından geliştirilen; MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] yöntemi günümüzde çok kullanılan bir yöntem olmuştur (Sgonc ve Gruber 1998).

Bu yöntemde, bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı, kalorimetrik bir yöntemle hızlı ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Yöntem sağlıklı hücrelerde, mitokondrideki dehidrogenaz enziminin MTT boyasındaki tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır (Yaka ve ark. 2006). Doğrudan dehidrogenaz aktivitesini ölçmektedir. Çoğalan hücreler proliferasyon gösteren hücrelerden metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için, bu yöntem sadece hücre canlılığı ve sitotoksite değil, hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da belirler (Florin ve ark. 1999).

Deneyin önemli avantajları arasında hızlı, oldukça duyarlı ve radyoizotoplara gerek bırakmaması sayılabilir (Mosmann 1983). Bu yöntem, hücrelerin MTT boyasıyla inkübasyonu, genel olarak reaksiyon ürününün çözünür hale getirilmesi ve reaksiyon ürününün kolorimetrik olarak ölçümü basamaklarından oluşmaktadır.

MTT boyası, yaşayan hücrelerin mitokondriyal enzimi olan süksinat dehidrogenaz enzimine direk olarak bağlanmaktadır. Dehidrogenazlar genellikle enerji yapımı için kullanıldığından dolayı mitokondride bol miktarda bulunmaktadır. Kısaca MTT tekniğinin mitokondriyal enzim sistemleri tarafından kataliz edilen tetrazolyum tuzlarının indirgenmesi denilebilir (Florian ve ark. 1999). Tetrazolyum halkasının parçalanması sonucu, soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi mor formazan kristallerine dönüşmektedir. Sonuç olarak; canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise, boyanmamaktadır. Oluşan formazan kristalleri; dimetil sülfoksit (DMSO), izopropanol gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünmektedir. Çözünmüş olan bu boya, konsantrasyona bağlı olarak, spektrofotometrik yöntemle, görünür dalga boylarında ölçülebilen bir absorbanı vermektedir. Bulunan miktar, direk olarak canlı hücrelerin oranını göstermektedir (Ciofani ve ark. 2010).

1.5.2. Lizozomal aktiviteye dayalı nötral-kırmızısı alımı testi

Borenfreund ve Puerner tarafından yayımlanan katyonik boyanın canlı hücrelerde lizozomlar tarafından hücre içine alınması ve orada birikmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Nötral kırmızısı alımı testi (Neutral Red; NR) *İn vitro* hücre kültürü çalışmalarının başlangıcında viral sitogenetik değerlendirme ve immünotoksisite testleri için geliştirilmiş bir hücre canlılığı testidir (Repetto ve Zurita 2008).

Kolorimetrik bir yöntem olan nötral kırmızısı alımı testinde, katyonik bir boya olan nötral kırmızısı (3-amino-7-dimetilamino-2-metil fenozin hidroklorid) canlı hücrelerce alınır ve lizozomlardan birikerek elektrostatik olarak lizozomal matrisdeki anyonik bölgelere bağlanır (Zhang ve ark.2011). Nötral kırmızısı boyası suda rahatlıkla çözünmektedir. Hücre içine boyanın girmesi, plazma zarından pasif taşıma ile olmaktadır. Lizozom içinde nötral kırmızısının birikmesi lizozomal matris içinde

oluşmaktadır. Hücre yüzeyinde veya hassas lizozomal zardaki hasar, nötral kırmızısının alımını ve bağlanmasını azaltarak canlı hücrelerle hasarlı hücreleri birbirinden ayırmayı mümkün kılmaktadır. Hasarlı hücrelerde sitoplazmik vakuollerde nötral kırmızısı alıkonamaz. Deneyin temeli hasarlı ve sağlıklı hücreler arasındaki bu durum farkına dayanmaktadır (Faust ve ark. 2009).

Nötral kırmızısı boyası, canlı hücrelerin lizozomlarında birikmektedir. Nötral kırmızısı alımı yöntemi, oldukça basit, güvenilir ve diğer pahalı deneylerin yerini alabilecek nitelikte bir test yöntemidir (Olejniczak 2007). Ayrıca diğer deneyler ile kombine edilebilmekte ve hücrelerin metabolik aktiviteleri farklı düzeylerde tespit edilebilmektedir (Cantürk 2007).

1.5.3. Mitokondri zar geçirgenliği testi ile apoptoz tayini

Mitokondriyal transmembran potansiyel kaybı, apoptozun belirlenmesindeki önemli olaylardan bir tanesidir. Hücrenin apoptoza girebilmesi için birçok ajan ve uyarıcı bulunmasına rağmen büyük çoğunlukla Bcl-2 ailesinin bazı üyeleri (Bax ve Bak) aracılığıyla mitokondriden sitokrom C salıverilimini başlatırlar (Abramov ve Duchon 2008). Ardından mitokondri transmembran potansiyel kaybı başlamış olur. Test maddesinde ki floresan boya sağlıklı hücrelerde mitokondrinin içine girerek orada birikmekte ve floresan ışığı altında parlak kırmızı bir renk almaktadır. Öte yandan; apoptotik hücrelerde mitokondriyal transmembran potansiyeli bozuk olduğundan ve verilen boya mitokondri içinde birikemediğinden, sitoplazma içinde monomer halinde kalarak parlak yeşil görünmektedir. Oluşan floresan sinyaller sayesinde hücreler floresan mikroskobu altında FITC veya rhodamine filtreleriyle incelenmektedir (Heiden ve ark. 1997).

1.5.4. Kaspaz 3 / 8 aktivasyonu ile apoptoz tayini

Kaspazların zimojen halinden proteolitik olarak aktif hale geçmesinin ölçülmesine dayanır. Sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 metoduyla belirlenebilir (Ho ve Hawkins 2005). Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin

bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekmektedir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu method ile tespit edilebilirler (Güleş ve Eren 2008).

1.5.5. Agaroz jel elektroforezi ile apoptoz tayini

DNA kırıklarının gösterilmesi prensibine dayanan agaroz jel elektroforezi; apoptozda DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan yani internükleozomal bölgelerden kırılır ve merdiven görüntüsü oluştururlar. Görüntüye “Ladder Pattern” adı verilir (Jaⁿ nicke 1998). Aktif kaspaz-3, kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir ve bu durum apoptozun karakteristik özelliğidir ve nekrozda görülmemektedir sonuçta kromatin yoğunlaşmasına ve DNA fragmentasyonuna neden olur (Ulukaya 2003).

1.5.6. Apoptozun morfolojik olarak belirlenmesi

Apoptoz süresince birçok morfolojik olay oluşmaktadır. Bunlardan bazıları; hücrelerin büzüşmesi, sitoplazma ve DNA'da kromatin yoğunlaşması ve apoptotik keseciklerin oluşmasıdır. Bütün bu morfolojik olaylar mikroskop altında incelenebilmektedir (Sgnoc ve Gruber 1998). Bunun yanında florasen mikroskopu sayesinde; DNA'ya tutunabilen bazı florasen boyalar ile hücrelerin sağlık durumları daha rahat bir şekilde incelenebilmektedir. Dapi, Hoecsht, Akridin oranj, ethidyum bromür gibi boyalar DNA'ya bağlanıp hücrelerin kromatinlerini görünür hale getirmektedirler. Böylece; canlı ve ölü hücrelere ayrı ayrı bağlanarak hücrelerin canlılıklarını da belirlemiş olurlar (Stadelman ve Lassmann 2000).

1.5.7. Anneksin yöntemi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazma yüzünde zar lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Hücre apoptoza gittiği zaman, normalde içyüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne bağlanırlar. Anneksin, hücrenin

dış yüzeyine bağlanmış olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir. Method sadece canlı hücrelerde uygulanabilir. Yöntemin avantajı deney aşamasının sadeliğidir (Kylarová 2002).

1.5.8. TUNEL yöntemi

DNA kırıklarının tanınması prensibine dayanan bir yöntemdir. Apoptozdaki parçalanma sonucu DNA uçları, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) ile işaretlenebilmektedir. TdT işaretli nükleotidler kullanılarak yapılan in situ işaretleme ardından floresan veya enzimatik olarak bir işlem daha gerçekleştirilir böylelikle hücreler görünür hale gelmektedir. Amaç; apoptoz hücreleri diğerlerinden ayırmaktır. Bu yöntem yaygın olarak “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” yöntemi adıyla anılmaktadır (Otsuki 2000).

2.MATERYAL YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Çalışmalarda kullanılan bor bileşenleri

BOREN (Türkiye Bor Araştırma Enstitüsü)'in desteklediği “2009-Ç-0214” numaralı ve “Bazı Bor Minerallerinin Antimikrobiyal, Antikanserojenik ve Bakteri Yaşamına Etkilerinin Araştırılması” adlı proje içerisinde yürütülen deneylerde; kullanılan borik asit, sodyum perborat ve diamonyum tetraborat maddeleri Etibor'dan temin edilmiştir.

2.1.2. İn vitro çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma), RPMI-1640 Medium (Sigma), Fetal Bovine Serum (FBS) (Sigma), Penisilin-Streptomisin (Sigma), Tripsin-EDTA Solusyonu (10X) (Sigma), Sodyum Bikarbonat (Sigma), MTT (Sigma?), Dimetil Sülfoksit (DMSO), Nötral Kırmızısı (NR; Neutral Red)(Fluka), Formaldehit (Merck), Tritonx-100, KCl (Merck), NaCl (Merck), KH₂PO₄ (Merck), Na₂HPO₄ (Merck), EDTA (Merck), Hidroklorik asit, Sıvı Azot (AÜBİBAM sıvı azot üretim tesisi)'den temin edilmiştir.

2.1.3. Kullanılan aletler ve cihazlar

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), kuru hava sterilizatörü (Nüve), Otoklav, Derin dondurucu (-20, -86 °C), buzdolabı, manyetik karıştırıcı, CO₂ inkübatörü (Heraus), Steril kabin (Heraus), sıvı azot kapları, otomatik pipetler, kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), Eliza Okuyucu (ELx808-IU, Bio-Tek), Inverted Mikroskop (1X71 Olympos), Nanodrop (Eppendorf), agaroz jel elektroforezi (Thermo), pH metre.

2.1.4. Hücre kültüründe kullanılan hücreler

Çalışmamızda A549 akciğer kanser hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hattı ilk kez 1972 yılında D.J. Giard ve arkadaşları tarafından 58 yaşındaki beyaz erkek bireyden alınmış, küçük hücreli olmayan epitel kökenli akciğer adenokarsinomudur. Institute of Fermentation Osaka (Tokyo, Japonya)'dan Doç. Dr Ayşe Tansu Koparal tarafından satın alınmış ve çalışmamız için hediye edilmiştir.

MCF7 hücre hattı ilk olarak 1970 yılında 69 yaşındaki beyaz bir kadının hastalıklı meme dokusundan izole edilmiştir. Hücreler; Yard. Doç. Dr. Asuman Zergeroğlu (Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Bilimleri Fakültesi, Biyoloji Bölümü) tarafından hediye edilmiştir.

2.1.5. Deneylerde kullanılan test maddelerinin hazırlanışı

Deneylerde kullanılan borik asit, sodyum perborat, diamonyum tetraborat maddelerinin 1M'lık ana stok solüsyonu ısıtılmış distile su içinde hazırlanmıştır. Diğer konsantrasyonlar, 1M yoğunluktaki solüsyonun kültür besiyeri içinde seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyonlar 0,2 mikronluk filtrelerden geçirilerek steril edilmiş ve +4 derecede muhafaza edilmişlerdir.

Ön çalışmalarda; her bir test maddesinin her bir hücre için çok sayıda dilüsyonları denenmiş ancak, deneylerde kullanılmak üzere uygun konsantrasyonlar seçilmiştir. A549 hücrelerinde kullanılmak üzere, borik asit'in 2.5, 5, 10, 25 ve 50 mM, sodyum perborat'ın 5, 10, 15, 25 ve 50 mM ve diamonyum tetraborat'ın 10, 13, 16, 19, 22 ve 25 mM konsantrasyonlarıyla, MCF7 hücreleri için, borik asit'in 45, 60, 75, 100 ve 150 mM, sodyum perborat'ın 45, 50, 60, 75, 100 ve 150 mM ve diamonyum tetraborat'ın 5, 10, 30, 45, 60 ve 75 mM konsantrasyonları seçilmiştir.

2.1.6. Deneyde kullanılan ortamların içerikleri ve hazırlanışları

PBS ve PBS EDTA

Hücreleri yıkamak için kullanılmaktadır (1 L.)

PBS

KCL	0.2gr
NaCL	8gr
KH ₂ PH ₄	0.2gr
Na ₂ HPO ₄	1.14gr

Deiyonize su içinde çözülmüş, toplam hacim 1 L.'ye tamamlanmış ve otoklav edilerek steril hale getirilmiştir.

PBS-EDTA

Hücreleri yıkamak için kullanılmaktadır (1 L.)

KCL	0.2gr
NaCL	8gr
KH ₂ PH ₄	0.2gr
Na ₂ HPO ₄	1.14gr
EDTA	0.372

Deiyonize su içinde çözülmüş, toplam hacim 1 L.'ye tamamlanmış ve otoklav edilerek steril hale getirilmiştir.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), %10'luk FBS

A549 hücrelerinin büyütülmesi için kullanılmıştır (1 L.).

Fetal Bovine Serum	100 ml
Penisilin/streptomisin	10 ml
Sodyum Bikarbonat	40 ml
Sodyum Piruvat	10 ml
DMEM	10 gr

Ultra saf su ile hazırlanır ve toplam hacim 1 L.'ye tamamlanır. Steril ortamda hazırlanan medyumun pH'sı HCl ile 7.4'e ayarlanmış, 0.2 µm filtreden geçirilip +4 C⁰ de saklanmıştır.

RPMI-1640 (%10'luk FBS)

MCF7 hücrelerinin büyütülmesi için kullanılmıştır (1 L.).

Fetal Bovine Serum	100 ml.
Penisilin/streptomisin	10 ml.
Sodyum Bikarbonat	2 gr.
RPMI-1640	890 ml.

Ultra saf su ile hazırlanır ve toplam hacim 1 L.'ye tamamlanır. Steril ortamda hazırlanan medyum'un pH'sı HCl ile 7.4'e ayarlanmış, 0.2 µm filtreden geçirilip +4 C⁰ de saklanmıştır.

Trypsin EDTA (1x, 100 ml).

Hücreleri pasaj yapmak amacı ile hücrelerin flasktan kaldırılmasında kullanılır.

Trypsin-EDTA (10x)	50 ml
PBS-EDTA	50 ml
Solüsyon steril olarak satın alınmaktadır.	

MTT Solüsyonu

Sitotoksikite çalışmalarında kullanılmaktadır (1 ml).

MTT	5 mg.
PBS	1 ml

0,22 mikron çaplı filtre ile steril edilerek küçük hacimlerde, ışık görmeyecek şekilde -20 C⁰ de saklanmıştır.

Nötral Red Solüsyonu

Nötral kırmızısı alımı testi (NR) için kullanılmaktadır.

10x Stok solüsyonu (100 ml)

NR	0,33 gr
PBS	100 ml

Stok solüsyon 2 ay kadar oda sıcaklığında karanlıkta saklanabilmektedir.

1x Çalışma solüsyonu (10 ml)

10x stok 1 ml

Medyum 9 ml

Kullanılmadan hemen önce hazırlanmalıdır. 0,22 mikron çaplı filtreden geçirilip 37°C'lik su banyosunda yarım saat ısıtılır.

Desorb (100 ml)

NR boyasının hücre içinde çözünmesine yardım etmektedir.

Glasial asetik asit 1ml

Etanol 50 ml

Toplam hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hücrelerin testler için hazırlanması

Deneylerde kullanılan A549 hücreleri; DMEM ortamında büyütülmüşlerdir. Önceden inaktif hale getirilmiş % 10'luk FBS, % 1 oranında penisilin / streptomisin ve sodyum bikarbonat içeren besiyerleri, 25 ve 75 cm² flasklarda, % 95 hava ve % 5 CO₂ ortamında, 37 °C'de kültüre edilmiştir.

MCF7 hücreleri; L-glutamin içeren RPMI-1640, önceden inaktif hale getirilmiş % 10'luk FBS, % 1 oranında penisilin / streptomisin ve sodyum bikarbonat içeren besiyerleri, 25 ve 75 cm² flasklarda, % 95 hava ve % 5 CO₂ ortamında, 37 °C'de kültüre edilmiştir.

Uygun şartlarda çoğalmaya bırakılan hücreler, tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask tabanından kaldırılmıştır. Daha sonra, hücrelerin sayıları Thoma lamında sayılmıştır. Her bir hücre 3'er kez sayılarak ortalaması alınmıştır. MTT ve Nötral kırmızısı alımı testleri için; 96 kuyucuklu plakalara, A549 hücresi için her bir kuyuya 5x10³, MCF7 hücresi için ise 8x10³ hücre ekilmiştir. Apoptoz belirleme testlerinde, 25 cm²'lik flasklara A549 için 3.5x10⁵ hücre, MCF7 için ise 5x10⁵ hücre ekilmiştir. % 95

hava ve % 5 CO₂'li gaz ortamında ve 37 C°'de inkübatörde 24, 48 ve 72 saat inkübe edilmiştir. Hücrelerin yapışması ve ortama alışıması için 24 saat bekletildikten sonra, test maddelerinin belirlenen konsantrasyonları eklenmiştir. Negatif kontrol olarak, test maddesi uygulanmamış hücreler kullanırken, cisplatin (7,5 mM) uygulanmış hücreler pozitif kontrol olarak değerlendirilmiştir.

2.2.2. MTT testi

Bu yöntem Mosmann 1983'e uygun olarak modifiye edilmiştir. Test bileşenleriyle muamele edilmiş hücrelerin 24, 48 ve 72 saatlik bekleme sürelerinin sonunda, medyumları uzaklaştırılmış ve hücrelere MTT içeren taze medyum (100 µl besiyerine 5 mg /ml stok MTT solüsyonundan 25 µl eklenerek hazırlanan karışım) eklenmiştir. Hücreler MTT varlığında 3 saat boyunca % 95 hava ve % 5 CO₂ ortamında, 37 °C'de karanlık ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda, MTT içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve oluşan formazan kristallerin çözünmesi için; her kuyucuğa 100 µl DMSO eklenmiştir. Plaka 15 dk. 300 rpm'de çalkanarak formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Çözünen formazan kristallerinin oluşturduğu renk şiddetinin optik dansitesi (OD), Bio-Tek, ELx808-IU marka plaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda okunmuştur (Mosmann 1983).

OD değerlerinin artışı, canlı hücrelerin sayısı ile doğru orantılı olarak değerlendirilmiştir. Her bir deney üç kez tekrar edilmiş ve sonuçlar, negatif kontrol değerleriyle kıyaslanarak, SPSS Software Version 17 programında, One Way Anova, Dunnet-t testi kullanılarak değerlendirilmiştir.

2.2.3. Nötral kırmızısı (NR; Neutral Red) alımı testi

Bu yöntem Amerika Ulusal Toksikoloji Programı Alternatif Toksikoloji Yöntemleri Değerlendirilme Merkezi (NICEATM) tarafından önerilen yönteme uygun olarak uygulanmıştır. Test bileşenleriyle muamele edilmiş hücrelerin 24, 48 ve 72 saatlik bekleme sürelerinin sonunda, medyumları uzaklaştırılmış ve hücreler PBS ile yıkanmıştır. Ardından, her kuyuya taze hazırlanmış NR çalışma solüsyonundan 250 µl

eklenmiştir. Plakalar; 3 saat boyunca % 95 hava ve % 5 CO₂ ortamında, 37 °C'de inkübe edilmişlerdir. Sürenin sonunda, NR içeren besiyeri uzaklaştırılmış ve 1 kez daha PBS ile yıkanmıştır. Hücrelerden NR'nin çıkabilmesi için, her bir kuyuya 100 µl desorb solüsyonu eklenerek 15 dk. boyunca çalkalamalı tablada 300 rpm'de, ışıktan korunarak çalkalanmıştır. Sürenin sonunda 5 dk. oda sıcaklığında bekletilen plakalar Bio-Tek, ELx808-IU marka plaka okuyucuda 540 nm dalga boyunda okunmuştur. Deneyler 3 kez tekrar edilmiş, bulgular negatif kontrol değerleriyle kıyaslanarak, SPSS Software Version 17 programında, One Way Anova, Dunnet-t testi kullanılarak değerlendirilmiştir (Test Method Protocol for the NHK Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay, 2003).

2.2.4. Mitokondri zar geçirgenliği testi

Bu test, Mitocapture Kit'in üretici firmasının (Biovision, K-250) önerdiği protokole uygun olarak yapılmıştır. Yapılan MTT ve Nötral kırmızısı alımı testinin değerlendirilmesine göre, en uygun doz ve saat belirlenmiş ve diğer deneyler bu doz ve saate göre yapılmıştır. Buna göre; A549 hücrelerinde borik asit için; 5 mM, sodyum perborat için; 5 mM ve diamonyum tetraborat için 10 mM olarak belirlenmiştir. Ayrıca, MCF7 hücrelerinde borik asit için 50 mM, sodyum perborat için 75 mM ve diamonyum tetraborat için 30 mM olarak belirlenmiştir.

Çalışmalarda 25 cm² flasklarda A549 hücreleri 3,4x10⁵ sayıda ekilerek DMEM içeren besi yerinde ve % 10 FBS varlığında büyütülmüşler, MCF7 hücreleri ise; yine 25 cm² flasklarda 5x10⁵ sayıda, % 10 FBS içeren RPMI-1640 besi yerinde büyütülmüştür.

Bor bileşiklerine maruz bırakılmış hücreler, medyumları uzaklaştırılmış ve Trypsin ile flasklardan kaldırılarak Thoma lamı ile 3 kez sayılmış ve 1milyon hücre olacak şekilde pellet haline getirilmiştir. Ardından, protokolde belirtildiği üzere mitocapture solüsyonu ile hücreler dilüe edilmiş ve 37C⁰'de % 5 CO₂ inkübatöründe 15 dk. bekletilmiştir. Böylelikle, boya ile hücreler birbirine temas etmiştir. Santrifüj ile boya kalıntıları atılmış ve inkübasyon solüsyonu ile süspanse hale getirilen hücreler lamin üzerine 25 µl damlatılmış ve üzeri lamel ile kapatılıp etrafı hava almaması için

oje sürülmüştür. Sonuçlar, karanlık ortamda, florasan mikroskobu (Olympus 1X70) ile incelenmiştir.

2.2.5 Kaspaz 3 / 8 apoptoz belirleme yöntemi

Kaspaz 3 / 8 apoptoz belirleme yöntemi, kaspaz 3 için; kaspaz 3/CPP32 kolorimetrik deney kit'i (Biovision, K-113), Kaspaz 8 için ise FLICE / Kaspaz-8 kolometri deney kiti üretici firmasının (Biovision, K-106) önerdiği protokole uygun olarak yapılmıştır. Çalışmalarda A549 hücreleri 25 cm² flasklara her birinde 3,5x10⁵ hücre olacak şekilde ekilerek DMEM içeren besi yerinde % 10 FBS varlığında, MCF7 hücreleri ise; yine 25 cm² flasklara 5x10⁵ olacak şekilde % 10 FBS içeren RPMI-1640 besiyerinde büyütülmüştür.

Bor muamelesinin ardından hücreler; Thoma lamı ile 3 kez sayılarak 1x10⁶ hücre olacak şekilde pellet haline getirilmiştir. Protokolde belirtildiği şekilde 50 µl hücre liziz solüsyonu eklenmiş ve hücreler buzda 10 dk bekletilmişlerdir. Oluşan hücre ekstratı'nı ayırtırmak için hücreler 1 dk sentrifüj edilmiş ve süpernatant başka bir tüpe alınmıştır. Bu şekilde hücreler küçük hacimlerde paylaştırılarak -80 °C'de saklanmıştır. Hücrelerin protein miktarları Nanodrop spektrofotometrik cihazında belirlenmiştir. Kaspaz aktivasyon ölçümü için, kaspaz 3'den yaklaşık 100 µg kaspaz 8 için ise 100 µg protein deney tüpüne alınarak, üzerlerine 10 mM DTT içeren reaksiyon tamponundan 50 µl eklenmiştir. Deneyler aktif kaspazların substratlarını parçalaması prensibine dayanmaktadır. Bu sebep ile üzerlerine substratları olarak, kaspaz 3 substratı olarak DEVD-pNA kaspaz 8 için ise; IETD- Pna eklenerek karıştırılmış ve bu karışım, 37 C⁰'de iki saat bekletilmiştir. Beklenen sürenin sonunda Bio-Tek, ELx808-IU marka plaka okuyucuda 400 nm dalga boyunda okunmuştur.

2.2.6. DNA fragmentasyonu ve agaroz jel elektroforezi

Yöntem Quick Apoptotic DNA Ladder kiti (Biovision, K120) ile yapılmıştır. Çalışmada A549 hücreleri 25 cm² flasklara her birinde 3,4x10⁵ hücre olacak şekilde ekilerek DMEM besiyerinde % 10 FBS varlığında, MCF7 hücreleri ise; yine 25 cm²

flasklara 5×10^5 olacak şekilde % 10 FBS içeren RPMI-1640 besiyerinde büyütülmüştür. Test bileşenleriyle muamele edilmiş hücrelerin bekleme sürelerinin sonunda, medyumları uzaklaştırılmıştır. Önce PBS ile yıkanan hücreler, 2x Tripsin–EDTA ile kaldırılıp, Thoma lamı ile sayılmışlardır. Hücreler yaklaşık 1×10^6 olacak şekilde tüplere aktarılmışlardır. PBS ile bir kez daha yıkayıp 5 dk. 500xg’de santrifüj edilmişler ve ardından oluşan süpernatant ortamdan çıkartılmıştır. Hücreleri parçalamak amacıyla 35 µl TE eklenip hafifçe pipetlenmiştir. Üzerlerine 5 µl enzim A solüsyonu konup 37 °C’de 10dk. bekletilmiştir. 10.dk’nın sonunda üzerlerine 5 µl enzim B solüsyonu konulup 50 °C’de yarım saat beklemeye alınmışlardır. Sürenin sonunda, 5 µl amonyum asetat eklenip karıştırılarak, 50 µl isopropanol eklenmiş ve -20 °C’de 10 dk bekletilmişlerdir. DNA’yı çöktürmek amacı ile karışım santrifüj edilmiş (13000rpm, 4 °C, 10 dk) ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. DNA pelleti 500 µl % 70’lik etanol ile yıkanmıştır. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra, DNA pelleti 30 µl DNA süspansiyon solüsyonunda çözündürülmüş ve agaroz jel için hazır hale getirilmiştir.

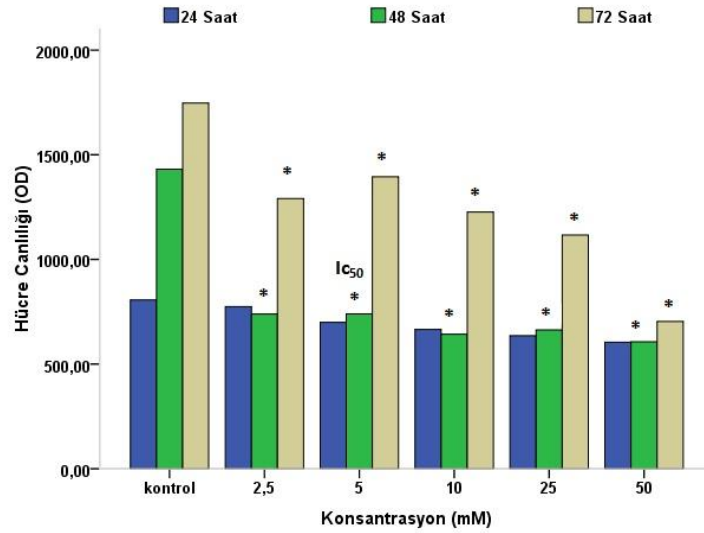
İzole edilen DNA’nın görüntülenmesi amacıyla, % 1,2’lik agaroz jel hazırlanmış ve içerisine 0,5 µg/ml etidyum bromid solüsyonundan 5 µl eklenerek elektroforez tankına dökülmüştür. Jelin donmasının ardından, yükleme boyası ile karıştırılmış olan 30 µl DNA örneğinden her bir kuyuya yüklenmiş ve 5 v/cm elektrik akımı altında 1-2 saat boyunca yürütme işlemi sürdürülmüştür. Marker olarak Sigma DNA ladder 123 bp kullanılmıştır.

3.BULGULAR

3.1. MTT Yöntemi

3.1.1. A549 akciğer adenokarsinom hücresi

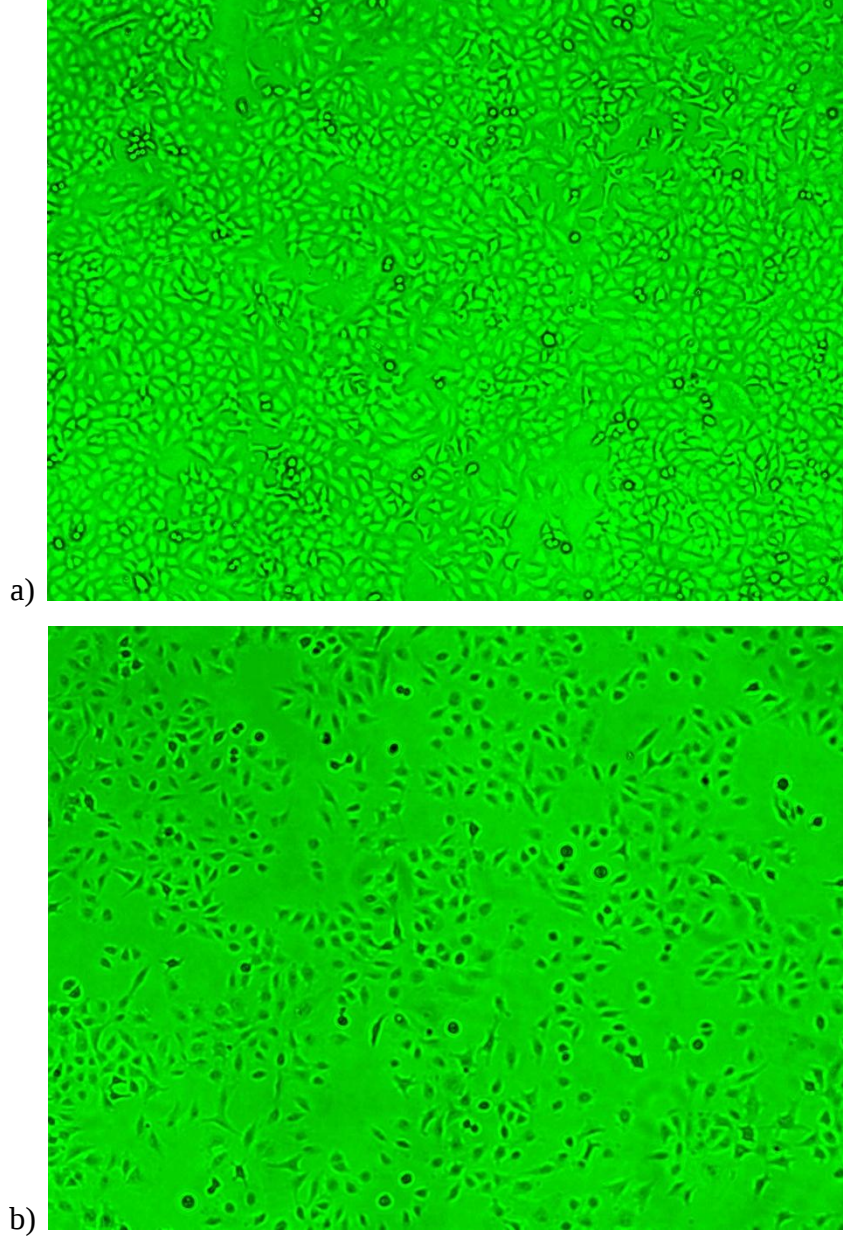
A549 hücresi üzerine borik asit'in mitokondri aracılı sitotoksik etkisi, 24, 48 ve 72 saatlik bekleme süreleri sonunda MTT yöntemiyle araştırılmıştır. 50 mM'ın üzerindeki borik asit, hücrelerde toksik etkiye yol açmıştır. Bu sebeple, sitotoksik etki çalışmalarına 2.5, 5, 10, 25 ve 50 mM konsantrasyonları ile devam edilmiştir.



Şekil 3.1. A549 hücresinde borik asit'in mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).

Şekil 3.1'de görüldüğü gibi, borik asit'in A549 hücreleri üzerine etkisinin ilk 24 saat'te anlamlı olmadığı görülmüştür. Fakat 48. saatte, hücrelerin kontrole oranla yarı yarıya canlılıklarını yitirdikleri belirlenmiştir. 72. Saatin sonunda hücrelerin kontrole göre sadece 50 mM'lık konsantrasyonunda anlamlı etkinin olduğu diğer konsantrasyonlarda anlamlı etki olmadığı görülmüştür. Bu durum sonucunda, 48. saatte IC_{50} değerinin 5 mM olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda test maddesinin A549 hücresi üzerindeki etkisi inverted mikroskopu (Olympus IX70) ile görüntülenmiş ve

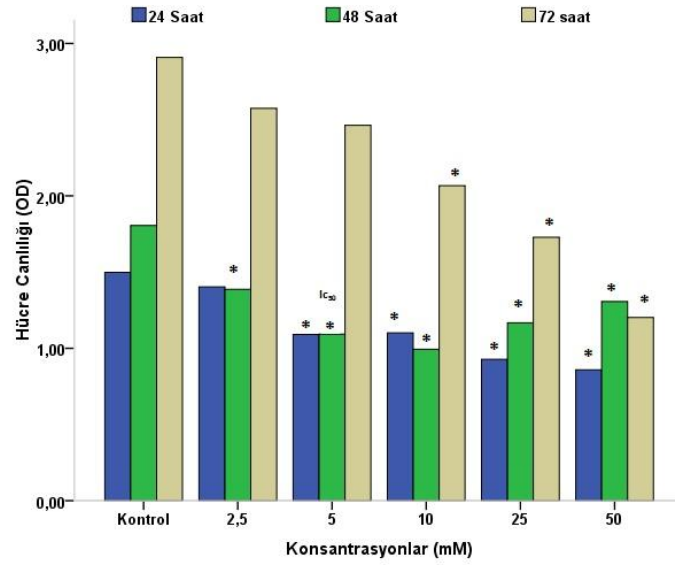
Şekil 3.2’de gösterilmiştir. Hücre morfolojileri incelendiğinde kontrole oranla fark gözlenmemiştir. Bunun yanında hücre sayısında azalma kaydedilmiştir.



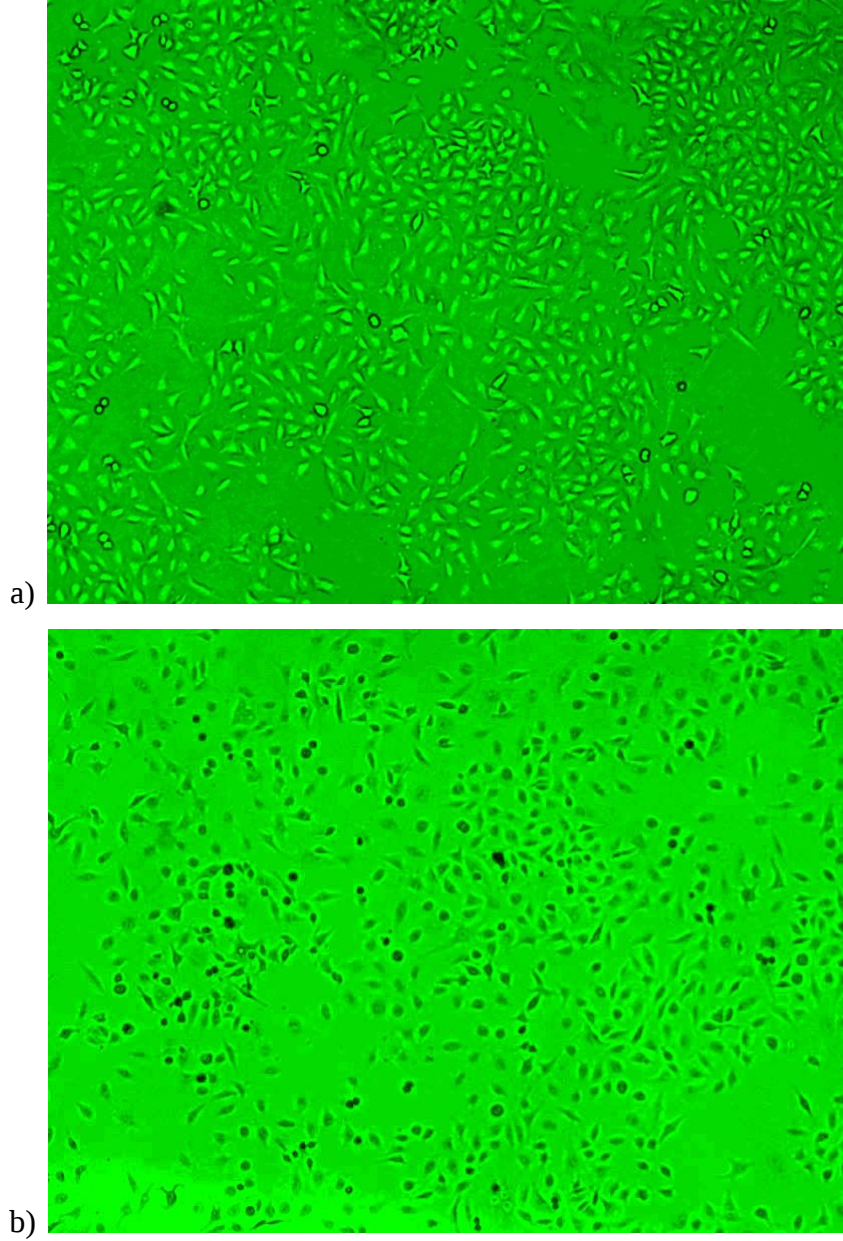
Şekil 3.2. A549 hücrelerinde a. kontrol, b. 5 mM borik asit’in 48 saat’lik mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi (X200).

Sodyum perborat’ın, A549 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkileri 24, 48 ve 72 saat boyunca, 5, 10, 15, 25 ve 50 mM konsantrasyonlarda araştırılmıştır. Şekil 3.3’de görüldüğü üzere; 5 mM’ın üzerindeki tüm dozlar hücreler üzerinde toksik etki göstermiştir. 48 saatlik inkübasyonun sonunda IC_{50} değerinin 5 mM’lık konsantrasyon

olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda test maddesinin A549 hücresi üzerindeki etkisi inverted mikroskobu ile görüntülenmiştir. Şekil 3.4.'de görüldüğü üzere, kontrol hücrelerinin elips şeklide olduğu, aynı şekilde sodyum perborat'a maruz bırakılmış hücrelerinde şekillerini korudukları gözlenmiştir. Doza bağlı olarak ortamdaki hücre sayısının azaldığı kaydedilmiştir.



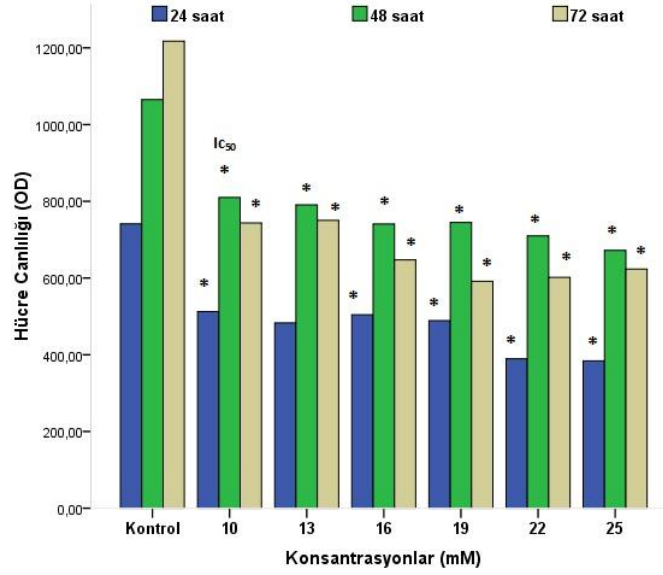
Şekil 3.3. A549 hücresinde sodyum perborat'ın mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).



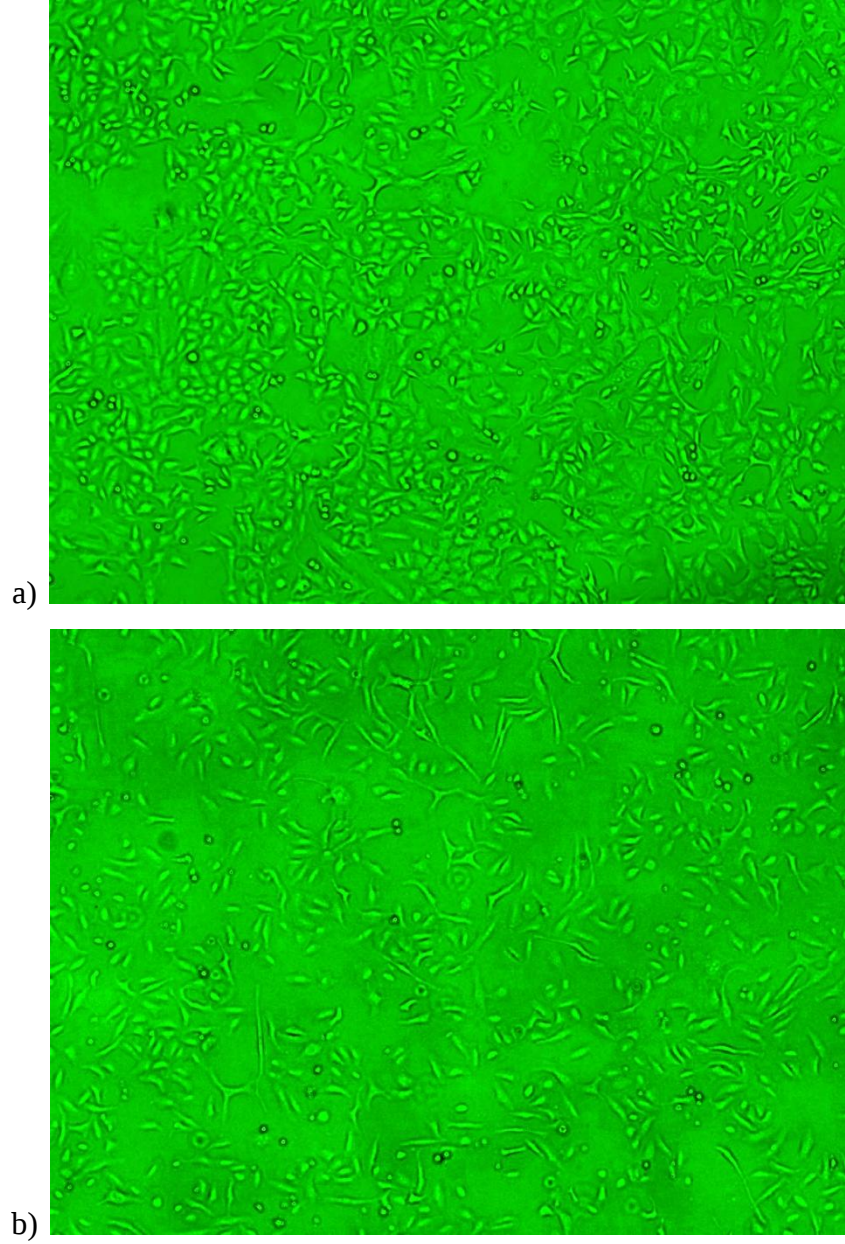
Şekil 3.4. A549 hücrelerinde a. kontrol, b. 5 mM sodyum perborat'ın 48 saat'lik mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi (X 200).

Test bileşenlerinden, diamonyum tetraborat'ın A549 hücreleri üzerine sitotoksik etkilerinin belirlendiği ön çalışmalar sonucunda; 25 mM üzerindeki dozların oldukça toksik olduğu bulunmuştur. Bu yüzden 25, 22, 19, 16, 13 ve 10 mM konsantrasyonları denenmiş ve maddenin etkileri 24, 48 ve 72 saat boyunca gözlenmiştir. 24. saat'te bütün konsantrasyonlarda belirgin bir etki gözlemlenirken, 48. saatte etkinin daha da arttığı saptanmıştır ve IC_{50} değerinin 10 mM olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda test

maddesinin A549 hücresi üzerindeki etkisi inverted mikroskopu (Olympus IX70) ile görüntülenmiş ve Şekil 3.6’de gösterilmiştir. İnceleme sonucu diamonyum tetraborat’la muamelesi sonucu ortamdaki hücre sayısında azalma gözlenirken, morfolojik olarak kontrole oranla önemli herhangi bir farklılık gözlenmemiştir.



Şekil 3.5. A549 hücresinde Diamonyum tetraborat’ın mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).

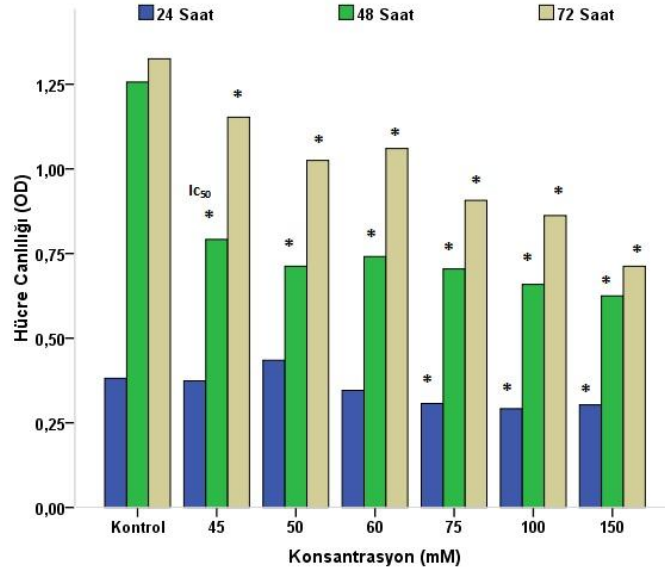


Şekil 3.6. A549 hücrelerinde a. kontrol, b. 10 mM diamonyum tetraborat'ın 48 saat'lik mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi (X 200).

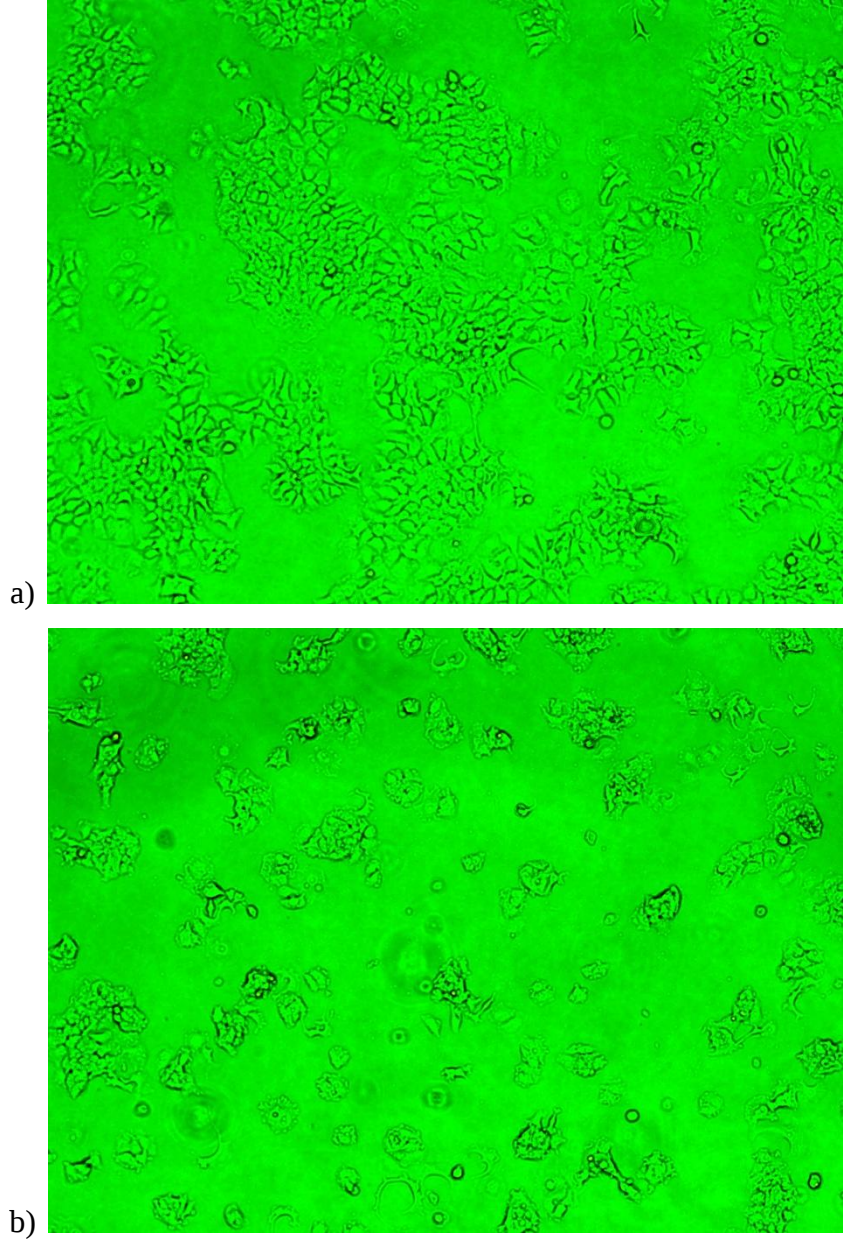
3.1.2 MCF7 meme kanseri epitel hücresi

Borik asit maddesinin MCF7 hücreleri ile yapılan ön çalışmaları sonucunda, 45 mM'a kadar olan konsantrasyonlarda anlamlı etki görülmemiştir. Bu yüzden deneyler tekrarlanırken dozlar 45, 60, 75, 100 ve 150 mM olarak belirlenmiştir. Şekil 3.7'ye bakıldığında, 24 saatin sonunda hiçbir konsantrasyonda kontrole oranla belirgin bir etki

gözlenmezken, 48 saatte etkinin yüksek miktarda artışı tespit edilmiştir. Ayrıca, 72. saatte bütün konsantrasyonlarda bir etki görülmüştür. IC_{50} değeri 48. saatte ve 50 mM olarak belirlenmiş, diğer apoptoz belirleme çalışmalarına bu doz ile devam edilmiştir. Aynı zamanda test maddesinin MCF7 hücresi üzerindeki etkisi inverted mikroskopu (Olympus IX70) ile görüntülenmiş ve Şekil 3.8’de gösterilmiştir. MCF7 hücrelerinin flasklarda koloni şeklinde bulundukları gözlenmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında borik asitle muamele sonucu hücre sayısında belirgin bir azalmagözlenmiştir.



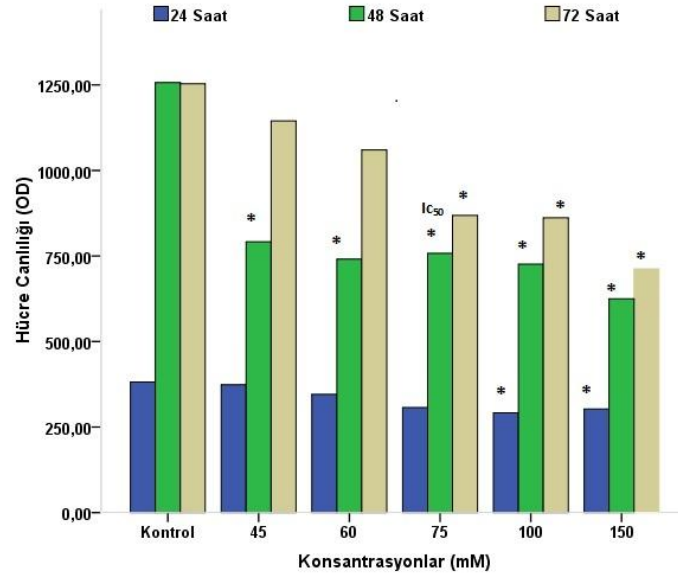
Şekil 3.7. MCF7 hücresinde borik asit’in mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).



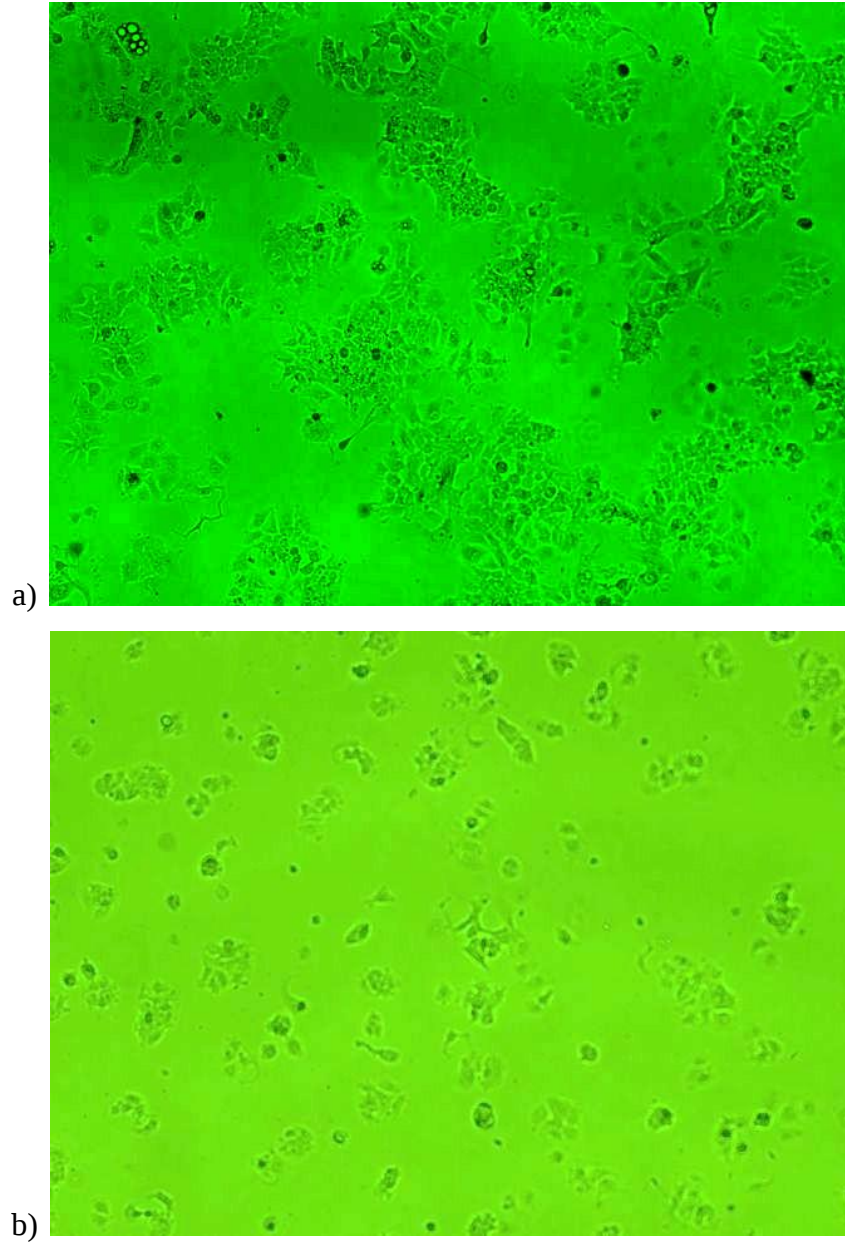
Şekil 3.8. MCF7 hücrelerinde a. kontrol, b. 50 mM borik asit'in 48 saat'lik mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi (X 200).

MCF7 hücreleri üzerine sodyum perborat'ın etkisinin anlaşılması için yapılan çalışmalarda 45 mM'a kadar anlamlı bir etkinin olmadığından, 45, 50, 60, 75, 100 ve 150 mM sodyum perborat ile sitotoksisite çalışmaları sürdürülmüştür. 24 saat sonunda, hiç bir dozda anlamlı etki görülmemesine karşın 48. saatte sitotoksik etkinin doza bağlı olarak arttığı görülmüştür, bu çalışmaların sonucuna göre, IC_{50} değerinin 75 mM olduğuna karar verilmiştir. Sodyum perborat'ın MCF7 hücresi üzerindeki sitotoksik

etkisi inverted mikroskop (Olympus IX70) ile görüntülenmiş ve Şekil 3.10’da gösterilmiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında yüzen hücre sayısında artış olduğu görülmüştür. Bu durum sodyum perboratın, kanserli hücrelerin ortak özelliği olan yüzeye tutunma yeteneklerindeki zayıflığı artırdığı düşünülmüştür.

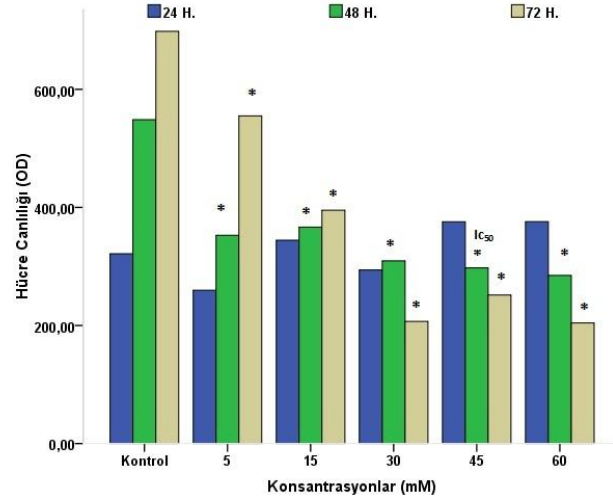


Şekil 3.9. MCF7 hücrelerinde sodyum perborat’ın mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).



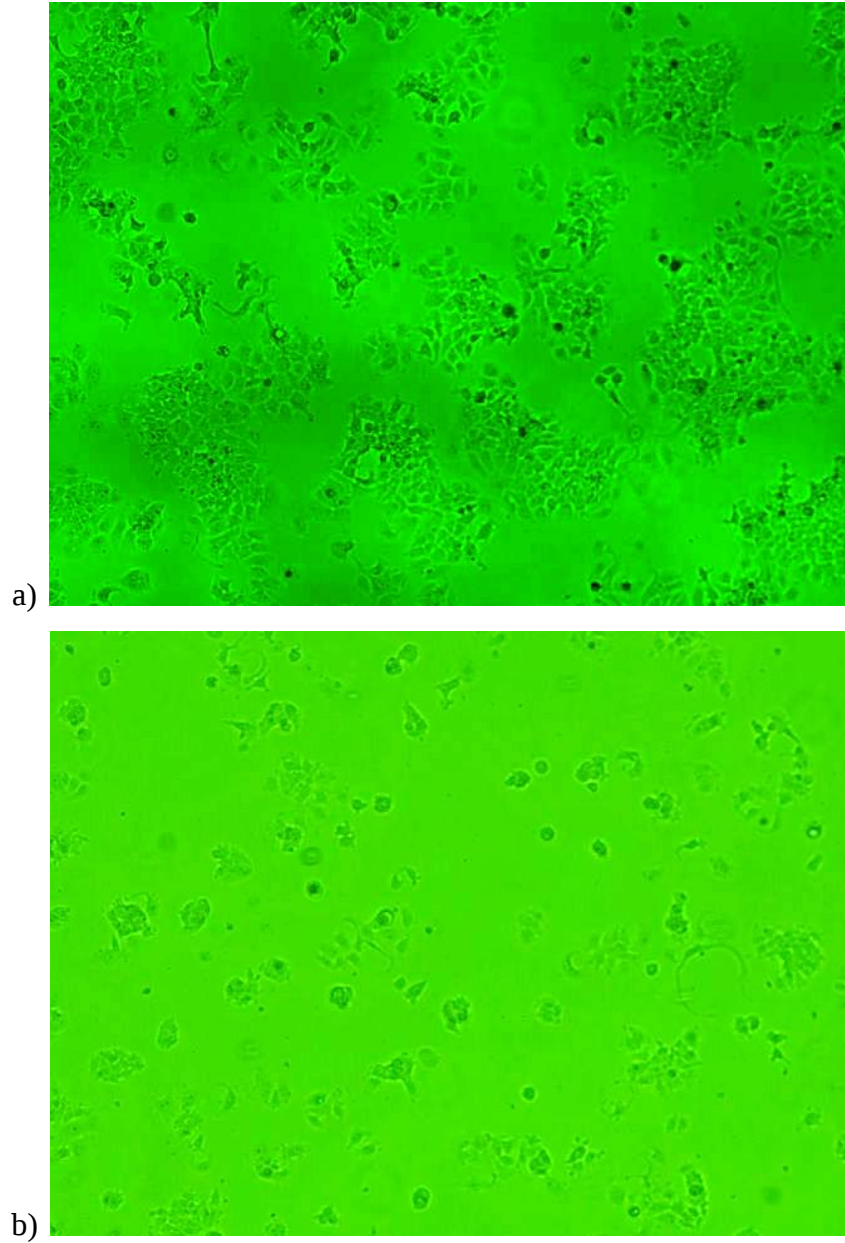
Şekil 3.10. MCF7 hücrelerinde a. kontrol, b. 75 mM sodyum perborat'ın 48 saat'lik mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi (X200).

Diamonyum tetraborat bileşiğinin, MCF7 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkilerinin araştırıldığı deneylerde; 5, 10, 30, 45, 60 ve 75 mM konsantrasyonları kullanılmıştır. 24 saatte tüm konsantrasyonlarda önemli bir etki görülmemesine karşın, 48. Saatte etkinin arttığı görülmüş, IC_{50} değerinin 45 mM olduğuna karar verilmiştir.



Şekil 3.11. MCF7 hücresinde Diamonyum tetraborat konsantrasyonlarının mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).

Aynı zamanda test maddesinin MCF7 hücresi üzerindeki etkisi inverted mikroskobu ile görüntülenmiş ve şekil 3.12’de gösterilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere kontrole oranlar hücre sayılarında belirgin bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca hücre morfolojilerinde sayılarının azalmasına bağlı olarak hücrelerde uzantılar gözlenmiştir.



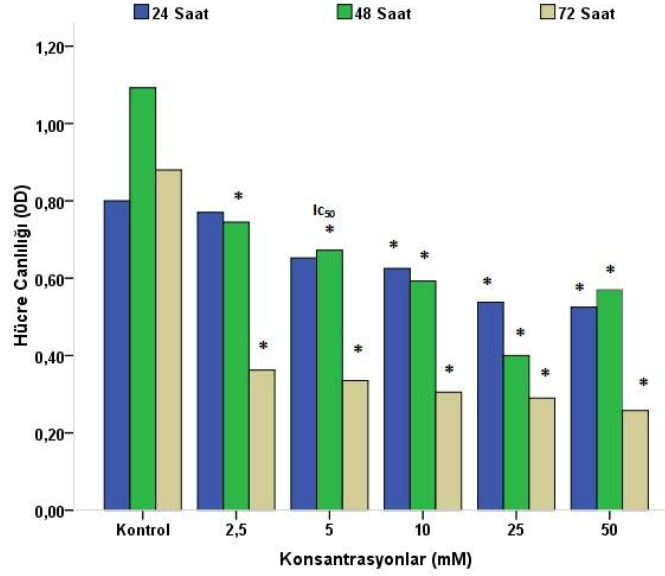
Şekil 3.12. MCF7 hücrelerinde a. kontrol, b. 45 mM diamonyum tetraborat'ın 48 saat'lik mitokondriye dayalı sitotoksik etkisi (X 200).

3.2. Nötral Kırmızısı Alımı Testi Sonuçları

3.2.1. A549 adenokarsinom hücresi

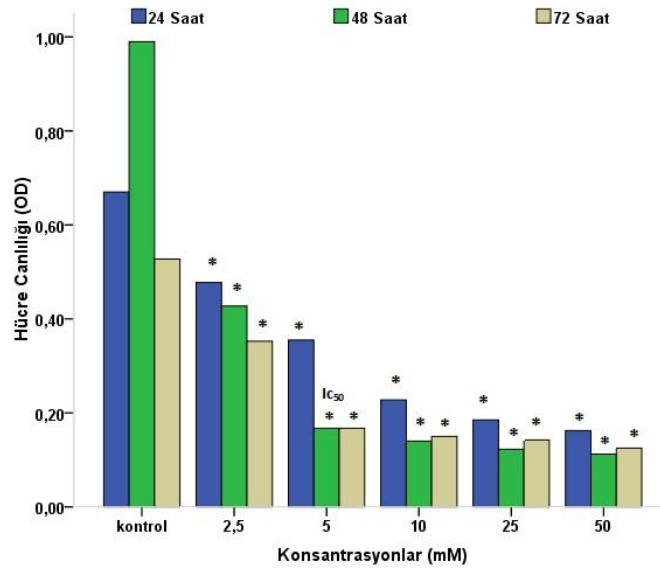
Borik asit'in 2.5, 5, 10, 25 ve 50 mM'lık konsantrasyonlarının A549 hücreleri üzerindeki lizozomal aktiviteye dayalı sitotoksik etkisi NR testiyle araştırılmıştır. Şekil

3.13 incelendiğinde, 24 saatte anlamlı bir etki görülmemesine rağmen 48 ve 72. saatlerde sitotoksik etkide bir artış saptanmıştır. IC_{50} değerinin 5 mM konsantrasyon olduğuna karar verilmiştir.



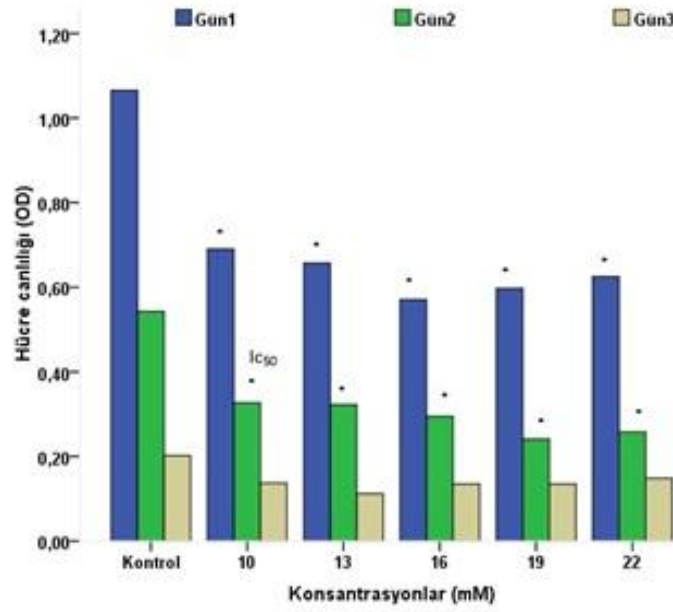
Şekil 3.13. A549 hücrelerinde borik asit'in lizozoma dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).

Sodyum perborat'ın 2.5, 5, 10, 25 ve 50 mM'lık konsantrasyonlarının A549 hücreleri üzerine sitotoksik etkileri araştırıldığında, 5mM üzerindeki bütün dozlarda ve her üç inkübasyon süresinde, canlı hücrelerin sayısında önemli bir azalma görülmüştür ve hem 48 hem de 72 saatlik deneyler için IC_{50} değeri 5 mM olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.14. A549 hücrelerinde sodyum perborat'ın lizozoma dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).

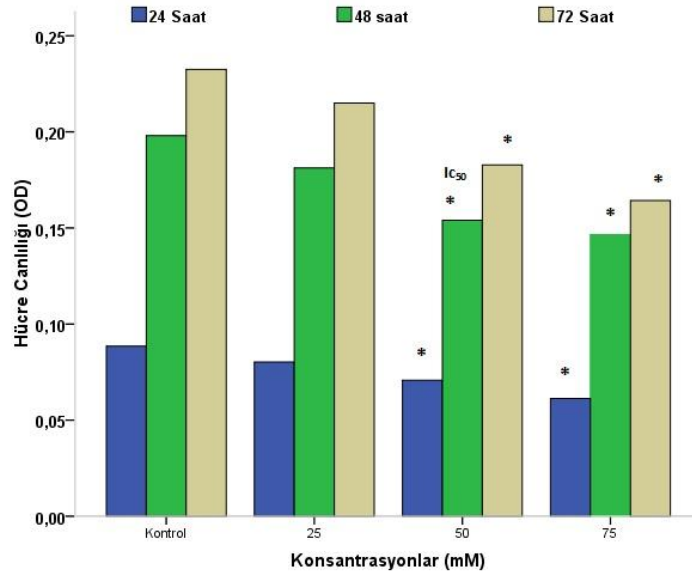
A549 hücreleri üzerinde diamonyum tetraborat'ın sitotoksik etkisi araştırıldığında, 25 mM'ın üzerinde hücrelerin canlılıklarını koruyamadıkları dörölmüştür. Bu nedenle, 10, 13, 16, 19 ve 22 mM diamonyum tetraborat ile NR çalımaları sürdürölmüştür. Şekil 3.15'de göröldüğü üzere, 48. saatte IC₅₀ değeri 10 mM'dır.



Şekil 3.15. A549 hücresinde diamonyum tetraboratın lizozoma dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).

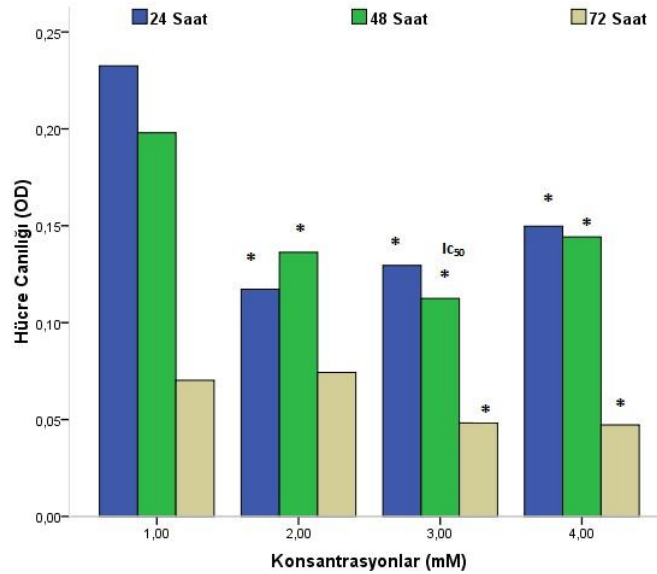
3.2.2. MCF7 meme kanseri epitel hücresi

Borik asit'in MCF7 hücresi üzerine sitotoksik etkisi; 25, 50 ve 75 mM'lık konsantrasyonlar kullanılarak incelenmiştir. 24 saatte anlamlı bir etki görölmemişken, 48. ve 72. saatlere kontrole oranla daha düşük bir etki olduğı saptanmıştır.



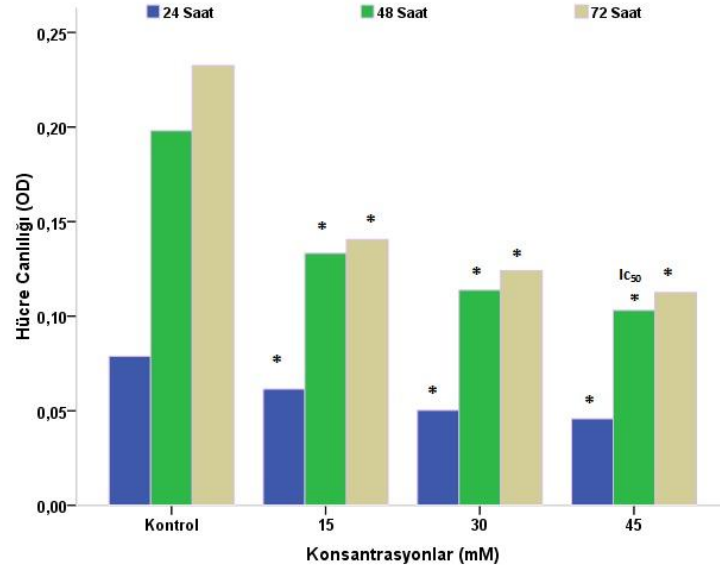
Şekil 3.16. MCF7 hücrelerinde borik asit'in lizozoma dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).

Sodyum perborat'ın MCF7 hücreleri üzerine olan etkisinin sitotoksik olarak araştırılmasında kullanılan konsantrasyonlar; 50, 75 ve 100 mM'dır. Değerlendirmenin sonucunda, 24 saatte bütün dozların sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiştir. 48. saatin sonunda, özellikle 75 mM'luk konsantrasyonda, canlı hücre sayısının kontrole oranla yarıya indiği gözlemlenmiş ve IC_{50} değerinin 75 mM olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 3.17. MCF7 hücrelerinde sodyum perborat'ın lizozoma dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).

Diamonyum tetraborat'ın 15, 30 ve 45 mM'lık konsantrasyonlarının MCF7 hücreleri üzerine olan sitotoksik etkisinin araştırılması sonucunda, 24, 48 ve 72. saat sonunda doza bağlı etki görülmüştür.



Şekil 3.18. MCF7 hücrelerinde diamonyum tetraborat'ın lizozoma dayalı sitotoksik etkisi ($P \leq 0.001$).

3.3. Mitokondri Zar Bütünlüğü Testi

Mitokondri zar bütünlüğü belirleme yöntemi; materyal yöntem bölümünde de anlatıldığı gibi, hücrelerin mitokondri zarında veya hücre sitoplazmasında biriken floresan boyanın farklı renklerde yaptığı ışınmanın floresan mikroskobu ile tespit edilmesi temeline dayanmaktadır. Test maddesindeki boya, sağlıklı hücrelerde mitokondrinin içine girerek orada birikmekte ve floresan ışığı altında parlak kırmızı bir renk almaktadır; öte yandan apoptotik hücrelerde mitokondriyal transmembran potansiyeli bozulduğundan, verilen boya mitokondri içinde birikememekte aksine sitoplazma içinde monomer halinde kalmakta ve parlak yeşil bir renk vermektedirler. Oluşan floresan sinyaller sayesinde hücreler floresan mikroskobu altında FITCH veya rodamin filtreleriyle tayin edilmektedir (Heiden 1997). Bu çalışmada, bor bileşenlerinin önceden belirlenen IC_{50} değerleri ve inkübasyon süreleri uygulanmıştır. Sonuçlar; hücrelerden çıkan yeşil ve kırmızı renk veren floresan sinyallerin floresan mikroskopunda (Olympus IX70) görüntülenmesiyle göre değerlendirilmiştir. İncelenen

preparatlarda, kırmızı renkli sağlıklı ve yeşil renkli apoptotik hücreler sayılmış ve toplam hücre sayılarına göre yüzdelik oranları hesaplanmıştır. Deneyler 2'şer kere tekrar edilmiş ve sonuçlar, ortalamaları alınarak değerlendirilmiştir.

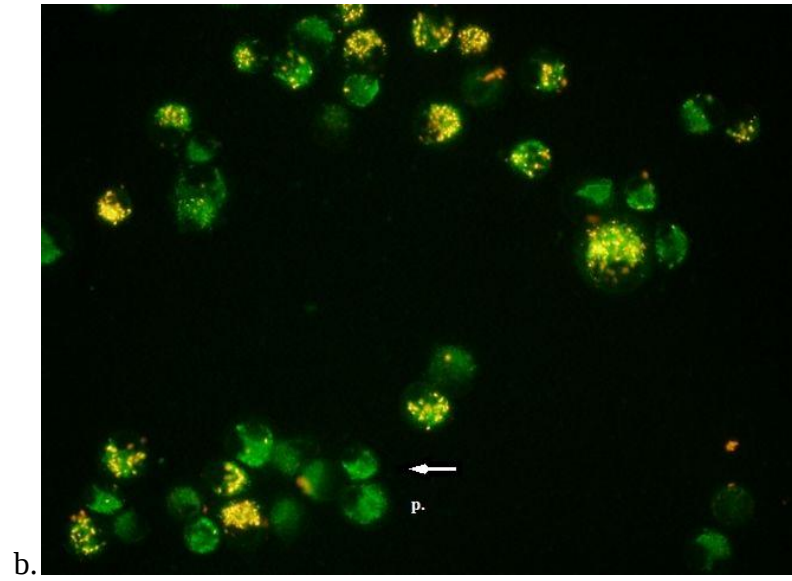
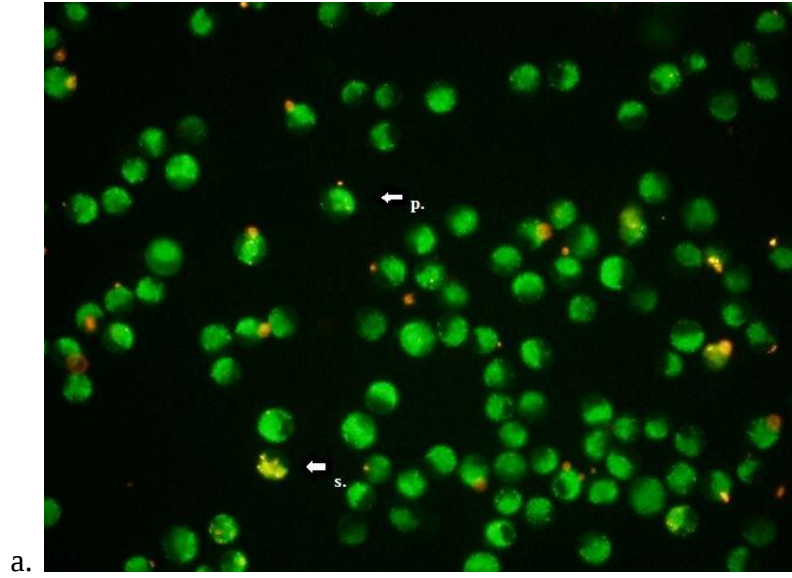
3.3.1. A549 adenokarsinoma hücresi mitokondri zar bütünlüğü testi

Borik asit'in, A549 hücrelerine olan apoptotik etkisi mitokondriyal zar bütünlüğü bakımından araştırıldığında; hücrelerin % 80'inin borik asit etkisiyle apoptoza girdiği belirlenmiştir. Bu durum pozitif kontrol olarak kullanılan 7,5 mM cisplatin uygulamasından elde edilen sonuca oldukça benzerdir. Apoptotik hücrelerin fotoğrafları Şekil 3.19'da verilmiştir.

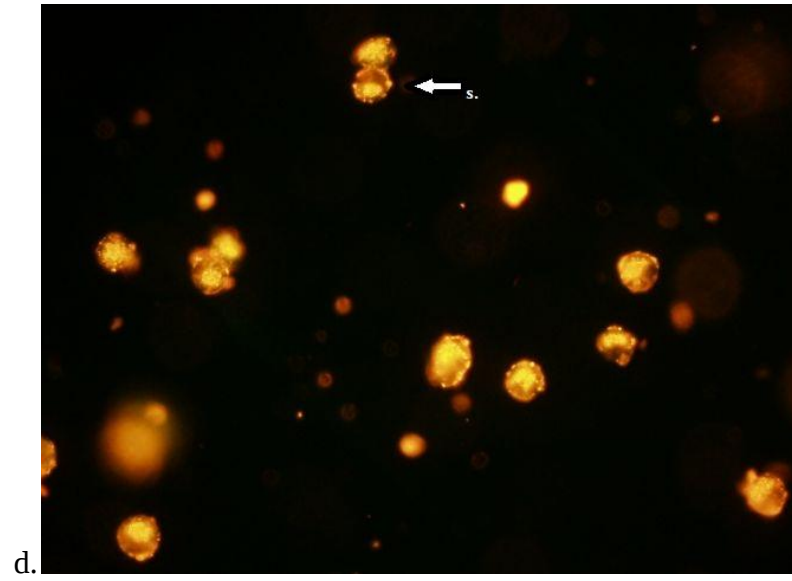
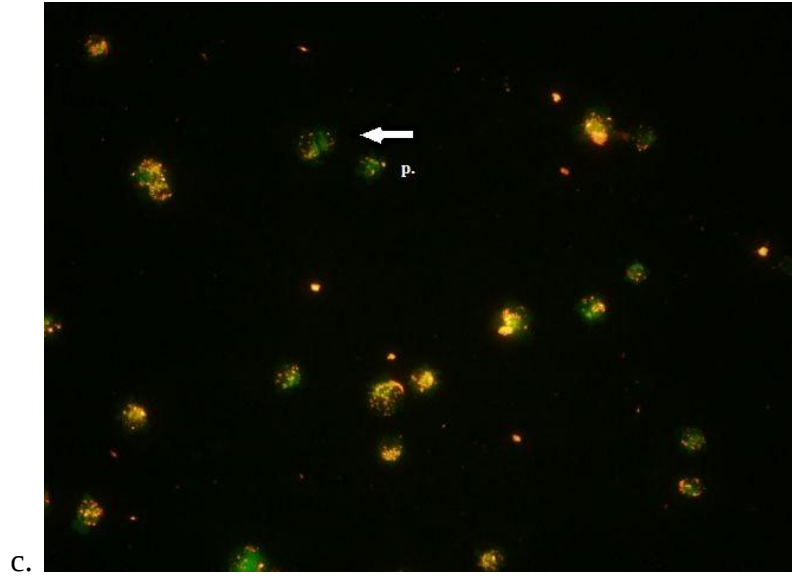
Sodyum perborat'ın; A549 hücreleri üzerine olan etkileri, incelendiği zaman, etkisinin borik asit kadar etkili olmamakla beraber kontrole oranla yüksek apoptoz aktivitesi olduğu gözlenmiştir. Hücrelere verilen 5 mM'lık konsantrasyonun 48. saatteki etkisi incelenmiş ve apoptoz oranının % 65 olduğu saptanmıştır.

Diamonyum tetraborat'ın A549 hücrelerine olan etkilerine bakıldığında ise; apoptoz etkisinin diğer incelenen test bileşenlerine kıyasla az olduğu görülmektedir. Hücrelere verilen 10 mM'lık konsantrasyonun 48. Saat sonundaki apoptoz oranının % 58 olduğu belirtilmiştir.

Sonuçlar, A549 için Tablo 3.1, Şekil 3.19 ve Şekil 3.20'de; MCF7 için ise Tablo 3.2, Şekil 3.21 ve Şekil 3.22'de sunulmuştur.



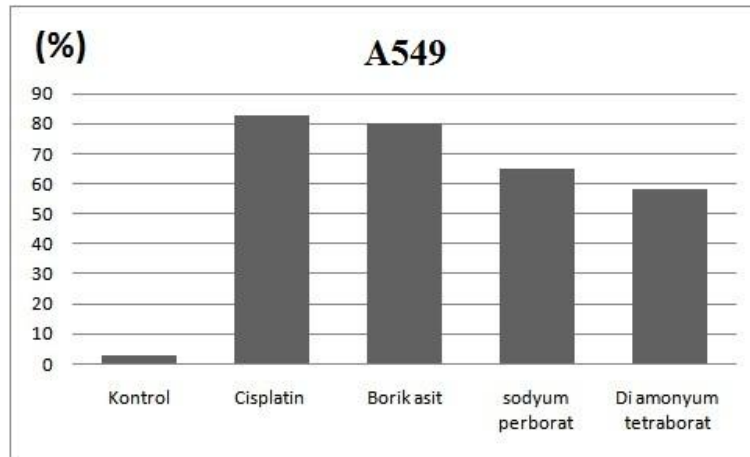
Şekil 3.19. A549 hücresi; a. 5 mM borik asit, b. 5 mM sodyum perborat, c. 10 mM diamonyum tetraborat, d. kontrol, p: apoptotik hücre, s: sağlıklı hücre (X 400).



Şekil 3.19. (Devam) A549 hücresi; a. 5 mM borik asit, b. 5 mM sodyum perborat, c. 10 mM diamonyum tetraborat, d. kontrol, p: apoptotik hücre, s: sağlıklı hücre (X 400).

Çizelge 3.1. A549 hücrelerinde deney maddelerinin etkisiyle oluşan apoptoza uğramış ve sağlıklı hücrelerin toplam sayıları ve % oranları.

A549 Hücresi	Toplam Hücre	Apoptotik Hücre	
		Sayı	%
Kontrol	3867	119	3
Cisplatin (7,5 mM)	460	379	83
Borik asit (5 mM)	1810	1455	80
Sodyum Perborat (5 mM)	539	349	65
Di amonyum tetraborat (10 mM)	1174	670	58

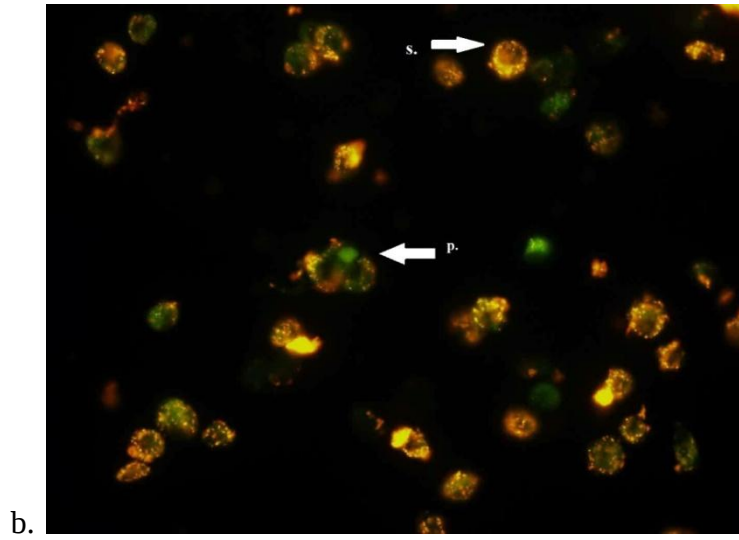
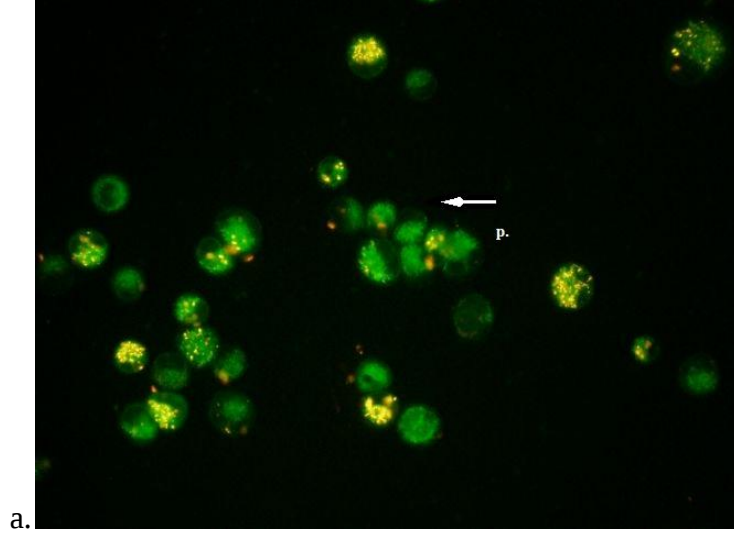


Şekil 3.20. A549 hücrelerinde deney maddelerinin etkisiyle oluşan apoptoza uğramış hücrelerin % oranları.

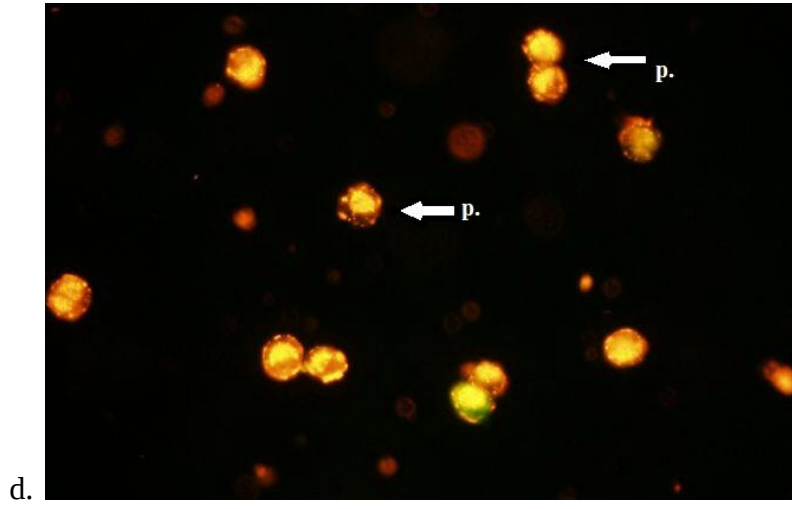
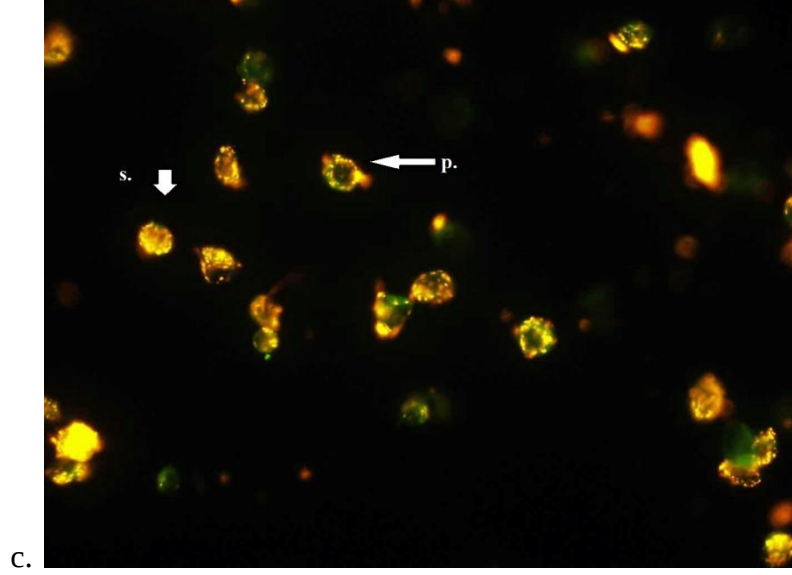
3.3.2. MCF7 meme epitel hücresi mitokondri zar bütünlüğü testi

Borik asit'in, MCF7 hücrelerine olan apoptotik etkisi mitokondriyal zar bütünlüğü bakımından araştırıldığında; hücrelerin % 74'ünün borik asit etkisiyle apoptoza girdiği belirlenmiştir. Apoptotik hücrelerin fotoğrafları Şekil 3.21'de verilmiştir. Sodyum perborat'ın; MCF7 hücreleri üzerine olan etkileri, incelendiği zaman, etkisinin borik asit'e eşdeğer olduğu görülmüştür. Sodyum perborat etkisiyle apoptoza giren hücreler % 74'lük oranla, kontrole göre yüksek apoptoz aktivitesi göstermiştir. Diamonyum tetraborat'ın MCF7 hücrelerine olan etkilerine bakıldığında ise; apoptoz etkisinin diğer incelenen test bileşenlerine kıyasla az olduğu görülmektedir.

Hücrelere verilen 10 mM'lık konsantrasyonun 48. Saat sonundaki apoptoz oranının % 65 olduğu belirtilmiştir.



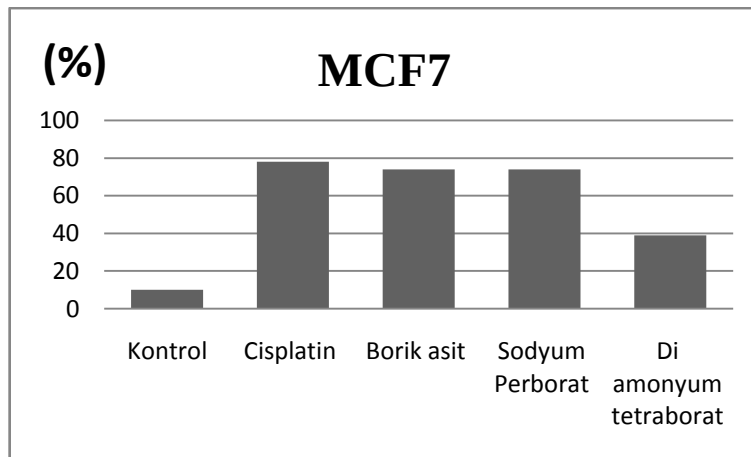
Şekil 3.21. MCF7 hücresi; a. 50 mM borik asit, b.75 mM sodyum perborat, c. 45 mM diamonyum tetraborat, d. kontrol, p. apoptozlu hücre s. sağlıklı hücre, (X400).



Şekil 3.21. (Devam) MCF7 hücresi; a. 50 mM borik asit, b.75 mM sodyum perborat, c. 45 mM diamonyum tetraborat, d. kontrol, p. apoptozlu hücre s. sağlıklı hücre (X400).

Çizelge 3.2. MCF7 hücrelerinde deney maddelerinin etkisiyle oluşan apoptoza uğramış ve sağlıklı hücrelerin toplam sayıları ve % oranları.

MCF7 Hücresi	Toplam	Apoptotik Hücre	
		Sayı	%
Kontrol	2850	300	10
Cisplatin (7,5 mM)	450	350	78
Borik asit (50 mM)	1570	1160	74
Sodyum Perborat (45 mM)	610	450	74
Di amonyum tetraborat (30 mM)	910	340	39

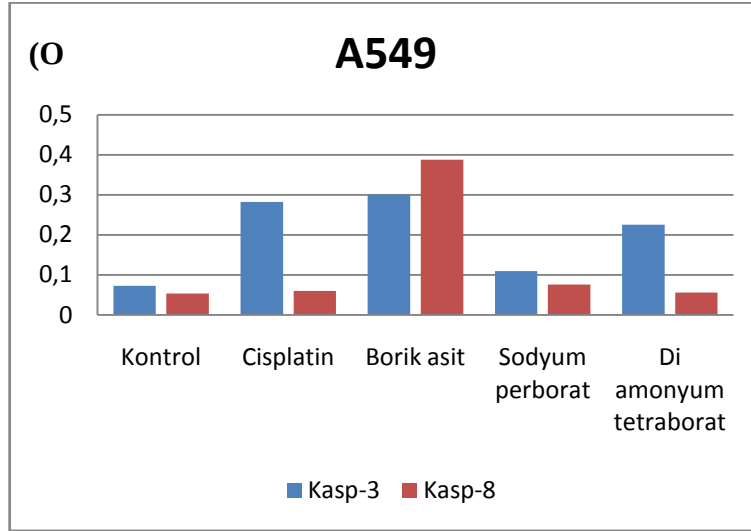


Şekil 3.22. MCF7 hücrelerinde deney maddelerinin etkisiyle oluşan apoptoza uğramış hücrelerin % oranları.

3.4. Kaspaz 3 ve Kaspaz 8 Apoptoz Belirteç Deneyi

3.4.1. A549 adenokarsinoma hücresi kaspaz 3 / 8 apoptoz belirteç deneyi

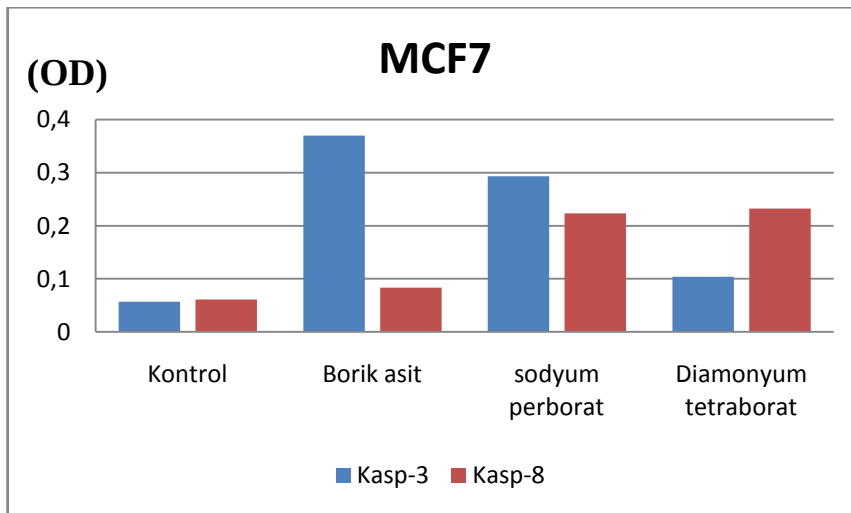
Bor bileşiklerinin A549 hücrelerinde kaspaz 3 aktivasyonunu artırdığı gözlemlenmiştir. Sodyum perborat bu hücrelerde kaspaz 3 ve 8 aktivasyonunda çok zayıf bir artışa neden olurken, borik asit her iki kaspaz enziminde şiddetli bir aktivasyona sebep olmuştur. Diamonyum tetraborat ise, kaspaz 3 aktivasyonunda güçlü bir artışa yol açarken, kaspaz 8 aktivasyonu üzerine herhangi bir etkisi görülmemiştir.



Şekil 3.23. A549 hücrelerinde deney maddelerinin kaspaz aktivasyonuna dayalı apoptotik etkisi.

3.4.2. MCF7 meme epitel karsinoma hücresi kaspaz 3 / 8 apoptoz belirteç deneyi

MCF7 hücreleri ise, bor bileşiklerinin etkisi sonucu kaspaz aktivasyonunda bakından etkin hücreler olduğu gözlemlenmektedir. Kontrol kısmında, kaspaz 3 aktivasyonu oldukça yüksek olmasının yanında; borik asit kontrole yakın bir etki göstermiştir. Sodyum perborat ise; hem kaspaz 3 hem de kaspaz 8 bakımından oldukça aktiftir. Diamonyum tetraborat'ın kaspaz 3 ve kaspaz 8 aktivasyonunu diğer maddelere oranla az olmakla beraber kaspaz 8 açısından kontrole yakın bir değer göstermiştir.

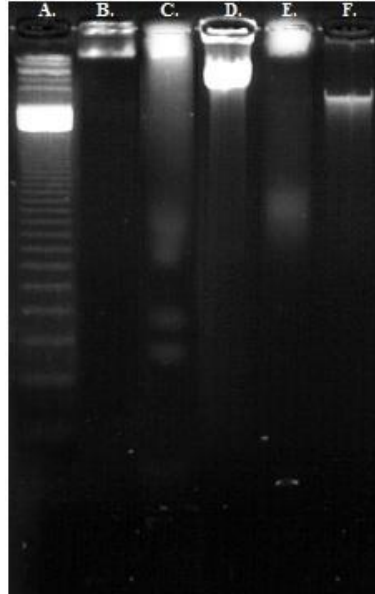


Şekil 3.24. MCF7 hücrelerinde deney maddelerinin kaspaz aktivasyonuna dayalı apoptotik etkisi.

3.5. DNA Jel Elektroforezi ile Fragmentasyon Tayini

Test bileşenlerinin apoptotik etkisinin belirlenmesi amacıyla, DNA kırıklarının gösterilmesi prensibine dayanan agaroz jel elektroforezi; materyal yöntem bölümünde anlatıldığı gibi, Quick Apoptotic DNA Ladder kiti (Biovision,K120) protokolüne uygun olarak yapılmıştır. Apoptozda DNA, internükleozomal bölgelerden kırılır ve merdiven görüntüsü oluştururlar. Sonunda kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu oluşur (Ulukaya 2003).Bu çalışmada, bor bileşenlerinin önceden belirlenen IC_{50} değerleri ve inkübasyon süreleri uygulanmıştır. Deneyler 2'şer kere tekrar edilmiş ve sonuçlar, agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.

A549 hücreleriyle yapılan çalışmada; kontrolde fragmentasyon görülmezken, test bileşenlerinde kırılmalar gözlenmiştir.



Şekil 3.25. A549 hücrelerinde deney maddelerinin etkisiyle oluşan apoptozun etkisi; A. Marker, B. Kontrol, C. Cisplatin, D. 5 mM borik asit, E. 5 mM sodyum perborat, F. 10 mM diamonyum tetraborat.

MCF7 hücreleriyle yapılan çalışmada; bütün test bileşenlerinde fragmentasyon görülmemiştir.



Şekil 3.26. MCF7 hücrelerinde deney maddelerinin etkisiyle oluşan apoptozun etkisi; A. Marker, B. Kontrol, C. Cisplatin, D. 50 mM borik asit, E. 75 mM sodyum perborat, F. 45 mM diamonyum tetraborat.

4. Tartışma ve Sonuç

Bor'un önceki bölümlerde ayrıntısıyla açıklanmış olan çok sayıdaki özelliği ve kullanım alanları göz önüne alındığında, farklı bor bileşenlerinin anti-kanser özelliklerinin araştırılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle, akciğer ve meme kanseri hücre hatlarına olan apoptotik etkilerinin araştırılması amacıyla borik asit, sodyum perborat ve diamonyum tetraborat bileşikleri seçilmiştir. Borik asit dışında sodyum perborat ve diamonyum tetraborat'ın canlı yaşamı ve kanser üzerine etkileriyle ilgili literatürde hemen hemen hiçbir bulguya rastlanmamıştır. Bu çalışma, meme ve akciğer kanserleri üzerinde kullandığımız bor türevlerinin etkisi bakımından alanında ilk araştırmadır.

Bitkiler, hayvanlar ve insanlar üzerine yapılmış birçok çalışma bor'un biyolojik fonksiyonlarda rol oynayan bir iz element olduğunu göstermiştir (Nielsen 2008). Dünyadaki bor yataklarının % 72'si ülkemizde bulunmaktadır (Kar ve ark. 2006) ve Türkiye'nin bor bakımından zengin olan alanlarında asırlardır köy ve şehirlerin kurulması, hayvancılığın gelişmesi ve bitki örtüsündeki çeşitlik, bor'un canlıların yaşaması ve sağlığı üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığını göstermektedir.

Bor ve türevleri üzerine gerek çeşitli sanayi dalları gerekse canlılar ve çevre etkilerinin belirlenmesi için araştırılmalara sıklıkla konu olmaktadır (Doğan ve ark. 2005). Yapılan bir çalışmada; bor madenlerinin ve üretim tesislerinin bulunduğu ve yöre halkının kuşaklar boyu çok miktarda bor bileşenlerine maruz kaldığı Balıkesir, Bursa, Eskişehir ve Kütahya illerinde, toplumların kısırlık (infertilite) oranları araştırılmış ve bu illerde yaşayan insanların kısırlık oranlarının diğer toplumlardan farklı olmadığı gözlemlenerek bor minerallerinin kısırlığa sebep olmadığı gösterilmiştir (Şaylı ve ark. 2003).

Yapılan çalışmalarda, bor'un günlük beslenmede alınması gereken elementlerden biri olduğu belirtilmiştir (Nielsen 2008, Meacham ve ark. 2001). Çevre Koruma Ajansı (EPA; Enviromental Protection Agency) tarafından içme suyunda bulunması gereken bor miktarı 0,6 mg/L. olarak belirtilmiş olmasına rağmen (Parks ve Edwards 2005), mehmet Korkmaz ve arkadaşları'nın 2007 yılında yaptıkları bir

çalışmada, Türkiye'nin bor bakımından zengin (2mg/L.) su kaynaklarının bulunduğu yörelerde yaşayan erkeklerin idrarlarında, günlük 6,77 mg bor atıldığı bildirilmiştir. Diğer yandan, bor madeni bulunmayan bölgelerdeki erkeklerin idrarlarında da 1.26 mg bor atıldığı belirlenmiştir. Yaklaşık on kat daha yüksek bor mineraline maruz kalan erkeklerin herhangi bir sağlık problemine sahip olmadığı da yine bu çalışmada ortaya konmuştur (Korkmaz ve ark. 2007).

Bor'un kemik büyümesi, farklılaşması ve kemik oluşumunda önemli role sahip olduğu bir çalışmaya gösterilmiştir. Yapılan çalışmada; bor'un ancak 1000 ng/ml gibi yüksek bir konsantrasyonunun hücrelerin canlılık oranında azalmaya sebep olduğu gözlemlenebilmiştir. Yine aynı çalışmada, kemik mineralizasyonu üzerine bor'un etkisi araştırılmış ve Ca^{+2} , Mg^{+2} gibi minerallerin emiliminde artış, kemikte mineral kaybında azalma belirlenmiştir. Diğer yandan, kemik dokusunu oluşturan hücreler (osteblast)'lerin farklılaşma ve fonksiyon kazanma mekanizmasında rol alan çeşitli proteinlerin ekspresyonlarında borun önemli rolü olduğu ortaya konmuştur. Yine 100 ng/ml bor varlığında BMP (kemik morfogenetik protein) seviyelerinde de bir artış olduğu bildirilmiştir (Hakkı ve ark. 2010).

Başka bir çalışmada; boraks uygulanan insan lenfositlerinin proliferasyonunda doza bağlı bir azalma görüldüğü bildirilmiştir (Pongsavee 2009). Vanadium tetraoksit ve titanyum dioksit'in insan lenfoma hücrelerinde oluşturduğu proliferasyon indeksinde azalma, mikronuklus (MN), kromozom hasarı (CA) ve kardeş kromozom değişimi (SCE)'nde artma gibi genotoksik etkileri, bu bileşiklerin borik asit ve boraks ile kombinasyon halinde muamelesi sonucunda, bor bileşenlerinin insan lenfositlerinde uyarılan genotoksik etkilere ve DNA'da oluşturulan hasara karşı direnci arttırdığı belirtilmiştir (Geyikoğlu ve Türkez 2008, Türkez 2008). Deterjan ve ağız sağlığı ürünlerinde beyazlatıcı ajan olarak bol miktarda kullanılan sodyum perborat ile yapılan bir çalışmada, fare makrofajlarının ekstrasölüler matrikse tutunma (adherens) indeksi ve hücre morfolojisi üzerinde etkili olmadığı, çekirdek morfolojisinin sağlıklı makrofajlarla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Asfora ve ark. 2005). 1187 erkek üzerinde kan, semen ve idrar parametreleri üzerine kronik bor alımının etkilerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada, bor madeninde çalışan, madenin çevresinde yaşayan ve

hiçbir şekilde bor'a maruz kalmayan erkeklerin kan semen ve idrar parametrelerinde anlamlı bir fark olmadığı saptanmıştır (Robbins ve ark. 2010).

Bu sonuçlar göstermiştir ki; bor bileşikleri sağlıklı hücrelerde sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip değildir, dolayısıyla bor türevli maddeler vücuda ilaç olarak alınımında herhangi bir sıkıntı olmaması çeşitli hastalıkların tedavisinde bor türevli maddelerin rahatlıkla kullanılabileceğini göstermiştir.

Bor'un kanserli hücre hatlarının çoğalmasını durdurduğunu gösteren çalışmalar son yıllarda artış göstermektedir. Özellikle borik asit'in prostat kanserinin tedavi ve engellenmesindeki etkileri birçok çalışmayla gösterilmiştir. Gallardo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, fareler androjene hassas prostat adenokarsinoma (LNCaP) hücreleri enjekte edilerek transgenik hale getirilmiştir. Bu hayvanlarda borik asit'in tümör gelişimini % 38 oranında baskıladığı, aynı zamanda plazma PSA (prostat spesifik antijen) seviyesini de % 88 oranında düşürdüğü gösterilmiştir. Kanserli hücrelerde yüksek seviyede bulunan PSA fibronektin gibi ekstraselüler matriks proteinlerini parçalayarak tümörün büyümesine ve metastaz yapmasına sebep olmaktadır. Borik asit'in PSA seviyesini düşürmesi, prostat kanseri ile mücadelede önemli bir bulgudur (Gallardo-Williams ve ark. 2004). Yine aynı ekibin yaptığı diğer bir çalışmada ise, borik asit ve NPBA (3-nitrofenil boronik asit)'in prostat kanserinde PSA'nın in vitro inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Gallardo-Williams 2003). Borik asit'in prostat kanseri üzerindeki hücresel değişimleri incelenmiş, beslenmeyle alınan bor bileşenlerinin prostat kanseri riskini azalttığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, borik asit'in DU-145 prostat kanseri hücrelerinde, ryanodin reseptörleri tarafından aktive edilen Ca^{+} salınımını baskıladığı bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada, kandaki borik asit miktarının yüksek tutulması sonucunda hücreler arası Ca^{+} salınımının engellenmesiyle prostat kanserine yakalanma riskinin azaltılabileceği önerilmiştir (Henderson ve ark. 2009). Barranco ve arkadaşları da aynı hücre hattında yaptığı bir çalışmayla borik asit'in NAD^{+} ve $NADP^{+}$ 'yi baskılayıp Ca^{+2} salınımını engelleyerek kanserli hücrelerin büyümesini durdurduğunu göstermiştir (Barranco ve ark.2007). Barranco ve Eckhart tarafından yapılan çalışmada, borik asit etkiyle prostat kanseri hücreleri (DU-145)'nde yüksek oranda granül, hücrede büzülme ve basıklaşma olduğu bildirilmiştir. Bunun yanında, borik asitin hücrelerde yaşlanma belirteci olan β -galaktozidaz enzim aktivasyonunu

arttırarak hücrelerin yaşlanmasını hızlandırdığı gösterilmiştir (Barranco ve Eckhert 2004).

İnsan kemik iliği kanseri olan K562 hücrelerinde borik asit'in hücre çoğalmasını doz ve zamana bağlı olarak engellediği gözlenmiştir. 12 mM borik asit ile 96 saat boyunca inkübe edilen hücrelerin çoğalmasının % 83 oranında azaldığı belirtilmiştir (Ah ve ark. 2010). 2008 yılında Mahabir ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma, kadınlarda beslenmeyle bor alımının akciğer kanserine yakalanma riskinin azaldığını göstermiştir (Mahabir ve ark. 2008).

2007 yılında yapılan bir çalışmada borik asit ve sodyum tetraborat'ın lösemi hücreleri ve sağlıklı insan lenfositleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri araştırılmıştır. Buna göre sağlıklı lenfositlere oranla akut lösemi hücrelerinde bor bileşenlerinin daha fazla apoptotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Borik asit'in genotoksik etkisi her iki hücre grubunda da zayıf oranda görülürken, akut lösemi hücrelerinde mitokondrilerde bozulmaya yol açtığı bildirilmiştir. Akut lösemi hücrelerinde her iki bor bileşiğinin sitotoksik etkiye sahip olduğu gözlenmiş, sağlıklı lenfositlerde ise sadece zayıf oranda bir sitotoksik etki rapor edilmiştir. Bu etkinin mitokondri üzerinden gerçekleştiği anlaşılmıştır (Cantürk 2007).

Bir proteozom inhibitörü olan bortezomib (Velcare® dipeptid boronik asit analogu), ilk kez 1995 yılında sentezlenen ve ticari olarak piyasaya sürülen bir kemoterapötik ilaçtır ve miyeloma, kronik lösemi, prostat, pankreas ve kolon kanserlerinin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Adams ve Kauffman 2004). Yapılan bir çalışmada, hepatoselüler karsinoma hücrelerinde bortezomib'in doz ve zamana bağımlı olarak hücre canlılığını azalttığı görülmüştür (Baiz ve ark. 2009). 2010 yılında yapılan başka bir çalışmada ise, Hodgkin's lenfoma kanserinin alt tipi olan MCL (mantle lenfoma) kanserinde bortezomib etkisi araştırılmıştır. p53 ile MDM2 (Murine Double Minute 2) proteini arasındaki etkileşimi inhibe etme özelliğine sahip, MDM2 antagonisti olan Nutlin-3 molekülü ile bortezomib kombinasyonunun MCL hücreleri üzerinde mitokondriyel yolak üzerinden apoptozu indüklediği gösterilmiş ve bu kombinasyonun Hodgkin's lenfoma tedavisinde kullanılabileceği önerilmiştir (Jin ve ark. 2010).

İnsan deri melanoma hücreleri üzerine yapılan diğer bir çalışmada ise, borik asit'in melanoma hücrelerin (SK-MEL28) çoğalmasını durdurduğu belirtilmiştir. FTIRI (fourier transform infrared imaging) analiz sistemi sonuçlarına göre, borik asit'in hücrelerin lipit/protein oranlarında anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı, nükleik asit/protein oranında ciddi bir azalmaya sebep olduğu ve aynı zamanda hücrenin apoptoza yöneldiği bildirilmiştir (Acerbo ve Miller 2009).

Çalışmamızda borik asit, sodyum perborat ve diamonyum tetraborat'ın sitotoksik ve apoptotik etkileri meme ve akciğer kanser hücrelerinde farklı yöntemlerle gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda borik asit'in doza bağlı sitotoksik etkisi ancak 48 saatlik inkübasyon sonunda, 50 mM gibi yüksek bir konsantrasyonda gözlenmiştir. Scori ve arkadaşlarının MDA-MB-231 meme kanseri hücreleriyle yaptığı bir çalışmada ise, borik asit'in doza bağlı sitotoksik etkisi araştırılmış ve 22,5 mM borik asit uygulandığında, 24 saatin sonunda % 40 oranında sitotoksik etki tespit edilmiştir (Scori ve ark. 2008). Hem bu çalışmanın hem de bizim çalışmamızın bulgularına göre, borik asit'in meme kanseri hücreleri üzerinde zayıf sitotoksik etkiye sahip olduğu anlaşılmıştır. Ancak iki çalışmanın sonuçları kıyaslandığında, sitotoksik etki bakımından bir fark görülmektedir. Bizim bulgularımız, borik asit'in meme kanseri hücreleri (MCF-7) üzerindeki sitotoksik etkisinin daha zayıf olduğunu göstermiştir. Bu farklılığın iki ayrı çalışmada kullanılan meme kanseri hücre hatlarının farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Başka bir çalışmada; fenilborik asit ve borik asit'in meme kanseri hücre hatları olan ZR-75-1 ve MCF7 hücreleri üzerinde hücre proliferasyonuna ve apoptoza olan etkileri araştırılmıştır. Sonuç olarak; borik asit ve fenilborik asit'in hücre proliferasyonunda doza bağlı etkisinin olduğu belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada, hücre ölüm nedenlerinin, apoptoz ya da nekrozdan hangisinden kaynaklandığı morfolojik olarak araştırılmış ve hücre ölümünün apoptozla gerçekleştiği tespit edilmiştir (Elegbede 2007). Bizim çalışmamızda da bor bileşenlerinin yalnızca yüksek konsantrasyonlarında sitotoksik etki görülmüştür. Mitokondriyal zar geçirgenliğindeki değişimin morfolojik olarak incelenmesi sonucunda, hücre ölüm şeklinin apoptoz yoluyla gerçekleştiği özgül olarak floresan yöntemlerle gösterilmiştir. Bu bilgi, meme kanserinde borik asit için elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir.

Apoptoz belirleyici parametrelerden olan mitokondri zar bütünlüğündeki değişim incelendiğinde, meme kanseri hücrelerinin borik asit etkisiyle diğer bor bileşenlerine göre daha büyük oranda (% 70) apoptoza yöneldikleri ortaya konmuştur. Mitokondrinin apoptozun düzenlenmesinde anahtar rol oynadığı birçok çalışmada rapor edilmiştir (Lee ve Kleiboeker 2007, Chen ve ark. 2009). Memelilerde Bcl-2 protein ailesi, apoptozun mitokondriyel yolağında görev alan “apoptoz ilişkili proteinler” olarak bilinmektedirler. Mitokondri yüzeyine bağlanarak hücre içine Sitokrom C salınımını başlatırlar. İyonize radyasyon, kemoterapötik ajan uygulaması ve reaktif oksijen türleri gibi stress koşulları, Bcl-2 protein ailesi üyelerinden bax ve bak mitokondri zarının seçici geçirgenliğini bozarak sitokrom C’nin sitoplazmaya fazla miktarda salınımına yol açmakta ve bu şekilde apoptozu indüklemektedirler (Yonekawa ve Akita 2008). Bcl-2 proteini ise, bax ve bak proteinlerini inhibe ederek apoptozu engellemektedir. Bizim çalışmamızda sitoplazmadaki sitokrom C seviyeleri değerlendirilmiş ve borik asit etkisiyle meme kanseri (MCF7) hücrelerinin sitoplazmasında sitokrom C seviyelerinde önemli ölçüde artış gözlenmiştir. Bunun yanında, çalışmamızda borik asit’in meme kanseri hücrelerinde apoptoz mekanizmasını iç ya da dış yoldan hangisiyle başlattığını belirlemek adına, kaspaz 3 ve 8 aktivasyonları belirlenmiştir. Bilindiği üzere; kaspazlar birçok apoptotik yolda rol oynayan molekülüdür. Kaspaz aktivasyonunu düzenleyen faktörlerin ortaya çıkarılması; kanserli hücrelerin apoptoza yönelme mekanizmalarını anlayabilmek ve yeni tedavi stratejilerini belirleyebilmek açısından çok önemlidir (Odonkor 2008). Kaspaz 8 başlatıcı kaspaz iken kaspaz 3 efektör kaspaz olarak görev yapmaktadır (Li 2010). Yapılan bir çalışmada; borik asit’in meme kanseri üzerindeki apoptoza olan etkisinin FAK (fokal adhezyon kinaz) proteiniyle olan ilişkisi araştırılmıştır. Birçok kanserli hücre hattında yüksek miktarda üretilen ve integrin ilişkili sinyal yolağında görev alan FAK proteini üzerinde oluşan fosforilasyon, apoptozu baskılamakta ve hücreyi göçe sürüklemektedir. Yapılan çalışmanın sonucunda, borik asit’in meme kanseri hücrelerinde FAK fosforilasyonunu 4 kat azaltırken kaspaz 3 seviyesini arttırdığı belirtilmiştir (Meacham ve ark. 2010). Bizim çalışmamızda da borik asit etkisiyle kaspaz 3 aktivasyonunda 3 kat artış gözlenmiş ancak, kaspaz 8 seviyesinde zayıf bir artış gözlenmiştir. Görülen bu etki Meacham’ın bulgularıyla uyumludur.

Mitokondri zar geçirgenliğindeki değişim ve kaspaz aktivasyonları ile ilgili bulgular birlikte değerlendirildiğinde, borik asit'in meme kanseri hücrelerini mitokondriyal (iç) yolak üzerinden apoptoza yönelttikleri düşünülmektedir.

Sodyum perborat bileşiğinin meme kanseri üzerinde yaklaşık % 70 oranında mitokondriyel yolaktan apoptoza yol açtığı tespit edilmiştir. Ancak, kaspaz aktivasyonları ölçüldüğünde hem kaspaz 3 hem de kaspaz 8'in eşit oranda ve kontrole göre 4 kat yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu apoptoz mekanizmasının iç ya da dış yolaktan hangisiyle gerçekleştiğini belirlememiz bakımından oldukça ilginç bir sonuçtur. Bilindiği gibi, iç yolak aktif olduğunda mitokondriyel sitokrom C'nin sitoplâzmaya çıkması ve apoptozom oluşumuyla apoptoz başlamaktadır (Bonaféve ark. 2009). Devamında kaspaz 3'ün aktivasyonunda artış gözlenmektedir. Dış yolak aktif olduğunda ise, kaspaz 8 aktivasyonunda anlamlı bir artış gözlenmektedir. Bizim bulgularımızda ise her iki kaspaz aktivasyonunun da yüksek olduğu görülmüştür. Barbero ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, kaspaz 8'in aktivasyonundaki artışın hücrelerin metastaz faaliyetinde etkin olduğu belirtilmiştir Yine aynı çalışmada kaspaz 3 ve 8'in birlikte aktif olduğunda, apoptoz tehlikesi altındaki hücrelerde metastaz görülme sıklığında azalmaya neden olduğu da belirtilmiştir (Barbero ve ark. 2009). Bu bilgi, bizim sodyum perborat için elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir. Sonuç olarak; sodyum perborat'ın meme kanseri hücresinde apoptozu iç (mitokondriyel) yolakla uyardığı ve kaspaz 3 ve 8 aktivasyonlarındaki artışın da meme kanseri hücrelerinin metastaz eğilimini azaltmak yönünde etki gösterdiği düşünülmüştür.

Diamonyum tetraborat bileşiğinin meme kanseri hücrelerini mitokondriyel yolak üzerinden yaklaşık % 40 oranında apoptoza yönelttiği belirlenmiştir. Ancak bu bileşik hücrede kaspaz 8 aktivasyonunda anlamlı bir artışa neden olmuştur. Meme kanseri hücresinde diamonyum tetraborat'ın dış yolak ile apoptozu başlattığı düşünülmektedir. Sitoplazmada Sitokrom C miktarındaki zayıf artışın apoptozun geç evrede tespit edilmesinden kaynaklandığı ve yine sodyum perborat'ta olduğu gibi hücrelerin metastaz eğilimlerini düşürdüğü tahmin edilmektedir. Yapılan literatür çalışmalarında, hem sodyum perborat hem de diamonyum tetraborat'ın meme kanseri hücrelerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri ile ilgili yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Araştırmamız bu alanda ilk ön çalışma niteliğindedir. Her iki bor bileşeninin gerek

meme kanseri gerekse diğer kanser türleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve olası etkilerin mekanizmalarının aydınlatılması için ileri seviyede araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Akciğer kanseri hücrelerinde (A549), borik asit, sodyum perborat ve diamonyum tetraborat'ın 5-10 mM arasında değişik konsantrasyonları kullanılarak yapılan çalışmalarda doza bağlı sitotoksik etki gösterdikleri saptanmıştır. Her üç bor bileşiğinin de akciğer kanseri (A549) hücrelerinde çoğalmayı azalttığı belirlenmiştir.

Borik asit bileşiği akciğer kanserli hücrelerde güçlü apoptotik etki göstermiştir. Yaklaşık % 80 oranında mitokondriyal yolak üzerinden hücrelerin apoptoza sürüklendiği gözlenmiştir. Bununla birlikte, kaspaz aktivasyonları ölçüldüğünde kaspaz 3'ün 3 kat kaspaz 8'in ise, 4 kat artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgu apoptoz mekanizmasının iç ya da dış yolağın hangisiyle olduğunun belirlenmesi açısından şaşırtıcı bir bilgidir. Meme kanserinde olduğu gibi, FAK fosforilasyonunu azaltarak kanser hücrelerinin göç yeteneklerini kısıtlayarak metastaz eğilimini azalttığı (Meacham ve ark. 2010) ya da apoptoz tehlikesi altındaki hücrelerde kaspaz 3 ve 8'in birlikte aktif olarak, metastaz görülme sıklığını azalttığı yorumu yapılabilmektedir (Barbero ve ark. 2009). Ancak, farklı bir çalışmada POX (Prolin oksidaz) enzimi'nin DLD-1 (Kolonorektal kanser)'de hem iç hem de dış yolağı aktive ettiği belirtilmiştir (Liu ve ark. 2006). Bizim çalışmamızda da borik asit hem kaspaz 8 aktivasyonunu artırdığı hem de mitokondriyal yolağın etki göstermesi sebebiyle, iç ve dış yolağın her ikisinin de etkin olabileceği düşünülmüştür. Borik asit'in akciğer ve meme kanseri hücrelerinde sergilediği apoptotik etkinin hangi mekanizmayla gerçekleştiğinin kesin biçimde anlaşılması için apoptoz yollarında işe karışan diğer genlerin ekspresyon seviyelerinin ve eksprese edildikleri süreçlerin belirlenmesi gerekmektedir.

Sodyum perborat ve diamonyum tetraborat bileşiklerinin akciğer kanserinde mitokondriyal yolağın etki göstermesinin yaklaşık olarak sırasıyla % 65 ve % 55 oranında olduğu belirlenmiştir. Ancak bileşiklerin kaspaz 8 aktivasyonlarında herhangi bir etki görülmemiş, kaspaz 3 oranlarında ise sodyum perborat'ta çok zayıf bir artış ve diamonyum tetraborat'ta ise, 2 katlık bir artış olduğu gözlenmiştir. Akciğer kanseri hücresinde sodyum perborat ve diamonyum tetraborat'ın iç yolağın etki göstermesiyle apoptozu başlattığı düşünülmektedir. Akciğer kanseri ile ilgili yapılan literatür taramalarında, bor

bileşenlerinin apoptotik ve sitotoksik etkilerini gösteren verilere rastlanmamıştır. Araştırmamız bu alanda ilk ön çalışma niteliğinde olması sebebiyle, sonuçlarımızın kıyaslanacağı bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Gözlenen etkilerin farklı apoptoz belirleme yöntemleriyle tekrarlanması ve apoptoz yollarındaki genlerin ekspresyon seviyelerinin tespit edilmesi gerekmektedir.

Araştırmamızda, borik asit bileşiğinin meme kanseri hücrelerinin akciğer kanseri hücrelerine oranla daha yüksek konsantrasyonda sitotoksik etkisi görülmüştür. Ayrıca meme kanserinde % 70 oranında bir apoptotik etkiye sahipken akciğer kanserinde bu oranın % 80 olduğu saptanmıştır. Bu durum akciğer kanseri hücrelerinin borik asit'e daha duyarlı olduğunu düşündürmektedir.

Sodyum perborat ile ilgili yapılan çalışmalarda meme kanserinde yüksek konsantrasyonda sitotoksik etki gözlenirken akciğer kanserinde sitotoksik etkinin daha düşük konsantrasyonlarda ortaya çıktığı saptanmıştır. Apoptoz belirleme çalışmaları sonunda, meme kanserinde % 70, akciğer kanserinde ise % 65 oranında apoptoz belirlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında, sodyum perborat'ın hem meme hem de akciğer kanserinde eşit seviyede apoptoza neden olduğu söylenebilir.

Diamonyum tetraborat'ın meme kanseri hücrelerinde, akciğer kanser hücrelerine oranla daha yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdikleri saptanmıştır. Yapılan apoptotik değerlendirmeler sonucunda, diamonyum tetraborat'ın meme kanseri hücrelerini % 40, akciğer kanserini % 65 oranında apoptoza sürüklediği görülmüştür. Bu durum akciğer kanseri hücrelerinin diamonyum tetraborat'a karşı meme kanseri hücrelerine göre daha hassas olduklarını düşündürmüştür.

Sonuç olarak, elde edilen bütün bulgular değerlendirildiğinde, akciğer kanseri hücrelerinin test edilmiş olan bor türevlerine karşı meme kanserinden daha fazla duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bu farkın, bor bileşenlerinin hücrelerde başlattıkları apoptoz süreçlerinin mekanizmalarındaki farklılıktan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kullanılan bor bileşenlerinin hem akciğer kanseri hem de diğer kanser türleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve etki mekanizmalarının aydınlatılması için ileri seviyede araştırmaların yapılması gerekmektedir. Gelecek çalışmalarımızda, tespit edilen sitotoksik ve apoptotik etkilerin mekanizmalarının aydınlatılabilmesi için söz konusu yollarda işe karışan çok sayıda gen gruplarının ekspresyon seviyelerini

araştırmayı, bu gen ürünlerinin birbirleri üzerindeki etkilerini belirlemeyi planlamaktayız. Ayrıca, bu mekanizmaların farklı mekanizmalarla olan olası etkileşimlerinin de incelenmesi, kanserle savaşta önemli adımlar olacaktır. Test edilmiş olan bor bileşenlerinin farklı kanser türlerindeki apoptotik etkilerinin de araştırıldığı çalışmalar laboratuvarımızda halen devam etmektedir.

Bor üzerine yapılan çalışmaların ilerlemesi ve bor bileşiklerinin ilaç ham maddesi olarak kullanılabilmesi hem yeni tedavi yaklaşımlarının ortaya çıkmasına yol açacaktır. Sitotoksik etkileri son derece düşük, apoptotik etkileri yüksek olan ve birçok farklı kanser türünde etkin olabilen böylesi bileşenlerin ilaç yapımında etken madde olarak kullanılması kanser tedavisinde önemli bir basamak olacaktır. Dünyanın en zengin bor madenlerine sahip olan ülkemizin öz kaynaklarıyla geliştirilecek olan bir kemoterapi ilacı daha ucuz maliyetle üretileceğinden, hem kanser hastalarının hem de ülkemizin ekonomisine ciddi katkıda bulunacaktır. Bu çalışmanın bor bileşenlerinin farklı kanser türleri üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesi adına gelecek çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abramov, A.Y. ve Duchen, M.R. (2008), "Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, **8**, 953-964.
- Acerbo, A. S. ve Miller, L. M. (2009), "Assessment of the chemical changes induced in human melanoma cells by boric acid treatment using infrared imaging," *Analyst*, **134**, 1669-1674.
- Adams, J. ve Kauffman, M. (2004), "Development of the proteasome inhibitor velcade," *Cancer Investigation*, **22**, 304-311.
- Ah, A., Ma, M. ve Ma, H. F. (2010), "The inductive effect of boric acid on growth inhibition and differentiating changes of human chronic myeloid leukemia K562 cell line," *Arak Medical University Journal.*, **13**, 1-11.
- Ahmad, S., Ahmad, A., Schneider, K. B. ve White, C. W. (2006), "Cholesterol interferes with the MTT assay in human epithelial-like (A549) and endothelial (HLMVE and HCAE) cells," *International Journal of Toxicology*, **25**, 17-23.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. ve Walter, Peter. (2002), "Molecular Biology of the Cell," Garland Science, New York, A.B.D.
- Alkan, M. (1985), *Bazı bor minerallerinin kükürt dioksitli sulardaki çözünürlükleri*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Kâzım Karabekir Eğitim Fakültesi, Erzurum.
- Alosi, J., McDonald, D. E., Schneider J.S., Privette A. R. ve McFadden, D. W, (2010), "Pterostilbene inhibits breast cancer *in vitro* through mitochondrial depolarization and induction of caspase-dependent apoptosis," *Journal of Surgical Research*, **161**, 195-201.
- Andoh, T., Fujimoto, T., Sudo, T., Fujita, I., Imabori, M., Moritake, H., Sugimoto, T., Sakuma, Y., Takeuchi, T., Kawabata, S., Kiriata, M., Akisue, T., Yayama, K., Kurosaka, M., Miyatake, S., Fukumori, Y. ve Ichikawa, H. (2011), "Boron neutron capture therapy for clear cell sarcoma(CCS): Bio distribution study of p-borono-L-phenylalanine in CCS-bearing animal models," *Applied Radiation and Isotopes*, **81**, 843-969.

- Arı, Z., ve Kosova, F., (2011), “Prostat kanseri ve apoptozis ilişkisi,” *Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi*, **2**, 124-131.
- Asfora, K.K., Santos, M., Montes, M. ve Castro, C. (2005), “Evaluation of biocompatibility of sodium perborate and 30% hydrogen peroxide using the analysis of the adherence capacity and morphology of macrophages,” *Journal of Dentistry*, **33**, 155–162.
- Atıcı, E., (2007), “Tıp tarihinde kanser ve lösemi,” *Türk Onkoloji Dergisi*, **22**, 197-204.
- Baiz, D., Pozzato, G., Dapas, B., Farra, R., Scaggiante, B., Grassi, M., Uxa, L., Giansante, C., Zennaro, C., Guarnieri, G. ve Grassi, G. (2009), “Bortezomib arrest the proliferation of hepatocellular carcinoma cells HepG2 and JHH6 by differentially affecting E2F1, p21 and p27 levels,” *Biochimie*, **91**, 373-382.
- Bakkalcı, C. (2007), “Borun önemi ve Türkiye’de bor” *TİSK Akademi*, **4**, 248-268.
- Barbero, S., Mielgo, A., Torres, V., Teitz, Tal., Shields, D. J., Mikolon, D., Bogoy, M., Barilà, D., Lahti, J. M., Schlaepfer, D. ve Stupack, G. (2009), “Caspase 8 association with the focal adhesion complex promotes tumor cell migration and metastasis,” *Cancer Res.*, **69**, 3755–3763.
- Barranco, W. T., Eckhert, C.D. (2004), “Cellular changes in boric acid-treated DU-145 prostate cancer,” *British Journal of Cancer*, **94**, 884 – 890.
- Barranco W. T., Hudak P. F., Eckhert C.D., (2007), “Evaluation of ecological and in vitro effects of boron on prostate cancer risk (United States),” *British Journal of Cancer*, **35**, 750-761.
- Baylin, B., Esteller, M., Sanchez-Cespedes, M., Rosell, R., Sidransky, D. ve James, G., (1999), “Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients,” *Cancer Research*, **59**, 67–70.
- Bennetts, P. S. ve Pierce, J. D., (2010). “Apoptosis: understanding programmed cell death for the CRNA,” *AANA Journal*, **78**, 3-10.
- Bertero, C., Vanhanen, M. ve Appelin, G., (2008), “Receiving a diagnosis of inoperable lung cancer: patients’ perspectives of how it affects their life situation and quality of life,” *Acta Oncologica*, **47**, 862-869.

- Bindea, G., Mlecnik, B. ve Fridman, W. (2010), "Natural immunity to cancer in humans," *Current Opinion in Immunology*, **22**, 215–222.
- Bolaños, L., Lukaszewski, K., Bonilla, I. ve Blevins, D. (2004) " Why boron?," *Plant Physiology and Biochemistry*, **42**, 907–912.
- Bonafé, P.G., Tortosa A. ve Pérez R., (2009), "Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells," *University of Barcelona, Spain , Current Cancer Drug Targets*, **9**, 320-340.
- Buluttekin, M.B. (2008), "Maden ekonomisi: Türkiye'nin dünya bor piyasasındaki yeri," Ulusal İktisat Kongresi Dokuz Eylül Üniversitesi İktisat Bölümü 20-22 Şubat, İzmir, Türkiye.
- Burz, C., Berindan, I., Balacescu, O. ve Irimie, A. (2009), "Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets," *Acta Oncologica*, **48**, 811-821.
- Camaş, M., (2006), *Borun genotoksik etkilerinin hordeum vulgare l. üzerinde incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- Cantürk, Z., (2007), *Bor bileşiklerinin lösemi hücrelerine venormal lenfositlere olan etkisinin hücrekültüründe ve transmission (geçirimli) elektron mikroskopunda incelenmesi*, Yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalı İmmüno-Hematoloji Bilim Dalı, Eskişehir.
- Cao, J., Jiang, I., Zhang, X., Yao, X. ve Geng, C. (2008), "Boric acid inhibits LPS-induced TNF-a formation through a thiol- dependet mechanism in THP-1 cells," *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **22**, 189-195.
- Cecconi, F., Roth, K.A., Dolgov, Munarriz, O. E., Anokhin, Gruss, K. P. ve Salminen, M. (2004), "Apaf1-dependent programmed cell death is required for inner ear morphogenesis and growth," *Development*, **131**, 2125–2135.
- Chen, Y., Lv, W., Chen, H., Ye , F. ve Xie, X., (2009), "Methotrexate induces apoptosis of human choriocarcinoma cell line JAR via a mitochondrial pathway," *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol., Eapr*, **143**, 107-11.

- Ciofani, G., Danti, S., D'Alessandro, D., Moscato, S. ve Menciassi, A. (2010), "Assessing cytotoxicity of boron nitride nanotubes: interference with the MTT assay," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **394**, 405-411.
- Cohen, G. M., (1997), "Caspases: the executioners of apoptosis," *Biochem. J.*, **326**, 1-16.
- Coolbaugh, M. F., Kratt C., Sladek, C., Zehner E. ve Shevenell L. (2006), "Quaternary borate deposits as a geo thermal exploration tool in the great basin," *GRC Transactions*, **30**, 512-523.
- Cutler, G. J., Nettleton, J., Ross, J., Harnack, L., Jacobs, D. R., Scrafford, C., Barraji, L. M. Mink, P. J. ve Robien, K., (2008), "Dietary flavonoid intake and risk of cancer in post menopausal women: the iowa women's health study," *Int. J. Cancer*, **123**, 664-671.
- Çolak, M., Baysal, E., Çolak, A.M., Özen, E., Toker, H., (2004), "Borlu ve su itici maddelerle muamele edilen cennet ağacı odununda (*aëanthus altissima* (mill.) swingle) higroskopisite seviyeleri," 2.Uluslararası Bor Sempozyumu, 23-25 Eylül 2004 Eskişehir, Türkiye.
- Dagrosa, M. A., Crivello, M., Perona, M. ve Gustavo, A. (2011), "First evaluation of the biologic effectiveness factors of boron neutron capture therapy (bnct) in a human coloncarcinoma cell line," *International Journal of Radiation Oncology Biology, Physics*, **79**, 262-268.
- Devlet Planlama Teşkilatı Müsteşarlığı, Kimya Sanayi Hammaddeleri Çalışma Grubu (1995), *Bor Mineralleri Trona Sodyum Sülfat Stronsiyum Mineralleri Tuz raporu*. Yayın No: Dpt : 2414 – Öik: 474.
- Dieter, M.P., (1994), "Toxicity and carcinogenicity studies of boric acid in male and female B6C3F1 mice, environmental health perspectives," *Nature*, **102**, 93-97.
- Doğan, G., Sabah, E. ve Erkal, T. (2005), *Borun çevresel etkileri üzerine Türkiye'de yapılan bilimsel araştırmalar*, Türkiye 19. Uluslararası Madencilik Kongresi, 09-12 Haziran, İzmir, Türkiye.

- Dordas, C. ve Brown, P. H. (2005) "Boron deficiency affects cell viability, phenolic leakage and oxidative burst in rose cell cultures," *Plant and Soil*, **268**, 293–301.
- Elegbede, F. (2003), *Boric acid inhibits cell growth and induces apoptosis in breast cancer cells*, Doktora Tezi, Nevada üniversitesi, Fen Bilimleri enstitüsü, Lasvegas.
- Elmore, S., (2007), "Apoptosis: a review of programmed cell death," *Toxicologic Pathology*, **35**, 495–516.
- Fail, P. A., George, J. D., Sauls, S. W., Dennis, S. W. ve Andseely, J. C. (1989), "Effect of boric acid on reproduction and fertility of rodents," *Advcontracept deliviyst.*, **5**, 323-333.
- Faust, A., Hermann, S., Wagner, S., Haufe, G., Schober, O., Schäfers, M. ve Kopka, Klaus. (2009), "Molecular imaging of apoptosis *in vivo* with scintigraphic and optical biomarkers – a status report," *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, **9**, 968-985.
- Florian, M., Freimoser, C. A. ve Jakob, M. A., (1999), "The Mtt [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] assay is a fast and reliable method for colorimetric determination of fungal cell densities," *Applied And Environmental Microbiology*, **65**, 3727–3729 .
- Friedenreich, C. M. (2011), "Physical activity and breast cancer: review of the epidemiologic evidence and biologic mechanisms," *Recent Results in Cancer Research*, **188**, 125-139.
- Fulda, S., (2011), "Targeting apoptosis signaling in pancreatic cancer," *Cancers*, **3**, 241-251.
- Gabriel S. B., Weinstock, G. M., Varmus, H. E. Eric Lander, S., Gibbs, R. A., Meyerson, M. ve Wilson, R. K., (2008), "Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma," *Nature*, **455**, 1069-107.
- Gal, A. B. ve Shani, U. (2003), "Water use and yield of tomatoes under limited water and excess boron," *Plant and Soil*, **256**, 179–186.

- Gallardo-Williams, M.T., Maronpot, R., Wine, R., Brunssen, S. ve Chapin, R., (2003), "Inhibition of the enzymatic activity of prostate-specific antigen by boric acid and 3- nitrophenyl boronic acis," *The Prostate*, **54**, 44 -49.
- Garrett, D. (1998), Handbook of deposits, processing, properties and use, *Academic pres*, San Diego, California.
- Geyer, F.C., Marchio, C. ve Reis-Filhothe, J. S. (2009), "Role of molecular analysis in breast cancer," *pathology*, **41**, 77–88.
- Geyikoğlu, F. ve Türkez, H. (2008), "Boron compounds reduce vanadium tetraoxide genotoxicity in human lymphocytes," *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **26**, 342–347.
- Gonzalez, A., Ulrike, Peters., Johanna, L.W. ve Emily, W. (2007), "Boron intake and prostate cancer risk," *Cancer Causes Control*, **18**, 1131-1140.
- Grahl, C.L. (2004), "Raw & manufactured materials: 2004 review & forecast," *Ceramic Industry*, **154**, 1- 11.
- Grilc, V. ve Jersan, R. (2002), "Minimisation and utilisation of waste mineral sludge from sodium perborate production," *Waste Manage Res*, **20**, 414–423.
- Güleş, E. ve Eren, Ü., (2008), "Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler," *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2**, 73-78.
- Hakkı, S., Bozkurt, B. ve Hakkı, E., (2010), "Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (MC3T3-E1)," *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **24** , 243–250.
- Haner, R. L. ve Keifer P. A. (2009), "Flow probes for NMR spectroscopy," *Encyclopedia of Magnetic Resonance*, **11**, 102-105.
- Hawkins, C. J., Wang, S. L., ve Bruce A. Hay (2005),"A cloning method to identify caspases and their regulators in yeast: identification of drosophila IAP1 as an inhibitor of the drosophila caspase DCP-1," *PNAS* 96, **6**, 2885-2890.
- Heiden, M. G. V., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T. ve Thompson, C. (1997), "Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria," *Cell*, **91**, 627–637.

- Henderson, K., Stella, S. L., Kobylewski, S. ve Eckhert, C. D., (2009), "Receptor activated Ca^{2+} release is inhibited by boric acid in prostate cancer cells," *PLoS ONE*, **4**, 6009.
- Ho, P. ve Hawkins, C. J., (2005), "Mammalian initiator apoptotic caspases," *The FEBS Journal*, **272**, 5436-5443
- Hockenbery, D., Nunez. G., Milliman, C., R, Schreiber. ve Korsmeyer, S. J. (1990) "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death," *Nature*, **348**, 334-336.
- Hooker, C., Carter, S. M. ve Davey, H. (2009), "Writing the risk of cancer: cancer risk in public," *policy Health, Risk & Society*, **11**, 541-560.
- Hung R. W. ve Chow A. W., (2004), "Dissectingthe "Endgame": clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assesment of apoptosis," *Clininvestmed. Application Of Apoptosis*, **3**, 75-78.
- Irimie, S., Vlad, M., Ileana, M., Mireştean, O., Lîsencu, C., Puscaş, E., Fetica, B., Achimaş, P., Bălăcescu, L., Ioana B. ve Irimie, A. (2010), "Risk profile in a sample of patients with breast cancer," *The Public Health Perspective applied Medical Informatics*, **27**, 21-30.
- İnce, S., Kucukkurt, İ., Cigerci, İ. H., Fidan, A.F. ve Eryavuz, A. (2010), "The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats," *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, **24**, 161-164.
- Jaberipour, M., Habibagahi, M., Hosseini, A., Abbasi, M., Sobhani-lari, A., Talei A. ve Ghaderi, A. (2010), "Detection of B cell lymphoma 2, tumor protein 53, and FAS gene transcripts in blood cells of patients with breast cancer," *Indian Journal of Cancer*, **47**, 7-412.
- Janda, A., Heller, G., Pickardt, J. (1981), "Die kristal struktur von synthetischem ammonium tetraborat dihydrat, $(\text{NH}_4)_2[\text{B}_4\text{O}_5(\text{OH})_4]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$," *Zeitschrift für Kristallographie*, **154**, 1-2.
- Jensen, A. A. (2009), "Risk assessment of boron in glass wool insulation," *Environ Sci Pollut Res.*, **16**, 73-78.

- Jiang, W., Lixia, Z., Bo, W. ve Xia, S. (2005), "Thermochemistry of hydrated ammonium borates," *Thermochimica Acta*, **425**, 23–26.
- Jin, L., Tabe, Y., Kojima, K., Zhou, Y., Pittaluga, S., Konopleva, M. ve Miida, T. (2010), "MDM2 antagonist Nutlin-3 enhances bortezomib-mediated mitochondrial apoptosis in TP53-mutated mantle cell lymphoma," *Cancer Letters*, **299**, 161-170.
- Jixu, R., Ruxing, X. ve Fangzhou, Q. (2010), "Investigations on boron levels in drinking water sources in China," *Fu-Shengwei Environmonitassess*, **165**, 15-25.
- Kabalka, G. W., Nichols, T. L., Smith, G.T., Miller, L.F., Khan, M.K. ve Busse P. M. (2003), "The use of positron emission tomography to develop boron neutron capture therapy treatment plans for metastatic malignant melanoma," *Journal of Neuro-Oncology*, **62**, 187-195.
- Kamida, A., Fujita, Y., Kato, I., Iwai, S., Ono, K., Suzuki, M., Sakurai, Y. ve Yura, Y. (2008) "Effect of neutron capture therapy on the cell cycle of human squamous cell carcinoma cells," *Int. J. Radiat. Biol.*, **84**, 191 – 199.
- Kankaanranta, L., Seppälä, T., Koivunoro, H., Välimäki, P. ve Beule, A. (2011), "L-boronophenylalanine- mediated boron neutron capture therapy for malignant glioma progressing after external beam radiation therapy: a phase I study," *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* **80**, 369-376.
- Kantari, C. ve Walczak, H. (2011), "Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria," *Biochimica et Biophysica Acta* **1813**, 558–563.
- Kar, Y., Şen, N. ve Demirbaş, A. (2006), "Boron minerals in Turkey, their application areas and importance for the country's economy," *Minerals And Energy*, **3**, 2–10.
- Karna, P., Peng, X., Cao, Z., Jiang, B., Zhou, M. ve Yang, L., (2006), "Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1_ signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression," *The Journal Of Biological Chemistry*, **281**, 25903–25914.

- Kocakuşak, S., Köroğlu, H. J., Savaşçı, T. ve Tolun, R. (1998), "Production of sodium perborate monohydrate by microwave heating," *Ind. Eng. Chem. Res.* **37**, 2426-2429.
- Korkmaz, F. (2010), *Isırgan otu (urtica dioica) ekstresinin kolon kanseri hücre serileri üzerindeki apoptotik, antiproliferatif ve antioksidan etkilerinin araştırılması*, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Korkmaz, M., Şaylı, U., Şaylı, B. S., Bakırdere, S., Titretir, S., Ataman, O. Y. ve Keskin, S. (2007), "Estimation of human daily boron exposure in a boron-rich area," *British Journal of Nutrition*, **98**, 571-575.
- Kot, F. (2008), "Boron sources, speciation and its potential impact on health," *Earth And Environmental Science Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **8**, 3-28.
- Kylarová, D. (2002), "Comparison of the TUNEL, lamin B and annexin V methods for the detection of apoptosis by flow cytometry," *Acta histochem.* **104**, 367–370.
- Lane, D. ve Levine, A. (2010), "p53 Research: the past thirty years and the next thirty years," *Cold Spring Harb Perspect Biol press*, **2**, 1-10.
- Lavrik, I. N. (2011), "Regulation of death receptor induced apoptosis induced via CD95/Fas and other death receptor," *Molecular Biology*, **45**, 150–155.
- Lee, S. ve Kleiboeker, S. B. (2007), "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway," *Virology* **365**, 419–434.
- Li, Y. (2010), "Betulin induces mitochondrial cytochrome c release associated apoptosis in human cancer cells," *Molecular Carcinogenesis*, **49**, 630–640.
- Liu, Y., Borchert, G. L., Surazynski, A., Hu, A. ve Phang, J. M. (2006), "Proline oxidase activates both intrinsic and extrinsic pathways for apoptosis: the role of ROS/superoxides, NFAT and MEK/ERK signaling," *Onkogene* **25**, 5640-5647.
- Liu, Z., Cheng M. ve Cao, M. Z. (2010), "Potential targets for molecular imaging of apoptosis resistance in hepatocellular carcinoma," *Biomedical Imaging and Intervention Journal*, **10**, 2349-2355.
- Lyday, P. A. (2005), "Boron," *Materyals Review*, **13**, 1-14.

- Mahabir, S., Spitz, M. R., Barrera, S. L., Dong, Y. Q., Eastham, C. ve Forman, M. R. (2008), "Dietary boron and hormone replacement therapy as risk factors for lung cancer in women," *American Journal of Epidemiology*, **167**, 1070-1080.
- Marcel, G. B. ve Edward, C. T. (2010), *Detergent compositions comprising percarbonate bleaching agents*, European, Patent No: EP0639639.
- Marshall, M. (2007), "Advantages of boron in glass mineral wool insulation," *Glass Worldwide*, **11**, 1-5.
- Meacham, S. L. ve Hunt, C. D. (2001), "Aluminum, boron, calcium, copper, iron, magnesium, sodium and zinc concentrations in western foods and estimated daily intakes by infants," *Journal of the American Dietetic Association* **101**, 1158-1159.
- Meacham, S. L., Karakas, S., Wallace, A. ve Altun, F. (2010), "Boron in human health: evidence for dietary recommendations and public policies," *The Open Mineral Processing Journal*, **3**, 36-53.
- Meijer, A. E., Jernberg, A. R., Heiden, T., Stenerlo, B., Persson, L. M., Tilly, N., Lind, B. K. ve Edgren, M. R. (2005), "Dose and time dependent apoptotic response in a human melanoma cell line exposed to accelerated boron ions at four different let," *Int. J. Radiat. Biol.* **81**, 261 – 272.
- Meulmeester, E. ve Jochemsen, A. G. (2008), "p53: a guide to apoptosis," *Current Cancer Drug Targets*, **8**, 87-97.
- Meyn, R. E., Milas, L. ve Ang, K. (2009), "The role of apoptosis in radiation oncology," *Int. J. Radiat. Biol.*, **85**, 107–115.
- Mignotte, B. ve Vayssiere, J. (1998), "Mitochondria and apoptosis," *Eur. J. Biochem.* **252**, 1215-1225.
- Moller, P., Borg, A., Heimdal, K., Apold, J., Vallon-Christersson, J., Hovig, E. ve Mæhle, L. (2001), "The BRCA1 syndrome and other inherited breast or breast-ovarian cancers in a Norwegian prospective series," *European Journal of Cancer*, **37**, 1027–1032.
- Moore, J. A., (1997), "An assessment of boric acid and borax using the zehr evaluatzve process for assessing human developmental and reproductive toxicity of agents," *Reproductive Toxicology*, **11**, 123-160.

- Mosmann, T. (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays methods," *Journal of Immunological*, **16**, 55-63.
- Naghıı, M. R. ve Mofid, M. (2008), "Elevation of biosynthesis of endogenous 17-B oestradiol by boron supplementation: One possible role of dietary boron consumption in humans," *Journal of Nutritional &Environmental Medicine*; **17**, 127–135.
- Nielsen, F. (2008), "Is boron nutritionally relevant?," *International Life Sciences Institute Nutrition Reviews*, **66**, 183–191.
- Odonkor, C. (2008), "Differential activity of caspase-3 regulates susceptibility of lung and breast tumor cell lines to paclitaxel," *The Open Biochemistry Journal*, **2**, 121-128.
- Olejniczak, A. (2007), "Boron targets cancer," *Research In Progress Organic Chemistry*, **3**, 35-37.
- Olivera J. F. (2008), "Cancer immunology" *The new england journal of medicine*, **358**, 2704-15.
- Otsuki, Y. (2000), "Varius methods of apoptosis detection," *Acta Histocem. Cytochem*, **33**, 235-241.
- Özkan, Ş. G., Çebî, H., Delice, S. ve Doğan, M. (1997) "Türkiye bor minerallerinin özellikleri ve madenciliği" Etibank Bor Araştırma Merkezi, 2. Endüstriyel Hammaddeler Sempozyumu, 16-17 Ekim İzmir.
- Özmen, V. (2010), "Breast cancer in the world and Turkey," *Meme Sağlığı Dergisi*, **4**, 1-10.
- Öztürk, F. (1998), *Endüstriyel Sodyum Perborat Monohidrat Üretimi Production of Industrial Sodium Perborate Monohydrate*, Eti Bor A.Ş. Bandırma Bor ve Asit raporu, No: 253, Bandırma.
- Pahl, M., Culver, B. ve Vaziri, D. (2005), "Boron and the kidney," *Journal of Renal Nutrition*, **15**, 362-370.
- Pappas, G. (2009), "Infectious causes of cancer: an evolving educational saga," *Clinical Microbiology and Infection*, **15**, 961-963.

- Parks, J. ve Edwards, M. (2005), "Boron in the environment," *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **35**, 81–114.
- Pongsavee, M. (2009), "Effect of borax on immune cell proliferation and sister chromatid exchange in human chromosomes," *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, **4**, 27-37.
- Qureshi, S., Al-Shabanah, O. A., Al-Harbi, M. M., Al-Bekairi, A. M. ve Raza, M. (2001), "Boric acid enhances in vivo ehrlich ascites carcinoma cell proliferation in swiss albino mice," *Toxicology* **165**, 1–11.
- Raleigh, Z. T. (2010), "Biopsychosocial perspective on the experience of lung cancer," *Journal Of Psychosocial Oncology*, **28**, 116–125.
- Raychaudhuri, S., Skommer, J., Henty, K., Birch, N. ve Brittain, T. (2010), "Neuroglobin protects nerve cells from apoptosis by inhibiting the intrinsic pathway of cell death," *Apoptosis*, **15**, 401-411.
- Repetto, G. ve Zurita, J. L. (2008), "Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity," *Nature Protocols*, **3**, 1125 – 1131.
- Robbins, W., Xun, L., Jia, J., Kennedy, K., Elashoff, D., David, D. ve Ping, L., (2010), "Chronic boron exposure and human semen parameters," *Reproductive toxicology*, **29**, 184-190.
- Salve, P., Kirtawade, R., Gharage, D., Raut, C., Pandurang, N. ve Burade, D. K. (2009), "Activation of caspases by cat's claw (*Uncaria tomentosa*): future treatment for cancer," *Journal of Pharmacy Research*, **2**, 1707-171.
- Sauerweina, W., ve Zurlob, A. (2002), "The eortc boron neutron capture therapy group: achievements and future projects," *European Journal of Cancer*, **38**, 31–34.
- Seiler, J.P. (1989), "The mutagenic activity of sodium perborate," *Mutat Res.*, **224**, 219-27.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. ve Marcus, E. (1998), "Apoptosis signaling by death receptors," *Eur. J. Biochem.* **254**, 439-459.
- Scialli, A. R., Bondeb, J. P., Brüske-Hohlfeld, I., Culver, B. D., Li, Y. ve Sullivan, F. M. (2010), "An overview of male reproductive studies of boron with an emphasis on studies of highly exposed Chinese workers," *Reproductive Toxicology*, **29**, 10–24.

- Scorei, R., Ciubar, R. , Ciofrangeanu, C. M., Mitran, V., Cimpean, A. ve Iordachescu, Dana. (2008), "Comparative effects of boric acid and calcium fructoborate on breast cancer cells," *Biological Trace Element Research*, **122**, 3, 197-205.
- Sgonc, R. ve Gruber, J. (1998), "Apoptosis detection: an overview," *Experimental Gerontology*, **33**, 525–533.
- Sharma, K. ve Srikant, C. B. (1998), "Induction of wild-type *p53*, *bax*, and acidic endonuclease during somatostatin-signaled apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells" *International Journal of Cancer*, **76**, 259–266.
- Srinivasan, A., Li, Feng., Wong, A., Kodandapani, L., Smidt, R., Fritz, J., Wu, J. C. ve Tomaselli, K. J. (1998), "Bcl-xL functions downstream of caspase-8 to inhibit *fas* and tumor necrosis factor receptor 1-induced apoptosis of MCF7 breast carcinoma cells," *The Journal Of Biological Chemistry*, **273**, 4523–4529.
- Stadelmann, C. Ve Lassmann, H. (2000), "Detection of apoptosis in tissue sections," *Cell Tissue Res*, **301**, 19–31.
- Şaylı, S. B., Çöl, M., Elhan, H. A. ve Genç, Y. (2003), "Assessment of fertility and infertility in boron-exposed Turkish subpopulations 6: relevant data from all centers," *Journal of Ankara Medical School*, **25**, 4-10.
- Tanatar, B. ve Ceperley, D. M. (1989), "Ground state of the two-dimensional electron gas" *Phys. Rev.*, **39**, 5005–5016.
- Tang, D., Jill, M. ve Vincent, J. (2000), "Caspase 8 activation and *bid* cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase 3 dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis," *The Journal Of Biological Chemistry*, **275**, 9303–9307.
- Taylor, T. I. ve Taylor, G. G., (1935), "Vapor pressure and dehydration of unstable salt hydrates," *Industrial And Engineering Chemistry*, **27**, 672-682.
- Theulier, M.,Chevallier, A., His, I., Jarvis, M. C., Lovell, M. A., Ripoll, C., Robertson, D., Sauerwein, W. ve Verdus, M. (2001), "Methodological developments for application to the study of physiological boron and to boron neutron capture therapy," *J. Trace And Microprobe Techniques*, **19**, 623–657.

- Türkez, H. (2008), "Effects of boric acid and borax on titanium dioxide genotoxicity" *Journal of Applied Toxicology*, **28**, 658-664.
- Türkez, H. (2007), *Bazı bor bileşiklerinin in vitro şartlarda periferik insan kanı üzerine genetik ve biyokimyasal etkileri*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Tüzel, E., Güler, C., Şamlı, M. ve Demirbaş, M. (2006), "Yüzeyel mesane tümörlerinde tanıs ve prognostik yeni belirleyiciler," *Kocatepe Tıp Dergisi*, **6**, 1-9.
- Ullah, M. F. ve Aatif, M. (2009), "The footprints of cancer development: cancer biomarkers," *Cancer Treatment Reviews*, **35**, 193-200.
- Velioğlu, S. ve Şimşek, A., (2003), "İnsan sağlığı ve beslenme açısından bor," *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, **4**, 23-130.
- Walker, P. R., Leblanc, J., Smith, B., Pandey, S. ve Sikorska, M. (1999), "Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis," *Methods*, **17**, 329-338.
- Wang, P., Zhen, H., Jiang, X., Zhang, W., Cheng, X., Guo, G., Mao, X. ve Zhang, X. (2010), "Boron neutron capture therapy induces apoptosis of glioma cells through Bcl-2/Bax," *BMC Cancer*, **10**, 661-671.
- Watters, D. (2005), *Signalling Pathways in Apoptosis*, Boca Raton, FL, USA.
- Wilson, T.R., Johnston, P.G. ve Longley, D.B. (2009), "Anti apoptotic mechanisms of drug resistance in cancer" *Current Cancer Drug Targets*, **9**, 307-319.
- Woods, W. (1994), "An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry," *Environ Health Perspect*, **102**, 5-11.
- Yaka, E., Eğilmez, M. Y., Keskinöğlu, P., Çavdar, Z., Genç, F. ve İyilikçi, L. (2006), "Alzheimer hastalığında beyin omurilik sıvısında (Bos) biyolojik belirteçler ve Bos'un Pc12 hücre hattı canlılığı üzerine in vitro etkisinin değerlendirilmesi," *Turkish Journal Of Geriatrics*, **9**, 1-7.
- Yanagië, H., Ogata, A., Sugiyama, H., Eriguchi, M., Takamoto, S. ve Takahashi, H. (2008), "Application of drug delivery system to boron neutron capture therapy for cancer," *Inofarma Healthcare*, **5**, 427-443.
- Yang, L. (2005), "Disfunction of the apoptotic pathway in cancer cells" *Application Of Apoptosis to Cancer Treatment*, (Ed: Mels Sluyser), Amsterdam, The Netherlands, 1-29.

- Yıldırımcan, Ş. (2006), *Küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinde fluoressan in-situ hibridizasyon ile Her-2/Neu amplikasyonunun saptanması*, Yüksek Lisans ve Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Yonekawa, H. ve Akita, Y. (2008), "Protein kinase Ce: the mitochondria-mediated signaling Pathway" *The FEBS Journal*, **275**, 4005-4013.
- Yurdakul, A. S., Çalışır, H. C., Demirağ, F., Taci, N. ve Öğretensoy, M. (2002), "Akciğer kanserinin histolojik tiplerinin dağılımı," *Türk Toraks Dergisi*, **3**, 059-065.
- Zeki, A. (1985), *Etibank boraks fabrikası atıklarından ham boraks , saf boraks, borik asit ve perborat üretim şartlarının araştırılması* Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Anorganik Kimya Anabilimdalı, İstanbul.
- Zhang, G., Wu, C., Ye, H., Yan, H. ve Wang, X. (2011), "Nanoscaled carborane ruthenium(II)-arene complex inducing lung cancer cells apoptosis," *Journal of Nano biotechnology*, **9**, 6-15.
- Zimmerman, T. (2004), "Understanding breast cancer genetic," university press of mississippi, **56**, 43-45.
- Zivny, J., Klener, P., Pytlik, R. ve Andera, L. (2010), "The role of apoptosis in cancer development and treatment: focusing on the development and treatment of hematologic malignancies," *Current Pharmaceutical Design*, **16**, 11-33.
- Boyle, P. ve Levin, B. (2008), *Dünya kanser raporu*, 2011. http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789283204237_tur_p1-104.pdf
- Gewies, A. (2003), "Introduction to apoptosis," *Apo rewiew*, 2011. <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>
- Test Method Protocol For The NHK Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay Phase III Validation Study: November 4, 2003. iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/invidocs/phIIIprot/nhkphIII.pdf
- Ulukaya, E. (2003), *Apoptosis Ders Notları*, 2011 <http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozisersnotu.pdf>